

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biodiversité, Ecologie et Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Rodolphe Poupardin

Thèse dirigée par **Stéphane Reynaud** et
codirigée par **Jean-Philippe David**

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

Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides

Thèse soutenue publiquement le **Vendredi 4 Mars 2011**
devant le jury composé de :

Mme Chantal Dauphin-Villemant

Chargée de recherche au CNRS, Paris - Rapporteur

Mme Hélène Roche

Ingénieure de recherche au CNRS, Paris - Rapporteur

Mme Catherine Bourgoïn

Directrice de recherche à l'Institut Pasteur, Paris - Examinatrice

Mr René Feyereisen

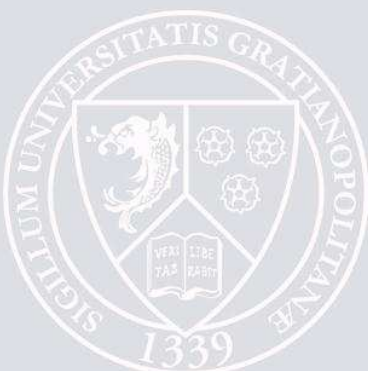
Directeur de recherche à l'INRA, Sophia-Antipolis - Examineur

Mme Mylène Weill

Directrice de recherche au CNRS, Montpellier - Examinatrice

Mr Patrick Ravanel

Professeur à l'Université de Grenoble - Président



A ma famille,
pour leur soutien et leur aide

Remerciements

Cette thèse marque la fin de cinq belles années au sein de l'écosystème que forme le laboratoire d'Ecologie Alpine (de la première année de Master à aujourd'hui). Beaucoup de personnes m'ont soutenu et marqué à différents niveaux. J'aimerais aujourd'hui pouvoir les remercier :

Jean-Philippe David, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche ! Je suis arrivé en Master 1 au LECA où tu m'as offert l'opportunité de faire un stage avec toi et je ne le regrette pas. Tu m'as formé, soutenu et inculqué les notions qui m'ont permis d'évoluer et d'avancer. Je te suis très reconnaissant pour ton encadrement exemplaire (que ce soit derrière une pipette ou un bar à Liverpool) et pour cela, j'espère que nous continuerons un bon bout de chemin ensemble professionnellement et amicalement parlant. Tu es un exemple pour moi !

Stéphane Reynaud, pour ton encadrement et ta bonne humeur indéfectible! Travailler pendant ces 4 années avec toi (Master 2 et thèse) aura été un plaisir que ce soit professionnellement et humainement. Tu m'as donné ta confiance et ton aide, je t'en remercie. Bien sûr, je n'oublierai jamais nos longues discussions « intellectuelles et philosophiques » du matin au café. Toi et Jean-Phi avez formé une superbe et très efficace codirection de thèse!

Patrick Ravanel, j'étais encore sous Biactol© (comprendre en licence de biologie sous anti acnéique) que tu m'as inoculé le virus de l'écotoxicologie ! Tu m'as aussi surtout donné l'envie d'enseigner. J'aimerais te remercier pour cela mais aussi de m'avoir accueilli au sein de l'équipe « Perturbations environnementales et xénobiotiques ». T'avoir comme tuteur pendant mon monitorat aura été un bonheur.

Les membres du Jury, **Chantal Dauphin-Villemant, Hélène Roche, Catherine Bourgouin, Mylène Weill et René Feyereisen** pour avoir accepté d'évaluer mon travail. C'est un honneur pour moi que de vous avoir aujourd'hui. J'aimerais remercier spécialement les rapporteurs Chantal et Hélène pour leur efficacité quant aux délais relativement serrés. Bien sûr, Cette thèse ne serait pas sans les personnes qui m'ont conseillé et dirigé au cours de mes différents comités de thèse à savoir **Vincent Corbel, Laurence Després, Gaëlle Le Goff**, mais aussi **Chantal Dauphin-Villemant** et **Catherine Bourgouin**.

Pierre Taberlet et **Irène Till-Bottraud** pour m'avoir accueilli au laboratoire. Irène, je te remercie sincèrement pour ton soutien.

Romain Blanc-Mathieu et **Farid Khelalfa** pour avoir été d'excellents stagiaires et maintenant de très bons amis. J'ai été très heureux de vous avoir connu. Romain, prochain rendez-vous en Angleterre !

Sébastien Marcombe, **Ali Lamari** et **Emilie Guittard** avec qui j'ai pris grand plaisir à collaborer pendant ma thèse. Sébastien, ces quelques bières euh... microarrays avec toi nous auront permis de bien nous connaître, j'espère que nos chemins se recroiseront ! Ali, la prochaine fois, c'est moi qui débarquerai en Tunisie, non pas avec une blouse, mais plutôt un short et une crème UV50. Enfin, Emilie, même si à nous deux, nous avons réalisé un holocauste entomologique (injecter plusieurs centaines de larves ne nous garantit pas une place au Paradis), j'ai été très heureux de cette collaboration.

Mes collègues du bureau 219, notamment **Angélique San-Miguel** et **Asam Riaz** qui vont profondément me manquer ! Angélique, ta jovialité permanente et ton sourire ont été la lumière du bureau 219 ! Asam, ta gentillesse, ta serviabilité (ce n'est pas tous les jours qu'un collègue vient vous aider à quatre heures du matin pour des expérimentations) et ton sens de l'humour vont me manquer... j'espère sincèrement vous revoir mes amis.

Je n'oublie pas **Guillaume Tétreau** et sa méthode pédagogique révolutionnaire (ou l'art de fixer l'attention des étudiants) ; **Mathieu Faure**, mon digne héritier en tant que responsable cafétaria (organe vital du laboratoire) ; **Mickael Catinon**, mon ex-colloque ; **Ozgür Kilinc**, le pire ennemi des 35h ; **Fabrice Grassein**, mon maître en photographie et collègue de café attiré ; **Alexia Chandor-proust**, notre prêtresse en biochimie ; **Emma Rosseto** et **Charlène Thedevuide**, militantes de la cause blonde ; **Catherine Fallecker**, collègue et surtout amie ; **Marie-Audrey Quintana**, ma voisine de bureau durant quelques mois qui a su me supporter ; **Nicolas Legay**, alias Dexter ; **Jacky Girel**, premier expert mondial en contrepèterie.

Un remerciement particulier à **Lucile Sage** pour sa gentillesse et tous les services qu'elle m'a rendus. Lucile, cette thèse, je te la dois en partie.

Je voudrais remercier également **Michel Tissut**, puits de science et premier être vivant connu à vivre une symbiose académique avec un épagueul Breton nommé « Bibi », je n'oublierai pas nos conversations sérieuses et moins sérieuses ... ; **Sylvie Veyrenc**, pour son

« doux caractère » que j'aime tant et son aide ; **Thierry Gaude**, avec qui je partage de nombreuses passions comme le bricolage et la photo mais aussi **Olivier Lontin**, personne pour qui moi et mon ordinateur sommes très reconnaissants!

Un grand merci à **Delphine Rioux, Christian Miquel, Carole Poillot** et **Armelle Monier** pour leur aide et leur gentillesse lors de mes expérimentations sur la plate-forme MarMol. Je n'oublie pas les autres personnes du troisième étage que j'ai côtoyées à savoir **Alice Valentini, Aurélie Bonin, Wasim Shehzad** et **Frédéric Laporte**.

J'ai eu l'occasion durant ma thèse de faire plusieurs aller-retour à l'école de médecine tropicale de Liverpool (LSTM) où j'ai été très bien accueilli et accompagné... tellement bien accueilli que j'y retourne pour un post-doctorat. Merci à **Hilary Ranson, Clare Strode, Christopher Jones** et les autres membres du LSTM.

J'ai également pu faire connaissance grâce à **Catherine Bourgouin** avec **Isabelle Dusfour** et **Romain Girod** de l'Institut Pasteur de Guyane. Même si à cause de l'emploi du temps et de l'enchaînement des événements, je n'ai pu donner suite à un projet de collaboration, j'aimerais les remercier vivement pour le temps, la gentillesse et l'aide qu'ils ont su me consacrer et j'espère sincèrement pouvoir travailler un jour avec eux.

Si j'ai beaucoup aimé enseigner, c'est grâce à certaines personnes avec qui j'ai travaillé comme **Muriel Raveton** et **Serge Aubert** qui m'ont fait confiance mais aussi **Patrick, Nelly** et **Caro** du CUBE, merci à vous !

Un laboratoire, c'est énormément de démarches administratives compliquées. Heureusement, grâce à **Kim Pla** et **Florence Sagnimorte**, cela s'est transformé en un jeu d'enfant. Je peux l'avouer aujourd'hui, bon nombre d'ordres de mission et de bons de commande n'étaient que des prétextes pour vous voir, merci à vous ! Par la même occasion, j'aimerais remercier **Laurence Salson-Rivière** de l'UFR de Bio.

Je n'omets pas les personnes qui ont quitté le LECA : **Joëlle Patouraux, Joëlle Claustre, Bénédicte Poncet, Margot Paris, Fabien Laurent, Thomas Bouchardy** et **Julien Sérandour** (alias Rourou).

Enfin, j'aimerais remercier de tout mon coeur **mes parents** et **mon frère** à qui je dois énormément pour leur soutien inconditionnel et sans faille ainsi que pour leurs sacrifices. Un grand merci à ma tendre coach personnelle et bien aimée, **Juliette**.

Avant propos

Cette thèse sur articles déposée à l'école doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV) de l'Université Joseph Fourier (UJF) résume le travail réalisé depuis Octobre 2007.

Les trois premières années de cette thèse ont été financées par un contrat d'allocataire de recherche couplé à contrat de moniteur. Depuis Octobre 2010, je suis financé grâce à un poste d'Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (ATER) à l'UFR de biologie de l'UJF. Les expérimentations ont été financées par l'Agence National de la Recherche (ANR 07SEST014 MOSQUITO-ENV). Ce travail a donné lieu à la rédaction de sept articles (5 publiés, 1 soumis et 1 sous presse), à quatre communications de congrès (3 présentations orales et 1 poster) et à l'encadrement de deux stagiaires (1 étudiant en Master 1^{ère} année « Biodiversité, Ecologie et Environnement » et 1 étudiant en 3^{ème} année de Licence de Biologie). Cette thèse m'aura également permis de découvrir et d'apprécier l'enseignement qui me paraît, aujourd'hui, indispensable pour la recherche.



Table des matières

Chapitre I : Introduction générale

I/ Biologie et écologie des moustiques	6
1/ Biologie et cycle de vie des moustiques.....	6
2/ Ecologie des gîtes larvaires.	8
II/ Les moustiques : problèmes générés et lutte	9
1/ Problèmes d'ordres sanitaire et vétérinaire	9
2/ L'homme en lutte contre les moustiques.....	10
III/ Des insectes qui résistent	13
1/ La résistance aux pesticides, un modèle d'adaptation rapide.....	13
2/ Les mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques	14
2-1/ Résistance comportementale.....	15
2-2/ Résistance cuticulaire.....	15
2-3/ Résistance par modification des cibles	16
2-4/ Résistance métabolique.....	18
3/ Les enzymes de détoxification.....	19
3-1/ Enzymes à cytochrome P450 (CYPs)	21
3-2/ Carboxylestérases ou estérases (COEs)	27
3-3/ Glutathion S-transférases (GSTs)	29
IV/ Environnement et contaminants	31
1/ Un peu d'histoire et quelques chiffres.....	31
2/ Milieux aquatiques : un cocktail explosif.	33
V/ Contexte et objectifs de la thèse	35
1/ Contexte de l'étude et hypothèses de la thèse	35

2/ Modèle biologique utilisé.....	36
3/ Approche expérimentale	37

Chapitre II : Impact à court terme des polluants sur la réponse des moustiques aux insecticides

I/ Impact des xénobiotiques sur la tolérance des moustiques aux insecticides 42

1/ Impact d'une exposition larvaire aux xénobiotiques sur leur tolérance aux insecticides chimiques (Publications I et II)	42
1-1/ Choix des xénobiotiques et pré-exposition des larves de moustiques	42
1-2/ Bioessais sur larves de moustiques exposées ou non à des polluants	44
2/ Impact d'une exposition larvaire aux xénobiotiques sur la tolérance des moustiques adultes aux insecticides.	44

II/ Recherche des mécanismes impliqués. 46

1/ Au niveau biochimique (Publications I et II)	46
2/ Au niveau transcriptomique (Publications I, II et III)	47
2-1/ Approche par puces à ADN (Publications I et II)	48
2-2/ Approche par séquençage du transcriptome (Publication III).....	49
3/ Caractérisation des profils transcriptionnels de gènes candidats potentiellement impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (Publication IV).....	52

Chapitre III : Impact à long terme des polluants sur la résistance des moustiques aux insecticides

I/ Les polluants peuvent-ils influencer la sélection des mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques ? (Publication V) 108

1/ Approche expérimentale utilisée	108
2/ Résultats obtenus.....	110
2-1/ Tolérance des souches à la perméthrine.....	110

2-2/ Etude des variations de transcription des gènes	110
3/ Discussion	116
3-1/ Résistance des souches à la perméthrine.....	117
3-2/ Etude des variations de transcription des gènes	118
II/ Etude de la résistance aux insecticides des populations d’Aedes aegypti en Martinique (Publications VI et VII).....	122
1/ Etude des mécanismes de résistance d’une population d’ <i>Aedes aegypti</i> de la Martinique (Publication VI).....	122
2/ Etude de la résistance aux insecticides de différentes populations d’ <i>Aedes aegypti</i> en Martinique : Distribution, mécanismes et relation avec les facteurs environnementaux (Publication VII).....	124
 Chapitre IV : Validation fonctionnelle	
I/ Approche par ingestion d’ARN double brins	221
1/ Production in vitro des ARNs double brins	221
2/ Production in vivo des ARNs double brins par des bactéries	223
II/ Approche par injection d’ARNdb.	227
 Chapitre V : Discussion et perspectives	
I/ Impact à court terme des xénobiotiques environnementaux.....	233
1/ Complexité des interactions entre les réponses aux xénobiotiques et aux insecticides .	233
2/ Mécanismes impliqués dans les interactions biotiques entre polluants et insecticides chez les moustiques	234
3/ L’environnement, un cocktail de molécules	237
II/ Impact des xénobiotiques environnementaux sur le long terme.....	240

1/ Approche expérimentale en laboratoire	240
2/ Validation sur le terrain.....	241
III/ L'approche « gène candidat »: une stratégie pour identifier les gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques	242
1/ Une multitude de candidats potentiels	242
2/ Validation fonctionnelle.....	246
IV/ Conclusion	249
Bibliographie.....	253
Annexe.....	273

Chapitre I : Introduction générale

I/ Biologie et écologie des moustiques

1/ Biologie et cycle de vie des moustiques

Apparus il y a plus de 170 millions d'années, les moustiques, ou Culicidae, appartiennent à la classe des **insectes** de l'embranchement des **arthropodes**. Caractérisés par une paire d'ailes, ces **diptères** comptent plus de 3500 espèces réparties majoritairement au sein des trois genres principaux Aedes, Anopheles et Culex (Resh et Cardé 2003). Grâce à leurs fortes capacités d'adaptation et de vol, ils sont aujourd'hui présents partout dans le monde, là où se trouve de l'eau non gelée, essentielle pour leur développement.

Les moustiques sont des insectes **holométaboles**. Leur développement passe par une phase larvaire **aquatique** avant le stade adulte **aérien** entrecoupé d'une courte phase nymphale (Figure 1) (Clements 1992). Selon les genres, les femelles moustiques gravides pondent leurs œufs de différentes manières. Les œufs d'Aedes sont généralement déposés sur un substrat humide à l'interface air/eau (entre 100 et 200 par femelle). Résistants à la dessiccation, ils peuvent parfois patienter pendant plus d'un an jusqu'à la prochaine mise en eau du gîte. Les femelles du genre Culex pondent plus d'une centaine d'œufs à la surface de l'eau sous forme de barquettes alors que les œufs du genre Anopheles sont pondus individuellement à la surface de l'eau. Dans la plupart des cas, une diminution de la teneur en oxygène de l'eau, liée en partie à la présence importante de matières organiques est l'élément déclencheur de l'éclosion.

Après l'éclosion, la phase larvaire se divise en **quatre stades** distincts séparés par trois mues successives. La durée de cette phase larvaire varie selon les espèces de Culicidae, la température du milieu, la densité larvaire ainsi que la disponibilité en nourriture. Dans les zones tropicales, elle ne dure que quelques jours pour des espèces telles que Aedes aegypti et Aedes albopictus alors qu'en zone tempérée, elle peut durer plusieurs mois chez le moustique Aedes rusticus (Clements 1992).

Les larves de moustiques sont généralement considérées comme détritivores bien qu'elles se nourrissent aussi de micro-organismes vivants tels que les bactéries et les algues (Clements 1992). La nourriture est amenée vers l'entrée du canal alimentaire des larves par l'intermédiaire d'une paire de brosses buccales. Les Anopheles ont tendance à rester en surface et à filtrer les fines particules à l'interface air/eau (« filtreurs de surface») tandis que les larves d'Aedes se positionnent plus en profondeur pour « brouter » les sédiments et collecter des particules plus grosses grâce à leurs pièces buccales de type « brouteurs-collecteurs ». Enfin, les larves de Culex se nourrissent de façon intermédiaire en filtrant l'eau et en collectant les fines particules présentes dans la colonne d'eau (« filtreurs-collecteurs ») (Clements 1992). Après les quatre stades larvaires, s'ensuit le stade **nymphal** ou **pupal** au cours duquel de profonds changements permettent à l'insecte de passer de l'état aquatique à l'état aérien. Au cours de ce stade qui dure en moyenne 1 à 3 jours, l'insecte ne se nourrit pas.

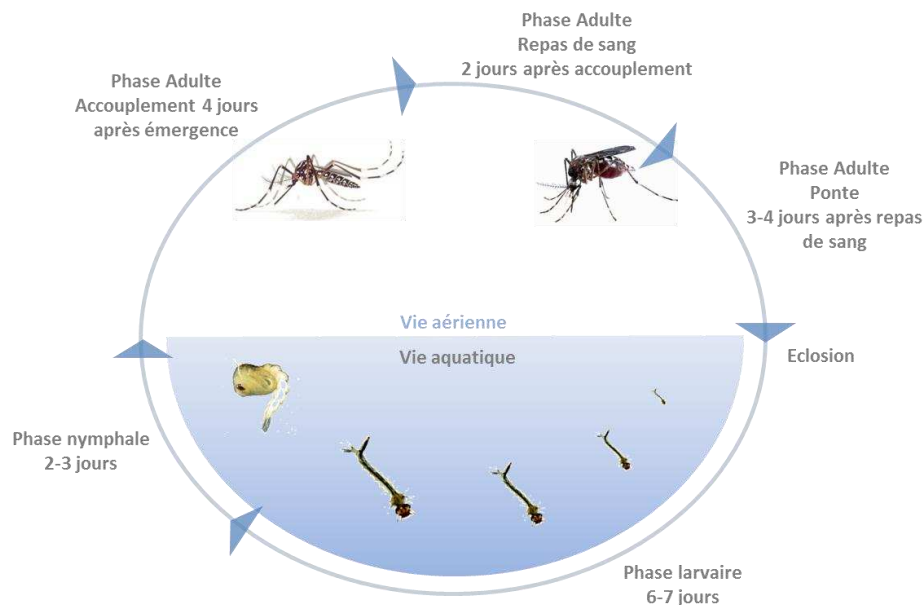


Figure 1 : Cycle de développement du moustique *Aedes aegypti* en milieu tropical

Une fois la métamorphose accomplie, les moustiques mâles émergent en premier à la surface de l'eau, suivis des femelles 24 à 48 heures après. Les adultes se nourrissent de saccharides généralement trouvés dans les nectars végétaux. Après l'accouplement, les femelles ont besoin pour le développement et la maturation de leurs œufs d'un apport important de protéines qu'elles obtiennent par l'intermédiaire d'un repas de sang sur un hôte vertébré. Selon les espèces de moustiques, les hôtes ciblés pour le repas de sang peuvent être plus ou moins spécifiques. Par exemple, les femelles de *Culex pipiens* se nourrissent essentiellement sur des oiseaux (ornithophiles) tandis que d'autres espèces comme *Ae.*

albopictus ou bien *An. gambiae* se nourrissent sur les êtres humains et sont donc considérées comme anthropophiles (Salvan et Mouchet 1994, Takken et Knols 1999). La fécondation des œufs se produit lors de la ponte grâce au stockage du sperme des mâles par la femelle dans une spermathèque.

2/ Ecologie des gîtes larvaires.

Les moustiques, selon leur genre et leur espèce, utilisent une grande variété écologique de gîtes pour le développement de leurs larves (Figure 2). Différents paramètres tels que la couleur, l'humidité, ainsi que la présence de certains composés chimiques volatiles jouent un rôle crucial pour le choix du site d'oviposition par les femelles (Maire 1983, Serandour et al. 2010). Généralement, les gîtes larvaires sont caractérisés par de l'eau douce stagnante plus ou moins riche en matière organique. Pour la plupart des espèces, les femelles pondent dans des gîtes temporaires, là où la profondeur de l'eau est peu importante, notamment afin de limiter la prédation.

Ainsi, les moustiques de l'espèce *C. pipiens* peuvent coloniser des milieux fortement pollués. Dans le sud de la France, on les rencontre dans les fosses septiques, caves, vides sanitaires inondés, égouts à ciel ouvert et bassins de lagunage (Gabinaud et al. 1985, Sinigre et al. 1988). A l'opposée, les *Anopheles*, préfèrent coloniser des gîtes plus ruraux avec une eau peu chargée en matière organique. Chez les *Aedes*, *Ae. albopictus* est une espèce dominante en zone péri-urbaine alors qu'*Ae. aegypti* l'est plutôt en milieu fortement urbanisé. *Ae. aegypti* colonise principalement les gîtes artificiels, comme les récipients de stockage d'eau (récupérateurs d'eau de pluies, coupelles de pot de fleurs) et détritiques abandonnés (pneus, bidons). *Ae. albopictus* quant à elle est une espèce plus opportuniste présente dans les gîtes artificiels ou naturels tels que les creux d'arbres, feuilles au sol (Salvan et Mouchet 1994).

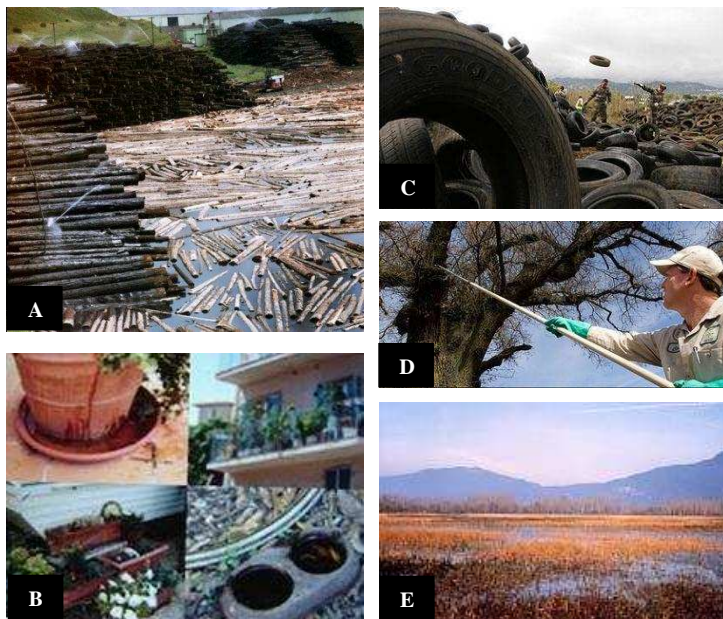


Figure 2 : Exemples de quelques gîtes larvaires. Stockage de bois (A), pots de fleurs (B), stockage de pneus (C), creux d'arbres (D), zone humide temporaire (E).

II/ Les moustiques : problèmes générés et lutte

1/ Problèmes d'ordres sanitaire et vétérinaire

En plus de la gêne occasionnée par leurs piqûres, les moustiques représentent le groupe d'arthropodes ayant l'impact sanitaire et vétérinaire le plus important (Marquardt 2005). Lorsque la femelle pique l'homme ou un animal pour son repas de sang, des microorganismes ou virus causant des maladies peuvent être transmis à l'hôte. Le paludisme (ou malaria en anglais) est une maladie provoquée par certains protozoaires comme *Plasmodium falciparum*. Ce parasite au cycle de vie très complexe passe une partie de sa vie dans l'homme (hôte intermédiaire) avant de terminer son cycle chez son hôte définitif, le moustique *Anopheles*. En 2008, le paludisme a causé l'infection de près de 245 millions de personnes et la mort de plus de 800 000 d'entre elles (OMS 2009b) constituant une des premières causes de mortalité mondiale. D'autres maladies provoquées par des arbovirus tels que la dengue, fièvre jaune et chikungunya sont transmises par les moustiques *Aedes*. Depuis début 2010, une épidémie de dengue sévit en Martinique et en Guadeloupe touchant plus de 60000 personnes et ayant causé 19 morts (source Observatoire régional de la santé en Martinique). A l'île de la Réunion, plus de 300 000 personnes ont été infectées par le virus du chikungunya transmis par *Ae. albopictus* entre 2005 et 2006 (source Observatoire régional de la santé de La Réunion). Une étude a estimé en 2006 que près de 33% de la population de l'île a été infectée par le virus (Pialoux et al. 2006). Les moustiques du genre *Culex* peuvent

également transmettre des maladies humaines et animales telles que la filariose, certaines encéphalites et la fièvre du Nil occidental (FNO). Plus de 120 millions de personnes sont aujourd'hui infectées par la filariose et 40 millions d'entre elles sont gravement handicapées. La filariose menace également plus de 1.3 milliard de personnes dans le monde (OMS 2009a). En 2000, en Camargue, la FNO a provoqué une épizootie touchant 76 chevaux dont un tiers sont morts. D'autres épisodes de FNO ont été observés en Europe (Hubalek et Halouzka 1999, Autorino et al. 2002). Récemment, l'augmentation des échanges économiques et humains a causé la dispersion de certaines espèces de moustiques (Benedict et al. 2007). Ce phénomène est encore plus amplifié par le réchauffement global qui modifie les aires potentielles de répartition des moustiques et donc des maladies liées transmises par ces vecteurs (Patz et al. 1996, Gould et Higgs 2009). C'est le cas du moustique tigre *Ae. albopictus* qui a vu son aire de répartition s'agrandir de manière très importante depuis quelques années. Initialement originaire d'Asie, il est aujourd'hui présent en Afrique, Amérique et en Europe depuis les années 1990 (Pozza et Majori 1992). Sa présence en Europe a eu pour conséquence une épidémie de chikungunya en Italie en 2007 (Enserink 2007, Rezza et al. 2007). Il est également présent en France sur la Côte d'Azur depuis 2004 où son aire de répartition ne cesse de s'agrandir chaque année (Delaunay et al. 2009). En 2010, deux cas autochtones de chikungunya ont même été déclarés à Nice (La Ruche et al. 2010).

Aujourd'hui, peu de vaccins sont disponibles pour lutter contre ces maladies, mise à part le vaccin 17-D contre la fièvre jaune considéré comme très efficace (Theiler et Smith 1937). Des médicaments prophylactiques existent pour limiter l'infection par le paludisme mais plusieurs molécules commencent à montrer leurs limites à cause du développement de mécanismes de résistance chez les parasites. Aujourd'hui, seule la lutte contre les vecteurs permet d'endiguer efficacement la transmission de ces maladies et cette lutte constitue donc un enjeu majeur de santé publique (OMS 2009b).

2/ L'homme en lutte contre les moustiques

Deux approches existent pour limiter le risque d'infection par les maladies transmises par les moustiques. A l'échelle **individuelle**, les répulsifs chimiques sont aujourd'hui très employés et relativement efficaces. Comme leur nom l'indique, ces produits ne régulent pas les populations de moustiques mais protègent juste les humains en limitant leur contact avec

les insectes. Les répulsifs à base de DEET ou de pyréthrianoïdes de synthèse sont directement appliqués sur la peau ou servent parfois à imprégner les moustiquaires et rideaux de fenêtres (Faulde et al. 2010).

La seconde approche vise à **réduire de manière importante les populations de moustiques** vectrices de maladies. Dans les pays industrialisés, de telles actions sont placées sous la responsabilité d'agences gouvernementales spécialisées comme par exemple les Ententes Interdépartementales pour la Démoustication (EIDs) en France. Les premiers moyens de lutte furent l'élimination de certaines zones humides permanentes ou temporaires. En France et en Europe, des programmes de modifications des paysages tels que l'endiguement des cours d'eau a permis de réduire les gîtes larvaires et a abouti à l'éradication du paludisme dans les années 1950 (Serandour et al. 2007). Cependant, menées seules, ces approches ne suffisent pas et le moyen le plus efficace et le plus utilisé aujourd'hui dans le monde pour lutter contre les moustiques reste l'utilisation d'**insecticides chimiques**. Les insecticides peuvent être utilisés en tant que larvicides ou bien en tant qu'adulticides selon les espèces ciblées et le contexte local en matière de topographie des gîtes, législation et des moyens à disposition. L'approche larvicide est généralement préférée lorsque les gîtes larvaires sont facilement identifiables et atteignables tandis que l'utilisation d'adulticides est employée lorsque les gîtes larvaires sont trop diffus dans l'espace et le temps. Dans le cas des larvicides, les insecticides sous forme liquide ou sous forme de granulés sont directement mis dans l'eau. L'utilisation d'adulticides quant à elle, peut consister en la pulvérisation aérienne d'insecticides, l'application d'insecticides à l'intérieur des habitations ou bien l'imprégnation de moustiquaires (Marquardt 2005, Enayati et Hemingway 2010).

L'**essor des insecticides chimiques** a commencé après la deuxième guerre mondiale avec la découverte des propriétés insecticides du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) par Paul Hermann Müller en 1939. De la famille des organochlorés, cet insecticide de première génération a rendu de nombreux services en réduisant voire en éradiquant le paludisme dans certains pays. Cependant, son usage intensif et répété a conduit à l'apparition de nombreux cas de résistance limitant son efficacité (Hemingway et al. 2002). De plus, sa forte capacité de bioaccumulation, sa rémanence dans l'environnement et sa toxicité chez les mammifères ont conduit à son interdiction dans de nombreux pays (Brown 1978). Par la suite, les avancées de l'industrie chimique et l'essor de l'agriculture intensive ont permis le développement d'une deuxième génération d'insecticides, représentée par trois grandes familles : les organophosphorés (téméphos, malathion), les carbamates (carbaryl, propoxur) et les

pyréthrinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine). Ces insecticides chimiques agissent tous au niveau du système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates) soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (organochlorés et pyréthrinoïdes). Comme pour le DDT, les problèmes de résistance des insectes et de toxicité environnementale ont contribué à l'arrivée de la troisième génération d'insecticides. Parmi eux, se trouvent les régulateurs de croissances ou IGRs (Insect Growth Regulators tels que le pyriproxyfène), les insecticides biologiques tels que les toxines de la bactérie *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) et les inhibiteurs de synthèse de la chitine (e.g. diflubenzuron). Ces insecticides sont souvent plus spécifiques et sont donc moins dangereux pour l'environnement et l'homme. En revanche, leur coût est beaucoup plus élevé et le même niveau d'efficacité qu'avec les insecticides de deuxième génération est parfois difficile à atteindre. En France, les seuls insecticides autorisés aujourd'hui sont le bio-larvicide Bti et les pyréthrinoïdes de synthèse en tant qu'adulticides. Même si le Bti présente des avantages indéniables comparé aux insecticides chimiques, son coût, sa production en masse difficile ainsi que les difficultés opérationnelles liées à son utilisation sont autant d'arguments qui garantissent un certain avenir pour les insecticides chimiques. Le DDT en est un bon exemple puisque malgré son interdiction dans de nombreux pays industrialisés, il est encore préconisé aujourd'hui par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la lutte antivectorielle (OMS 2009b).

Aujourd'hui, l'ensemble des molécules chimiques disponibles sur le marché sont toutes menacées par les phénomènes de résistance des moustiques aux insecticides. Dans l'attente de nouvelles molécules insecticides, la priorité actuelle consiste donc à optimiser l'efficacité des insecticides existants et à prolonger leur durée de vie en limitant au maximum les phénomènes de résistance. Une telle approche repose tout d'abord sur une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les phénomènes de résistances.

III/ Des insectes qui résistent

1/ La résistance aux pesticides, un modèle d'adaptation rapide

Le terme **pesticide** désigne les préparations contenant une ou plusieurs substances actives utilisées pour repousser ou éliminer les organismes nuisibles. Elles permettent de lutter entre autres contre les insectes (**insecticides**), champignons (fongicides) et mauvaises herbes (herbicides). Cependant, leur efficacité est menacée par l'augmentation globale de la résistance aux pesticides générant de nombreux problèmes au niveau sanitaire mais aussi agricole (augmentation des coûts et pertes de rendements) (Figure 3) (Holt et Lebaron 1990).

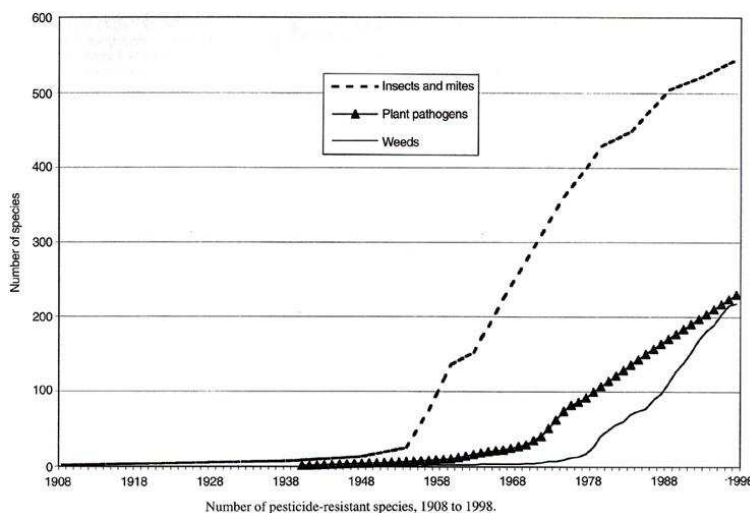


Figure 3 : Développement de la résistance aux pesticides chez les insectes, pathogènes de plantes (parasites et champignons) et mauvaises herbes (Holt et Lebaron 1990).

La **résistance aux pesticides est une caractéristique héritable** d'une espèce, permettant sa survie et sa reproduction à des doses de pesticides létales pour la plupart des individus de type sensible de cette même espèce. Les phénomènes de résistance aux pesticides sont très rapidement apparus après les premières applications d'insecticides (Lindquist et Wilson 1948) ou d'herbicides (Ryan 1970). Ainsi, la résistance au DDT chez les moustiques est apparue en Floride dès 1947, seulement un an après les premières utilisations de cet insecticide organochloré (Hemingway et Ranson 2000). La résistance aux pesticides touche aujourd'hui toutes les catégories de pesticides et de nuisibles (Figure 3) majoritairement dans les pays où leur utilisation est intensive.

D'un point de vue fondamental, ce phénomène offre aux scientifiques des exemples récents d'**adaptations rapides à une forte pression de sélection**. Ainsi, l'étude de la résistance aux pesticides permet une meilleure compréhension des processus adaptatifs et de l'évolution des populations sur des pas de temps très courts au regard du temps évolutif.

2/ Les mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques

Trois termes sont employés pour décrire les patrons de **résistance des insectes aux insecticides**: résistance croisée, résistance multiple et résistance multiplicative (Nikou 2003). Quand un(e) gène/mutation est responsable de la résistance à plusieurs familles d'insecticides, on parle de **résistance croisée**. Un tel phénomène s'observe généralement entre des molécules ayant le même site d'action. Par exemple, les organophosphorés et les carbamates ont des cibles et des modes d'actions relativement similaires et la résistance à une famille entraîne souvent une résistance à l'autre. La **résistance croisée** désigne également la résistance à plusieurs insecticides avec des modes d'action différents mais qui sont métabolisés par les mêmes enzymes (Lepoivre 2003). La **résistance multiple** est la résistance conférée par plusieurs mécanismes de résistances chez un insecte. Par exemple, un insecte possédant deux mutations distinctes qui le rendent résistant à deux familles d'insecticides avec des modes d'action différents (Perera et al. 2008). Enfin, la **résistance multiplicative** désigne le fait que le niveau de résistance conféré par plusieurs mécanismes de résistances aux insecticides chez un insecte sera plus élevé que la somme des niveaux de résistance conférée par ces mêmes mécanismes isolés (Hardstone et al. 2009). Autrement dit, les mécanismes de résistances peuvent agir en synergie.

Plusieurs types de mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides ont été identifiés. Ils peuvent être soit comportementaux, soit liés à des modifications physiologiques (cuticulaire et métabolique) ou bien liés à la mutation de la protéine cible de l'insecticide (Figure 4). Cependant ces mécanismes ne semblent pas être les seuls impliqués dans la résistance des insectes aux insecticides et d'autres restent à étudier.

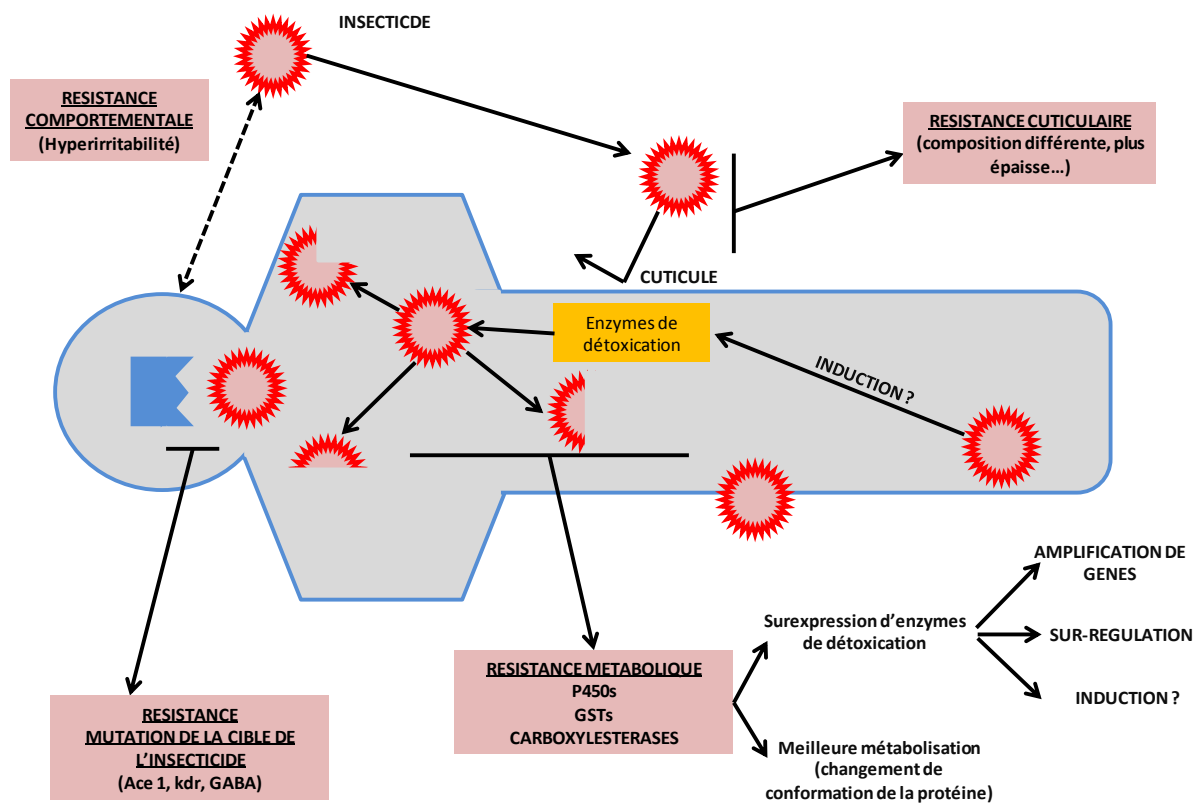


Figure 4 : Principaux mécanismes de résistances aux insecticides chimiques chez les insectes.

2-1/ Résistance comportementale

Une modification du comportement en réponse à l'exposition aux insecticides peut conduire à une meilleure survie des insectes. L'insecte irrité par l'insecticide, s'envole plus ou moins rapidement des surfaces traitées. Même si l'hyper-irritabilité peut ralentir l'apparition de populations résistantes, elle diminue néanmoins l'efficacité des traitements insecticides (Hamon 1963). Une étude a montré que certaines mouches domestiques évitaient le contact avec le matériel contaminé par des insecticides (Hayes et Wolf 1990). Des pulvérisations répétées d'insecticides à l'intérieur des habitats (« indoor residual spraying » ou IRS) en Thaïlande pourraient avoir transformé le régime endophile et anthropophile des femelles du moustique *Anopheles minimus* vers un régime plus exophile et zoophile (Green et al. 1990). Cependant, ce type de mécanisme de résistance reste relativement difficile à étudier et peu d'études sont disponibles.

2-2/ Résistance cuticulaire

Elle désigne toute modification chimique de la cuticule de l'insecte entraînant une réduction de la pénétration de l'insecticide dans l'organisme aboutissant à une meilleure

survie des individus. La cuticule est un milieu biologique complexe ayant des propriétés physico-chimiques particulières, notamment une très forte lipophilie. Ces caractéristiques en font un acteur potentiellement important de la résistance aux insecticides chimiques, car les molécules utilisées sont souvent très hydrophobes et agissent par contact. Des cas de résistance cuticulaire ont été rapportés dans des souches de *Musca domestica* (Plapp 1984) et de moustiques du genre *Culex* (Apperson et Georghiou 1975). Plus récemment, la sur-transcription des gènes cuticulaires CPLC8 et CPLC# dans une souche d'*An. gambiae*, suggérant leur rôle potentiel dans la résistance de cette souche aux pyréthriinoïdes (Awolola et al. 2009). Dans une autre étude, des mesures par microscopie à balayage électronique ont montré une plus grande épaisseur de cuticule chez une souche d'*An. funestus* résistante aux pyréthriinoïdes comparée à une souche sensible (Wood et al. 2010). Seul, ce mécanisme offre des niveaux de résistance faible comparé aux autres mécanismes physiologiques mais combiné à des mécanismes de détoxification, il est susceptible de générer des niveaux de résistance beaucoup plus importants (Résistance multiplicative). Ainsi, il a été suggéré que ce phénomène pouvait être impliqué et agir de concert avec une augmentation de la résistance métabolique chez des moustiques du genre *Anopheles* résistants aux pyréthriinoïdes (Djouaka et al. 2007, Vontas et al. 2007, Djouaka et al. 2008).

2-3/ Résistance par modification des cibles

Une modification de la conformation de la protéine cible de l'insecticide peut diminuer la capacité de fixation de ce dernier et donc son effet. Elle s'explique par la substitution d'un ou de plusieurs acide(s) aminé(s) dans la séquence protéique de la protéine cible suite à une mutation non synonyme (French-Constant et al. 2004). Trois cibles principales, au niveau du système nerveux, sont décrites dans la littérature : les mutations de l'acétylcholinestérase (AChE), du récepteur GABA et du canal sodium voltage dépendant (Figure 5). Dans la plupart des cas, le site conférant la résistance à une ou plusieurs familles d'insecticides est conservé chez un grand nombre d'espèces non apparentées (French-Constant et al. 1998, French-Constant et al. 2004).

- Modification de l'acétylcholinestérase (AChE) :

L'acétylcholinestérase, codée par le gène *Ace-1*, est la cible des insecticides de type organophosphorés (OP) et carbamates. Ces insecticides se fixent sur l'enzyme qui n'est alors plus capable de dégrader l'acétylcholine inter-synaptique. Le signal transmis par le neurotransmetteur sur son récepteur n'est plus interrompu, ce qui conduit à une

hyperexcitation post-synaptique et à la mort de l'insecte. Plusieurs mutations (**mutations Ace-1**) sur ce gène telles que G119S ont été retrouvées chez de nombreux moustiques tels que *Cx. pipiens* (Raymond et al. 1985, Raymond et al. 1986, Bonning et Hemingway 1991), *Cx. quinquefasciatus* (Bisset et al. 1990), *Cx. tritaeniorhynchus* (Takahashi et Yasutomi 1987), *An. albimanus* (Ayad et Georghiou 1975) et *An. gambiae* (Weill et al. 2003) leur conférant une résistance accrue aux OPs et aux carbamates.

- Modification du récepteur GABA :

Le récepteur à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) codé par le gène *rdl* est la cible des cyclodiènes, de certains organochlorés (lindane) et des phénylpyrazoles (Fipronil). La fixation du GABA sur son récepteur régule le passage des ions chlorures à travers la membrane synaptique. Les cyclodiènes en se fixant sur le récepteur au GABA, bloquent le passage des ions chlorures, entraînant une hyperexcitation suivie de la mort de l'insecte. Une mutation sur le gène *rdl* entraînant la substitution de l'alanine en serine en position 302 (Ffrench-Constant et al. 1993) ou glycine (Hosie et al. 1997) conduit à une meilleure résistance aux cyclodiènes (Bass et al. 2004). Cette mutation (**mutation *rdl***) a été retrouvée entre autre chez les moustiques *Ae. aegypti* (Thompson et al. 1993), *An. gambiae* (Brooke et al. 2006) et la mouche domestique *M. domestica* (Anthony et al. 1991).

- Modification du canal à sodium voltage dépendant :

Le canal à sodium voltage dépendant est la cible des pyréthriinoïdes et de l'organochloré DDT. La fixation de l'insecticide sur le canal entraîne son ouverture et une hyperexcitation neuronale se traduisant par un phénomène de paralysie de l'insecte (effet « knock down ») qui peut conduire à sa mort. Chez les moustiques, plusieurs **mutations de ce gène (mutations *kdr*** pour « knock down resistance ») telles que L1014P et L1014S dans le segment S6 du domaine II de la protéine confèrent une résistance accrue aux pyréthriinoïdes. En Afrique de l'ouest, la mutation L1014P est fréquemment retrouvée dans les populations d'*An. gambiae* (Martinez-Torres et al. 1998) alors que l'autre mutation sera plus fréquente chez les populations d'Afrique de l'est et de *C. pipiens* en Chine (Martinez-Torres et al. 1999, Hemingway et Ranson 2000). En Ouganda de l'est, la mutation L1014S a été retrouvée chez une souche d'*An. gambiae* résistante au DDT et aux pyrethriinoïdes (Ramphul et al. 2009). D'autres mutations *kdr* ont été identifiées chez les moustiques ainsi que chez d'autres insectes (Jamroz et al. 1998, Schuler et al. 1998, Liu et al. 2000).

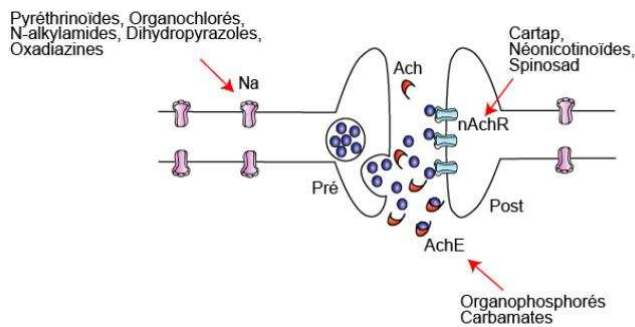
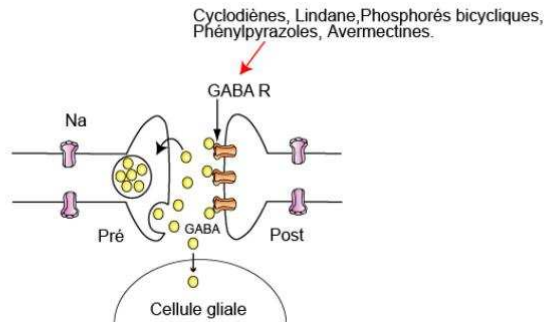


Figure 5: Modes d'actions des principaux insecticides chimiques agissant au niveau du système nerveux (Pennetier 2008).



2-4/ Résistance métabolique

La **résistance métabolique** se traduit par une **augmentation du métabolisme** des insecticides, généralement par des familles d'enzymes à large spectre de substrats. Ces enzymes dites de détoxification sont présentes dans l'ensemble du règne animal et végétal. L'augmentation du métabolisme des insecticides peut être due soit à une augmentation de la production d'une ou de plusieurs enzymes de détoxification existante **soit à un meilleur métabolisme de l'insecticide suite à une mutation** d'une ou de plusieurs enzymes. Ce phénomène se traduit par une diminution de la quantité d'insecticide atteignant la cible et donc à une augmentation de la tolérance de l'insecte. Chez les moustiques, trois grandes familles d'enzymes de détoxification ont été fréquemment impliquées dans la résistance aux insecticides: Les monooxygénases à cytochrome P450 (**CYPs**), les glutathion S-transférases (**GSTs**) et les carboxylestérases (**COEs**) (Hemingway et al. 2004). Leurs caractéristiques et fonctions sont détaillées dans le paragraphe suivant.

3/ Les enzymes de détoxication

Dans leur environnement, les insectes sont confrontés à un grand nombre de molécules d'origines naturelles ou anthropiques. Ces composés **étrangers à l'organisme (xénobiotiques)** peuvent être des composés végétaux comme par exemple les tannins, coumarines ou alkaloides mais également des pesticides, métaux lourds, polluants organiques et médicaments. Ces composés toxiques ou non vont pénétrer dans l'organisme et se distribuer au sein des différents tissus et organes selon leurs caractéristiques physico-chimiques (lipophilie, composition chimique, charge etc). Au sein de l'organisme, ils vont subir des processus de biotransformation, impliquant généralement des enzymes à large spectre de substrats (Xu et al. 2005). Dans la majorité des cas, ce processus aboutit à des métabolites plus polaires et donc plus faciles à excréter par l'organisme. Les réactions de biotransformation des xénobiotiques peuvent être séparées en deux phases distinctes (Jakoby et Ziegler 1990, van der Oost et al. 2003) (Figure 6).

Les réactions de phase I ou de fonctionnalisation sont des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, qui permettent l'introduction ou la libération de fonctions chimiques polaires sur le xénobiotique favorisant ainsi l'action des enzymes de phase II. Les réactions d'oxydation sont principalement catalysées par les monooxygénases à cytochrome P450. Parmi les réactions d'hydrolyse, les estérases jouent un rôle important dans l'hydrolyse des liaisons esters présentes dans certains insecticides et notamment des organophosphorés (Peiris et Hemingway 1993). Aujourd'hui, il apparaît évident que d'autres enzymes catalysant des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse etc... sont aussi susceptibles d'intervenir dans cette phase.

Les réactions de phase II ou de conjugaison sont des réactions d'addition d'une molécule endogène hydrosoluble sur les xénobiotiques ou leurs métabolites. Parmi les substrats endogènes conjugués, on peut citer le glutathion, l'acide glucuronique, les acides aminés comme la glutamine, la glycine, les sucres etc... Chaque type de substrat endogène fait intervenir une famille d'enzyme spécifique. Par exemple, la conjugaison d'une molécule avec le glutathion est catalysée par les glutathion S-transférases tandis que l'uridine diphosphate glucuronyl-transférase conjugue l'acide glucuronique (Vessey et Zakim 1974, Jakoby et Ziegler 1990).

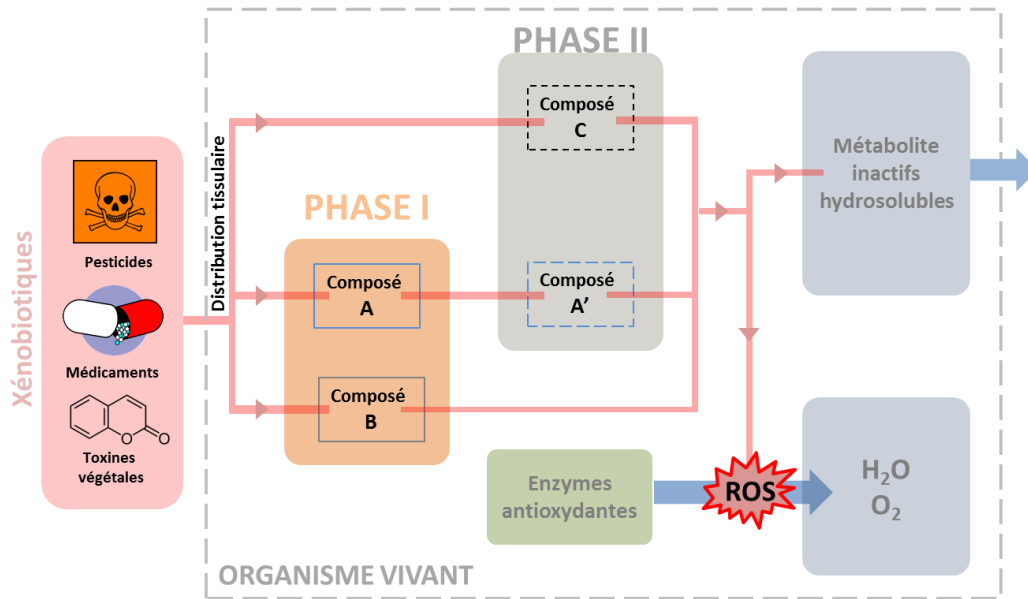


Figure 6 : Les différentes phases théoriques des processus de biotransformation enzymatiques.

Un xénobiotique ne sera pas forcément pris en charge par les deux phases. Il peut aussi être directement éliminé ou juste pris en charge par des enzymes de phase I ou de phase II. L'ensemble de ces réactions peut aussi aboutir à la formation de métabolites plus toxiques que la molécule initiale. Ainsi, ces mécanismes aboutissent parfois à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou à des composés électrophiles susceptibles de se lier aux macromolécules cellulaires comme l'ADN, provoquant des phénomènes de toxicité (Figure 6).

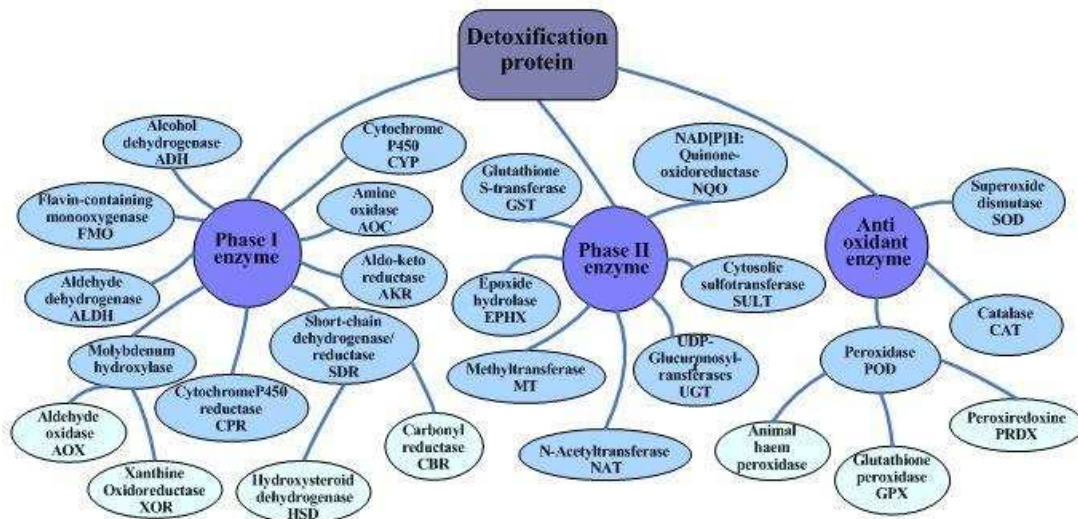


Figure 7 : Diversité des enzymes de détoxification (D'après DetoxiProt database : <http://lifecenter.sgst.cn/detoxiprot/>)

Beaucoup d'études traitant des mécanismes de détoxification chez les mammifères ont mis en évidence un grand nombre de familles enzymatiques impliqués (Figure 7) (Hines et McCarver 2002, McCarver et Hines 2002, Limon-Pacheco et Gonsebatt 2009). Chez les insectes, certaines de ces enzymes de détoxification sont connues pour jouer un rôle important dans leur résistance aux insecticides chimiques. Trois grandes familles ont fait l'objet d'études plus approfondies et sont traitées dans les paragraphes suivants.

3-1/ Enzymes à cytochrome P450 (CYPs)

Les enzymes à cytochrome P450 (CYPs ou gènes CYPs), représentent une superfamille d'enzymes multifonctionnelles que l'on rencontre chez tous les organismes (Nelson et al. 1993). Elles sont impliquées dans un grand nombre de mécanismes métaboliques tels que le métabolisme de composés endogènes (hormones stéroïdes, acide gras) ainsi que dans le métabolisme de certains xénobiotiques tels que les médicaments, pesticides, polluants et toxines végétales (enzymes de détoxification) (Scott 1999). La découverte en 1958 d'un pigment microsomal hépatique absorbant fortement à 450 nm une fois réduit et saturé avec du monoxyde de carbone est à l'origine de leur nom (Garfinkel 1958, Klingenberg 1958). Six années plus tard, ces pigments seront identifiés en tant qu'hémoprotéines et appelés « cytochrome P450 » par Omura et Sato (Omura et Sato 1964). A cause des différentes réactions qu'elles catalysent, plusieurs termes existent dans la littérature comme monooxygénases à cytochrome P450 (CYPs) ou bien oxydases à fonctions multiples (Scott 1999).

- Caractéristiques générales et fonctionnement des CYPs

Les CYPs sont des protéines membranaires à hème-thiolate localisées dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie chez les eucaryotes (Feyereisen 2005). Les CYPs mitochondriaux utilisent cependant un système de transfert d'électrons différents de ceux du réticulum, les rendant plus proches des CYPs solubles et primitifs de bactéries (Scott 1999). Ces hémoprotéines sont impliquées dans plus de 60 réactions différentes mais leur rôle de monooxygénases reste le plus connu. Les monooxygénases catalysent le transfert d'un atome d'une molécule d'oxygène sur le substrat en réduisant l'autre atome en eau (Figure 8). Pour fonctionner, un CYP a besoin de partenaires redox (Feyereisen 2005). Le premier est la NADPH cytochrome P450 réductase contenant deux co-facteurs flaviniques : la flavine

adénine dinucléotide et la flavine mononucléotide. Elle est entourée de plusieurs CYPs à qui elle fournit les électrons. Un autre partenaire redox possible est le cytochrome b5 (Cyt b5), petite hémoprotéine membranaire transporteuse d'électrons. L'effet du Cyt b5 peut varier selon les substrats et n'est pas forcément obligatoire (Schenkman et Jansson 2003, Murataliev et al. 2008).

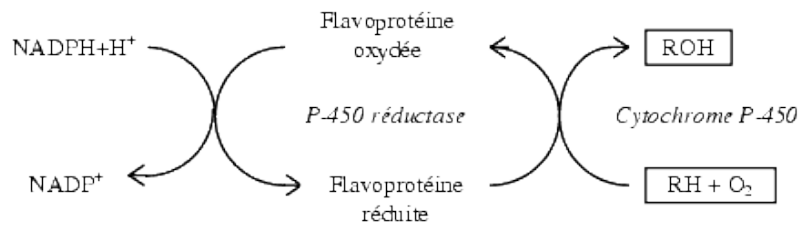
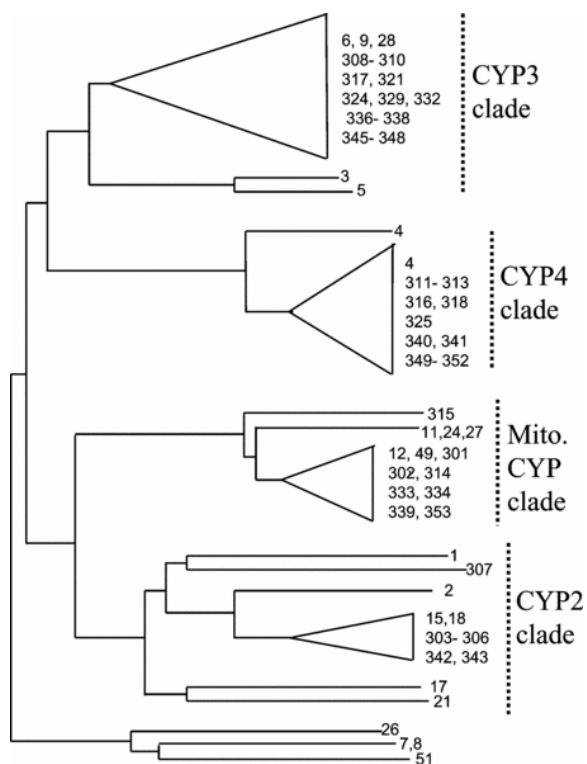


Figure 8 : Fonctionnement simplifié de l'oxydation d'un xénobiotique (RH) par les monooxygénases à cytochromes P450.

Une des caractéristiques majeures des CYPs est leur large spectre d'activités catalytiques. Chez l'humain, CYP1A1 peut métaboliser plus de 20 substrats (Rendic et DiCarlo 1997), CYP2D6, plus de 30 médicaments (Guengerich 1995) alors que CYP7A1 n'a qu'un substrat connu. De plus, plusieurs CYPs peuvent métaboliser le même substrat témoignant d'une redondance fonctionnelle. Ainsi, l'étude du rôle des CYPs dans la biodégradation des xénobiotiques est d'autant plus compliquée puisque un simple changement d'acide-aminé dans leur séquence protéique peut modifier leur spécificité de substrat (Lindberg et Negishi 1989).

- Nomenclature des CYPs

A cause du grand nombre de CYPs représentés au sein des espèces, une classification claire et fonctionnelle s'est imposée. La première nomenclature des CYPs a été établie en 1987 alors qu'il n'y avait que 65 séquences connues (Nebert et al. 1987). Cette classification a ensuite évoluée pour arriver à celle utilisée aujourd'hui. Les gènes codants pour des CYPs sont désignés par le préfixe CYP suivi d'un numéro correspondant à la famille puis d'une lettre pour la sous-famille et enfin d'un numéro pour le gène. Les différentes versions alléliques d'un même gène sont différenciées avec un indice v1, v2, etc... (ex : CYP6B1v2) (Feyereisen 1999).



Les CYPs sont classés en fonction de leur séquence protéique (Figure 9). Plus précisément, le pourcentage d'acides aminés identiques ainsi que les relations phylogénétiques sont utilisés. Les CYPs qui appartiennent à la même famille doivent présenter au moins 40% d'acides aminés identiques et plus de 55% pour appartenir à la même sous famille.

Figure 9: Les CYPs d'insectes alignés avec des CYPs de vertébrés sont regroupés en quatre clades. Ces quatre clades existaient avant la divergence de la classe des insectes. Dans chaque clade sont indiquées les différentes familles de CYPs d'insectes (Feyereisen, 2006).

- CYPs d'insectes et résistances aux insecticides

La taille des familles de CYPs varie en fonction des espèces d'insectes. Chez la majorité des insectes, le génome compte une centaine de CYPs. Par exemple chez *Drosophila melanogaster*, *An. gambiae* et *Ae. aegypti*, 86, 105 et 160 gènes codant pour des CYPs (ou CYPs) ont été identifiés respectivement (Tijet et al. 2001, Ranson et al. 2002, Strode et al. 2008). A contrario, chez d'autres espèces comme *Pediculus humanus humanus* et *Apis mellifera*, seulement 37 et 46 CYPs ont été décrits (Claudianos et al. 2006, Lee et al. 2010). Chez la plupart des insectes, plus de la moitié des CYPs appartiennent aux familles CYP4 et CYP6 (clades 3 et 4).

Les CYPs peuvent être impliqués dans le métabolisme de **molécules de signalisation endogènes**, notamment des hormones. Ainsi, les gènes CYP appelés "Halloween" chez la drosophile codent pour des CYPs impliqués dans la biosynthèse des ecdystéroïdes. Ces hormones stéroïdes contrôlent les mues larvaires ainsi que la transition de la larve en nymphe puis en adulte (Rewitz et al. 2006). Contrairement aux CYPs impliqués uniquement dans la détoxification des xénobiotiques, ces enzymes sont vitales puisque une inactivation de ces gènes entraîne de graves perturbations du développement, en particulier lors des transitions de stades larvaires, nymphal et adulte. Ces CYPs sont en général fortement conservés au cours de l'évolution. Chez *Drosophila melanogaster*, quatre CYPs (CYP306A1, CYP302A1,

CYP315A1 et CYP314A1) catalysent les quatre hydroxylations finales qui aboutissent à la formation de l'hormone active 20-hydroxyecdysone (Warren et al. 2002, Petryk et al. 2003, Niwa et al. 2004, Warren et al. 2004). Les orthologues de ces gènes (AgCYP302A1, AgCYP315A1 et AgCYP314A1) sont impliqués dans les mêmes mécanismes chez *An. gambiae* (Pondeville et al. 2008). D'autres CYPs permettent de réguler les niveaux d'hormones juvéniles (Feyereisen 1999). Cela a été montré entre autres chez la blatte où CYP4C7, spécifiquement exprimé dans les corpora allata, métabolise certains terpénoïdes dont l'hormone Juvénile III (Sutherland et al. 1998). Ces hormones contrôlent le développement larvaire tout en bloquant la mue (Berger et Dubrovsky 2005). Certains insecticides de type « Insect Growth Regulators » (IGRs) imitent d'ailleurs l'action de ces hormones bloquant ainsi la croissance de l'insecte au stade larvaire. Enfin, des CYPs sont également impliqués dans le métabolisme des acides gras (Feyereisen 1999).

D'autres CYPs sont impliqués dans le métabolisme de nombreux **composés exogènes** potentiellement toxiques pour l'organisme. Ces CYPs (enzymes de détoxification) à large spécificité de substrats ont une évolution rapide. Leur rôle dans la défense des insectes contre les composés allélochimiques de plantes est bien documenté (Brattsten et al. 1977, Frank et Fogleman 1992). Chez le papillon *Papilio polyxenes* se nourrissant sur des plantes riches en xanthotoxines, CYP6B1 joue un rôle important dans la détoxification et la tolérance aux composés allélochimiques (Ma et al. 1994, Wen et al. 2003).

Les CYPs impliqués dans la détoxification sont le sujet de nombreuses études pour leur rôle dans la **résistance des insectes aux insecticides**. Une première approche permettant de mettre en évidence leur rôle potentiel dans le métabolisme des insecticides est l'utilisation de composés inhibiteurs des CYPs, synergistes de l'action des insecticides tels que le pypéronil butoxyde (PBO). En réalisant des tests toxicologiques (bioessais) sur des souches sensibles et résistantes, en présence ou non de PBO, il est alors possible de relier l'augmentation de résistance à l'insecticide avec les activités des CYPs. D'autres approches biochimiques utilisant des substrats connus de CYPs comme la 7-ethoxycoumarine ou la 7-ethoxyresofurine permettent d'estimer les activités « globales » de ces enzymes (Desousa et al. 1995). Enfin, les récentes avancées moléculaires telles que les puces à ADN permettent aujourd'hui d'identifier par une approche globale les gènes différentiellement transcrits chez les souches résistantes et donc potentiellement impliquées dans le métabolisme des insecticides, notamment chez les moustiques (David et al. 2005, Strode et al. 2008).

Nombreuses sont les études qui ont montré des niveaux plus élevés de CYPs corrélés à la résistance des insectes aux insecticides. Ces niveaux plus élevés peuvent être liés à l'amplification de gènes (Wondji et al. 2009) ou bien à une modification de la régulation de leur expression (Daborn et al. 2002). Cependant, seules quelques études ont pu démontrer la capacité de certains CYPs à métaboliser des insecticides par des approches fonctionnelles. Globalement, les familles CYP6 et CYP9 semblent posséder le plus grand nombre de candidats potentiellement impliqués dans la métabolisation des insecticides (Daborn et al. 2002, David et al. 2005, Muller et al. 2007, Chiu et al. 2008, Strode et al. 2008). Chez *D. melanogaster* par exemple, la surexpression de CYP6G1 confère la résistance au DDT, nitenpyram et dicyclanil, celle de CYP6G2 au nitenpyram et diazinon et enfin la surexpression de CYP12D1 augmente la résistance des drosophiles au DDT et dicyclanil (Daborn et al. 2002, Daborn et al. 2007). La surexpression des CYPs CYP6A1, CYP6D1 et CYP12A1 confère la résistance entre autres aux pyréthrinoïdes, organophosphorés chez *M. domestica* (Andersen et al. 1994, Guzov et al. 1998, Kasai et Scott 2000). Récemment chez *An. gambiae*, il a été montré que CYP6Z1 est capable de métaboliser le DDT (Chiu et al. 2008) tandis que CYP6P3 est capable de métaboliser les pyréthrinoïdes (Muller et al. 2008b).

- Régulation de l'expression des CYPs

Les patrons d'expression des CYPs chez les insectes peuvent être très variables au niveau tissulaire et temporel (Feyereisen 1999, Scott 1999, Feyereisen 2005). Par exemple, CYP6B2 chez *Helicoverpa armigera* est spécifiquement exprimé chez la larve (Ranasinghe et al. 1997) tandis que CYP6Z1 semble spécifique du stade adulte chez *An. gambiae* (Nikou et al. 2003). Chez la drosophile, CYP4D21 est un gène dont l'expression varie au cours des rythmes circadiens (Claridge-Chang et al. 2001). Chez la drosophile, CYP6G1, qui est impliqué dans la résistance au DDT, est préférentiellement transcrit dans le canal alimentaire et les tubes de Malpighi (Chung et al. 2007, Yang et al. 2007). Chez *Tribolium castaneum* un CYP spécifique du cerveau (CYP6BQ9) est capable de métaboliser le pyréthrinoïde deltaméthrine (Zhu et al. 2010).

Une des autres caractéristiques majeures des CYPs est la régulation de leur expression par de nombreux composés endogènes et exogènes (Feyereisen 1999, 2005). Les CYPs impliqués dans le métabolisme des hormones de mues (ecdystéroïdes) sont souvent induits par ces mêmes hormones. Chez *D. melanogaster*, c'est le cas de CYP18, qui code une enzyme du catabolisme des ecdystéroïdes et montre des pics d'induction corrélés aux pics

d'ecdystéroïdes (Bassett et al. 1997, Guittard et al. 2011). De façon similaire, la transcription du gène shade CYP314A1 est corrélée avec l'activité de l'enzyme 20-hydroxylase qui transforme l'ecdysone en 20-hydroxyecdysone et avec les pics de cette hormone active (Rewitz et al. 2006). Certains composés allélochimiques de plantes, médicaments mais aussi pesticides peuvent modifier l'expression des CYPs. Ainsi, chez les lépidoptères, une exposition de *Papilio* sp. à des xanthotoxines peut induire la transcription de CYP6B1 et CYP6B3 (Harrison et al. 2001). Différents CYPs sont également induits après exposition de *H. zea* à l'acide salicylique et jasmonique (Li et al. 2002). Chez la drosophile et d'autres insectes, le phénobarbital est un inducteur connu des CYPs (Amichot et al. 1998). Dans une étude plus récente, Le Goff et al. (Le Goff et al. 2006) ont montré que 11 CYPs dont l'orthologue de CYP6A2 répondaient à l'exposition de *D. melanogaster* au phénobarbital. Dans cette même étude, CYP6A2 était également induit après exposition des mouches à un herbicide, l'atrazine, ce qui démontre **l'induction possible des gènes CYPs par de multiples substrats**. Des insecticides comme la perméthrine, la cyperméthrine ou bien le DDT peuvent également induire l'expression des gènes CYPs (Ranasinghe et al. 1997, Brandt et al. 2002, Zhu et Snodgrass 2003, Willoughby et al. 2006). Enfin, il apparaît important de garder à l'esprit que la dose de xénobiotique ainsi que le temps d'exposition sont des facteurs importants de l'induction de l'expression des gènes CYPs (Baek et al. 2010, Zhou et al. 2010).

Les mécanismes d'induction de l'expression des gènes CYPs sont encore peu connus chez les insectes. Chez les vertébrés, des xénobiotiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou les dioxines peuvent induire la transcription des CYPs en se fixant sur le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) (Goksoyr et Husoy 1998). Ce récepteur réside à l'état inactif dans le cytoplasme où il forme un tétramère avec un dimère de protéines de choc thermique HSP 90, l'immunophiline XAP2 et la co-chaperonne p23. La liaison du ligand au récepteur provoque une transformation thermo-dépendante du complexe avec libération des protéines de choc thermique Hsp 90, de XAP2 et de p23. Après phosphorylation, le complexe est transféré vers le noyau où il se fixe à un ARN de transfert (ARNt). Le complexe ainsi formé interagit avec un site spécifique de l'ADN en amont du gène CYP, le site XRE (Xenobiotic Response Element) qui régule la transcription de ce dernier (Petrucci et Perdew 2002, Backlund et Ingelman-Sundberg 2005). Chez les insectes, l'analyse des séquences 5' en amont de différents gènes CYPs a permis d'identifier plusieurs éléments de régulation potentiellement impliqués dans leur induction par les xénobiotiques.

Des séquences similaires à XRE ont été identifiées chez le lepidoptère *P. polyxenes* et semblent impliquées dans l'induction de CYP6B1 par les xanthotoxines (Brown et al. 2005).

Cette **plasticité phénotypique** des gènes CYPs peut avoir des conséquences importantes notamment sur le **contrôle des insectes nuisibles**. Par exemple, il est reconnu que les mêmes espèces d'insectes herbivores se nourrissant sur des plantes hôtes différentes montrent des réponses différentes aux pesticides (Feyereisen 2005). La relation entre la capacité des CYPs à dégrader les xénobiotiques et leur capacité à être induits par des composés chimiques a souvent été utilisée pour identifier les gènes responsables de la résistance des insectes aux insecticides (Petersen et al. 2001, Wen et al. 2003). Cependant le lien entre l'inductibilité des gènes CYPs et leur implication dans la résistance aux insecticides reste controversé et ne semble pas pouvoir être généralisé. Dans la majorité des études, l'augmentation de tolérance à l'insecticide est seulement corrélée à une augmentation des activités globales de CYPs due à une exposition à des xénobiotiques. Ainsi, l'exposition de larves d'*Ae. albopictus* au benzothiazole (composé majeur entrant dans la composition des pneus) et au pentachlorophénol (agent de protection du bois) augmente leur tolérance aux insecticides carbaryl, roténone et téméphos (Suwanchaichinda et Brattsten 2001, 2002). Ces études dénotent donc des interactions possibles entre les **composés chimiques environnementaux** et la **tolérance des insectes aux pesticides** notamment par l'intermédiaire des enzymes de détoxification.

3-2/ Carboxylestérases ou estérases (COEs)

Les termes **carboxylestérases** ou **estérases** regroupent les enzymes qui hydrolysent des esters carboxyliques (Hemingway et al. 1998). La résistance aux insecticides chimiques liée aux carboxylestérases a été étudiée chez plus de 30 nuisibles au niveau sanitaire, vétérinaire et agricole. Chez les moustiques, ce mécanisme représente la première cause de résistance aux OPs et la deuxième pour la résistance aux carbamates (Peiris et Hemingway 1993). Dans une moindre mesure, les estérases peuvent également conférer une résistance aux pyréthriinoïdes (Vulule et al. 1999).

La faible spécificité de substrats des estérases a complexifié leur classification. Cependant, Aldridge en 1953 a tout de même établi une classification sur le fait que les estérases inhibées par le paraoxon seraient appelées estérases B et celles non-inhibées estérases A (Aldridge 1953a, b, 1993). En dehors de ce classement général, d'autres nomenclatures sont employées pour décrire les estérases dans une espèce ou un groupe

d'espèces proches. Chez *Culex* par exemple, la nomenclature est basée sur leur capacité d'hydrolyse de certains substrats. Les estérases capables d'hydrolyser le substrat synthétique α -naphyl-acétate sont appelées α -estérases ($Est\alpha$) (et non estérases A pour éviter la confusion avec la classification de Aldrige) tandis que les β -estérases ($Est\beta$) hydrolysent le β -naphtyl acétate. Pour compléter cette nomenclature, un paramètre numérique (paramètre historique) différencie les estérases ($Est\alpha 1$, $Est\alpha 2$, etc...). Chez *An. gambiae*, *D. melanogaster*, et *Ae. aegypti* 51, 36 et 49 carboxylestérases potentielles ont été respectivement identifiées (Ranson et al. 2002, Strode et al. 2008).

Deux facteurs au niveau du génome peuvent agir sur la quantité finale de carboxylestérases. **L'amplification de gène(s)** est une modification génomique spontanée pouvant augmenter le nombre de copies d'un ou plusieurs gènes (Hemingway 2000). Les éléments transposables (fragments d'ADN mobiles dans le génome) peuvent contribuer à la duplication et à l'amplification de gènes car ils sont eux-mêmes la cible d'événements de recombinaison (Watson et al. 1992). La **sur-régulation** est également un changement génomique qui augmente la production d'une enzyme ou protéine sans qu'il y ait augmentation du nombre de copies du gène.

La **surexpression** des estérases $Est\alpha 2^1$ et $Est\beta 2^1$ est responsable de 90% des résistances aux OPs chez des souches de *C. quinquefasciatus* (Mouches et al. 1986, Vaughan et al. 1995, Hemingway et Karunaratne 1998). Des niveaux plus importants de ces enzymes liés à l'amplification de gènes ont aussi été observés dans plusieurs populations de *Culex* résistantes aux insecticides (Karunaratne et al. 1993, Jayawardena et al. 1994, Vaughan et al. 1997, Small et Hemingway 2000). Une sur-régulation des gènes codant pour les carboxylestérases peut également être à l'origine de leur surexpression. Dans une souche résistante de *Culex*, ces deux gènes sont sur le même amplicon séparés par une séquence intergénique de 2.7kb (Hemingway et al. 1998). Des mesures d'activité de la luciférase ont montré que cette région intergénique était transcriptionnellement plus active que chez la souche sensible (Hawkes et Hemingway 2002).

Enfin, la modification de la séquence protéique des carboxylestérases suite à des mutations de leurs séquences codantes peut également entraîner des résistances aux OPs et/ou au malathion (Carbamate) (Whyard et al. 1995, Campbell et al. 1998, Claudianos et al. 1999, Wondji et al. 2009). Ainsi, une étude a pu mettre en évidence une amplification des niveaux

d'estérase couplée à une altération de leur séquence protéique chez une souche de *Culex tarsalis* (Ziegler et al. 1987).

3-3/ Glutathion S-transférases (GSTs)

Les **Glutathion S-transférases (GSTs)** représentent une large famille d'enzymes **multifonctionnelles** impliquées dans la **détoxication** d'un grand nombre de xénobiotiques ainsi que dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Salinas et Wong 1999).

- Nomenclature des GSTs

Les GSTs existent sous formes cytosoliques (forme majoritaire) et microsomales. Initialement regroupées en trois classes (I, II et III), les récentes annotations de génomes d'insectes ont révélé une diversité importante de ces enzymes. Aujourd'hui, une nomenclature similaire à celle des GSTs de mammifères est utilisée et des alignements de séquences de GSTs d'insectes et de mammifères ont permis d'identifier les GSTs d'insectes. Par exemple, les anciennes classes d'insectes I et III sont donc devenues les classes Delta et Epsilon. Le nom de chaque gène codant pour une GST est composé tout d'abord des initiales de l'espèce suivies de l'acronyme GST puis d'une lettre capitale désignant la classe et d'un chiffre individuel propre au gène (Enayati et al. 2005). Par exemple *AgGSTD1*, désigne le gène codant pour la GST 1 de la classe Delta chez *An. gambiae*. Les récentes annotations de génomes ont montré

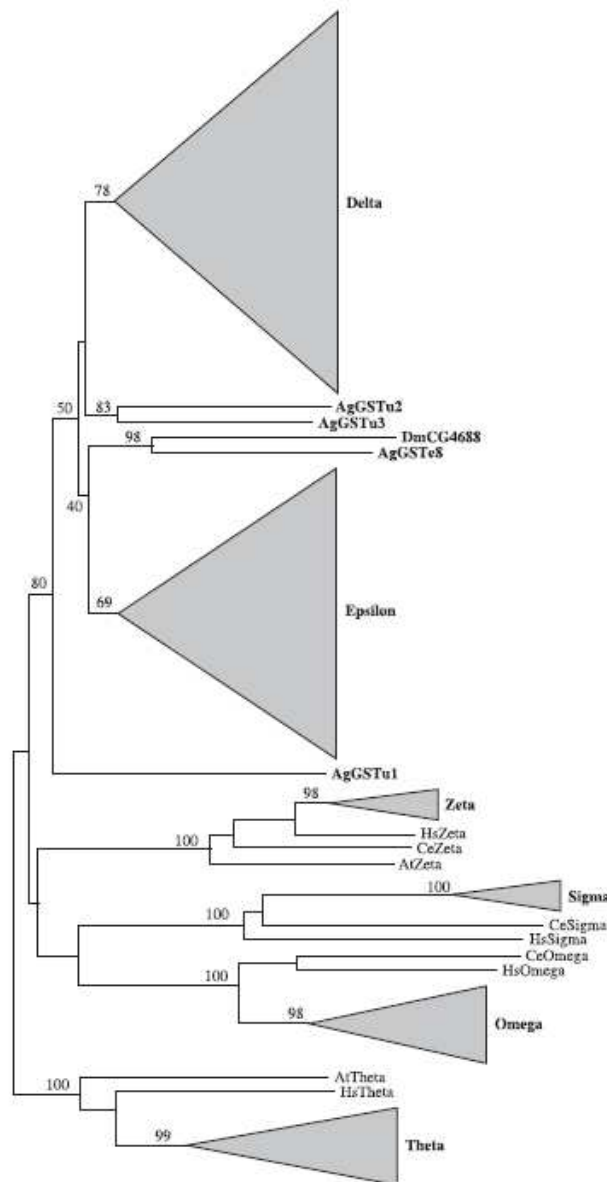


Figure 10 : Classification des GSTs de *Drosophila melanogaster* et *Anopheles gambiae* en fonction de leurs séquences protéiques (par méthode de neighbour joining). Elles ont également été alignées avec des GSTs de mammifères, plantes et nématodes par clustalW pour identifier les familles (Enayati et al. 2005).

l'existence de 37, 28, et 26 GSTs chez *D. melanogaster*, *An. gambiae* et *Ae. aegypti* (Strode et al. 2008) avec une plus grande proportion de GST delta et epsilon (Figure 10).

- GSTs et résistances aux pesticides

Les GSTs sont des enzymes de phase II qui conjuguent des composés électrophiles comme certains métabolites primaires de xénobiotiques (HAPs, pesticides, médicaments, etc.) mais aussi des formes réactives endogènes (époxydes, hydroperoxydes organiques), avec le groupement thiol du glutathion (GSH) réduit. Cette conjugaison aboutit à des composés plus hydrophiles, donc plus facilement excrétables par l'organisme (Habig et al. 1974). Certaines GSTs ont été montrées capables de catalyser la déhydrochlorination du DDT en son métabolite secondaire DDE en utilisant le GSH comme cofacteur plutôt que comme groupement conjugué (Clark et Shamaan 1984, Ranson et al. 2001). Elles sont également impliquées dans le transport intracellulaire de composés endogènes lipophiles, la fixation sur les xénobiotiques et la séquestration (Enayati et al. 2005). Une augmentation des niveaux de GST peut être responsable de la résistance d'insectes aux OPs (Huang et al. 1998), organochlorés (Prapanthadara et al. 1993, Ranson et al. 2001) et pyréthriinoïdes (Vontas et al. 2001, Vontas et al. 2002). L'amplification de gènes codant pour des GSTs peut expliquer ces niveaux plus élevés. C'est le cas chez *M. domestica* où le gène *MdGSTD3* est impliqué dans sa résistance aux organophosphorés par conjugaison (Syvanen et al. 1996) et chez *Nilaparvata lugens* où *NI GSTD1*, confère la résistance aux pyréthriinoïdes (Vontas et al. 2001, Vontas et al. 2002). Les GSTs ne semblent pas capables de métaboliser directement les pyréthriinoïdes, contrairement au DDT et OPs, mais seraient plutôt impliqués dans leur séquestration et/ou la détoxification des produits de peroxydation des lipides induits par l'insecticide (Kostaropoulos et al. 2001)

Chez *An. gambiae*, *AgGSTE2* a été trouvée sur-exprimée chez la souche résistante au DDT ZAN/U. Des études de métabolisation in-vitro chez *E. coli* ont montré une activité DDTase (DDT dehydrochlorinase) très importante de cette enzyme (Ranson et al. 2001, Ortelli et al. 2003). Chez une souche d'*Ae. aegypti* (PMD-R) résistante à la perméthrine et au DDT, *AaGSTE2*, orthologue à *AgGSTE2*, est aussi retrouvée sur-transcrite. L'expression hétérologue de l'enzyme recombinante *AaGSTE2* a montré des activités DDTase et glutathion peroxydase (Lumjuan et al. 2005). Dans ce dernier exemple, une sur-régulation est à l'origine des niveaux plus élevés de GSTs.

- Régulation de l'expression des GSTs

Chez les mammifères, plusieurs GSTs sont différentiellement régulées en réponse à des facteurs environnementaux ou en fonction des tissus et stades de développement. Ces patrons de régulation sont également retrouvés chez les insectes.

Au cours des différents stades de développement des moustiques, des mesures d'activités globales de GSTs ont montré des variations importantes. Leurs concentrations augmentent au fur et mesure des stades larvaires pour atteindre un pic maximal au stade nymphal suivi d'un déclin durant le stade adulte. De plus, l'expression tissulaire est également fortement variable. Certaines GSTs sont surexprimées dans les corps gras et l'intestin des insectes, tissus connus pour leurs rôles importants dans la détoxification des xénobiotiques (Enayati et al. 2005).

Une étude récente a montré l'induction de DmGSTD2 suite à l'exposition de drosophiles au phénobarbital (Le Goff et al. 2006). Ce caractère inductible des GST a également été observé après exposition à des pesticides chez *D. melanogaster* et *Bombyx mori* (Willoughby et al. 2006, Willoughby et al. 2007, Gui et al. 2009). Enfin, certaines GSTs semblent également induites par un stress oxydatif, confortant ainsi leur rôle de protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène (Ding et al. 2005).

IV/ Environnement et contaminants

1/ Un peu d'histoire et quelques chiffres

La révolution industrielle du XIXème siècle a marqué le passage d'une société à dominante agraire et artisanale à une société commerciale et industrielle. Avec elle se sont développées de façon massive de nouvelles formes de pollution. L'utilisation importante et croissante du combustible charbon a été la première forme de pollution visible. Cette pollution s'est accentuée avec le développement de l'industrie chimique notamment pendant les deux premières guerres mondiales. Depuis les années 1950, l'industrie chimique répond à une **demande vitale et économique** : celle de protéger l'homme et ses ressources contre les

nuisibles. En effet, au cours de ces années, jusqu'à 34% de la production de nourriture et de bois fut perdue à cause des nuisibles aux Etats-Unis (Brown 1978). Au niveau sanitaire, l'homme devait faire face aux maladies transmises par les insectes comme le paludisme, causant plus de 3 millions de morts par an. Grâce aux progrès de la chimie organique, de nombreuses molécules sont progressivement venues s'ajouter aux catalogues des **pesticides**. Le terme pesticide définit « toutes les substances actives et préparations utiles pour repousser ou détruire les nuisibles ». Ce terme englobe les produits phytosanitaires, mais également les produits à usage vétérinaire et sanitaire. En juin 1995, la France recensait 912 substances actives contenues dans 8883 spécialités homologuées, pour plus de 2600 usages différents (Ballant 2006). Chaque année en France, plus de 75000 tonnes de pesticides sont ainsi consommées en moyenne (Figure 11), la plaçant au quatrième rang mondial des pays consommateurs de pesticides (derrière les États-Unis, le Brésil et le Japon) et au premier rang européen (source Union des industries de la protection des plantes).

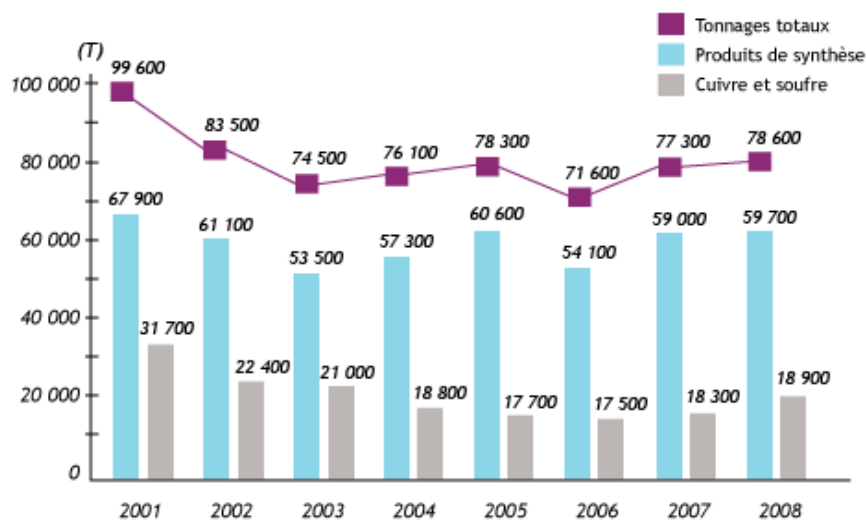


Figure 11 : Consommation annuelle de pesticides en France (D'après L'union des industries de la protection des plantes)

Les pesticides ne constituent qu'une partie des produits chimiques produits mondialement. En France, les engrais et composés phytosanitaires ne constituent que 12% de la quantité totale de produits chimiques (source Union des industries chimiques). L'industrie chimique fournit de nombreux domaines tels que l'automobile, le textile, la pharmaceutique, l'imprimerie, la papeterie, la métallurgie etc. Les composés chimiques organiques sont, dans nos sociétés, la source de contamination de l'environnement la plus courante mais aussi la plus complexe. Ils représentent des milliers de molécules différentes retrouvées dans tous les compartiments de l'écosystème : Sol, eau, air, mais aussi au sein de la biocénose. Leurs

concentrations dans les milieux sont le plus souvent faibles mais leur présence chronique, même à des niveaux de contamination sublétaux, représente un potentiel toxique pour les individus, les populations, les communautés et pour l'équilibre général de l'écosystème (Ramade 2007).

2/ Milieux aquatiques : un cocktail explosif.

L'eau est le premier solvant sur Terre. Une grande majorité des composés rejetés par les activités humaines dans l'environnement se retrouvent donc dans les milieux aquatiques. Ces composés sont des pesticides (organochlorés mais aussi phénylpyrazoles tels que le fipronil), des HAPs, PCBs et des métaux lourds. Par exemple, les HAPs rencontrés dans l'environnement peuvent être d'origine naturelle (activités volcaniques, feux de forêts, etc...) ou bien d'origine anthropique suite à la combustion incomplète de combustibles fossiles tels que le secteur transport, la production d'énergie, les traitements de déchets (usines incinératrices). Ils peuvent être très toxiques et présenter des propriétés cancérigènes. Le benzo[a]pyrène, le dibenzo[a,h]anthracène, et le benzo[b]fluoranthène font partie des 20 substances les plus dangereuses classées par l'« Agency for Toxic Substances and Disease » américaine (ATSD). Ce sont des polluants ubiquistes détectés dans l'atmosphère, les sols, les eaux et les sédiments (Fouchecourt et Riviere 1996). Il semble, à l'heure actuelle, que la contamination prolongée des animaux aquatiques par les HAPs soit à mettre en relation avec l'adsorption des HAPs sur les sédiments (Narbonne et al. 1999). Par exemple, dans la Seine, des concentrations jusqu'à 687 ng/l et 14 µg/g de HAP ont été enregistrées (Fernandes et al. 1997).

Les insecticides sont souvent également retrouvés dans les milieux aquatiques à des doses élevées. Aussi, leur concentration dans l'environnement a été montrée inversement corrélée à la taille du milieu aquatique. En effet, dans un rapport regroupant plus de 60 études, il a été montré que sur 133 prélèvements d'eau différents, 19 montraient des concentrations supérieures à 10µg/L (pour un seul insecticide). Ces 19 prélèvements ont été mesurés dans des milieux aquatiques <100 km² et pour 1/3 d'entre eux dans des zones <10 km² (Schulz 2004). De plus, certains composés aujourd'hui interdits depuis de nombreuses années sont encore bioaccumulés (la bioaccumulation est la capacité d'un composé à se concentrer dans les organismes, notamment dans les graisses) à des concentrations très élevées dans des organismes situés dans des zones protégées. En Camargue, plusieurs études réalisées dans l'étang de Vaccarès qui est une zone protégée, ont montré que de nombreux

composés organochlorés tels que le DDE, lindane, endosulfan mais aussi des PCBs sont bioaccumulés à des taux élevés dans l'anguille *Anguilla anguilla* et dans l'ensemble du réseau trophique (Ribeiro et al. 2005, Roche et al. 2009).

En conclusion, les gîtes larvaires de moustiques sont variés (Partie I-2/) et sont susceptibles d'être contaminés par divers polluants. Une étude a montré par exemple que certains gîtes d'*Aedes* et *Anopheles* pouvaient contenir des concentrations supérieures à 1mg/L de plomb et de cuivre. (Mireji et al. 2008). En raison de leurs modes de vie et d'alimentation, les larves de moustiques dans leur environnement, sont susceptibles d'être exposées à des polluants d'origines diverses pouvant entraîner des réponses très variés sur leur biologie.

V/ Contexte et objectifs de la thèse

1/ Contexte de l'étude et hypothèses de travail

Les **moustiques** génèrent une nuisance importante et sont notamment contrôlés grâce à des traitements insecticides. Aujourd'hui, les gîtes où se développent leurs larves sont souvent **pollués par des xénobiotiques** d'origine anthropique (HAPs, PCBs, pesticides etc. ...). Jusqu'à présent, l'impact de ces xénobiotiques sur la capacité des larves de moustiques à résister aux insecticides chimiques reste méconnu. Cette thèse vise à étudier la réponse des larves de moustiques aux xénobiotiques environnementaux d'origine anthropique et leur impact sur les mécanismes de résistance aux insecticides chimiques. **L'impact des xénobiotiques environnementaux sur la résistance des moustiques aux insecticides** est abordé à travers deux hypothèses (Figure 12):

1) A court terme, l'exposition des larves de moustiques à certains xénobiotiques environnementaux peut modifier leur tolérance aux insecticides par l'intermédiaire d'une modification de l'expression de certains gènes de détoxification (accommodation). Autrement dit, l'induction par certains xénobiotiques d'enzymes de détoxification capables de métaboliser un (ou des) insecticide(s) peut augmenter leur tolérance vis-à-vis des insecticides. Cette première hypothèse sera traitée dans le **Chapitre II**.

2) A plus long terme, l'exposition des larves de moustiques à certains xénobiotiques environnementaux peut influencer la sélection des mécanismes de résistance aux insecticides. Ainsi, l'exposition récurrente des larves de moustiques à certains xénobiotiques environnementaux favorise-t-elle ou retarde-t-elle l'apparition de la résistance ? L'induction par certains xénobiotiques environnementaux d'enzymes de détoxification capables de métaboliser un insecticide favorise-t-elle leur sélection et par conséquent l'apparition de la résistance métabolique ? Cette seconde hypothèse sera traitée dans le **Chapitre III** en **combinant l'exposition des larves à certains xénobiotiques et leur sélection** avec des insecticides chimiques.

En parallèle de ces études sur le court et long terme, des expérimentations par ARN interférant ont été menées pour rechercher l'importance des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des insecticides. Elles seront discutées dans le **chapitre IV**.

D'une manière générale, cette thèse devrait permettre de mieux comprendre les **interactions gènes-environnement** chez les moustiques pour une meilleure compréhension des mécanismes de résistances aux insecticides en rapport avec l'environnement chimique. L'application principale de cette étude concerne l'optimisation des traitements insecticides utilisés en démoustication, mais elle présente également un intérêt fondamental pour la compréhension des mécanismes moléculaires associés à la résistance.

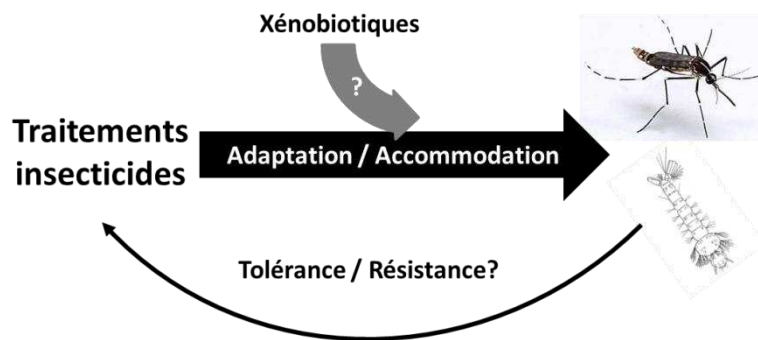


Figure 12 : Problématique de l'étude : Quel est l'impact de l'homme en raison de ses rejets dans l'environnement sur la biologie du moustique, que ce soit sur le court terme (Tolérance) ou le long terme (Résistance) ? Et quels sont les mécanismes impliqués ?

2/ Modèle biologique utilisé

Le principal modèle animal utilisé au cours de cette thèse est le moustique *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1862) (Figure 13). Il figure parmi les moustiques ayant le plus fort impact sanitaire à cause des maladies qu'il transmet, de la grande diversité d'habitats qu'il peut coloniser et de sa proximité avec l'homme (Lounibos 2002). Il est vecteur de la dengue, de la fièvre jaune et du chikungunya (Chhabra et al. 2008). Près de 40% de la population mondiale est exposée à la dengue et plus de 50 000 personnes sont infectées par an (Liu et al. 2004, Malavige et al. 2004). Le virus de la fièvre jaune quant à lui touche plus de 200 000 personnes par an (OMS).

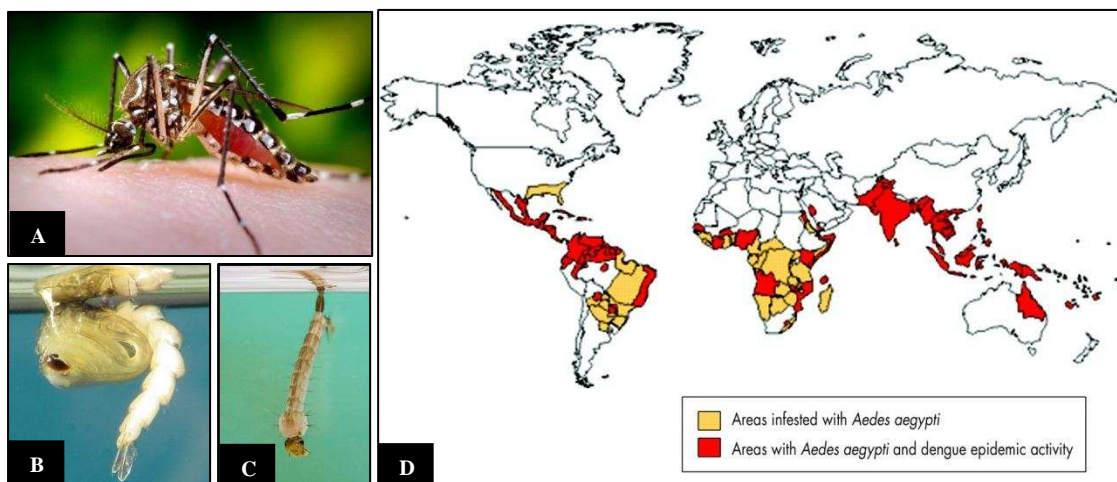


Figure 13 : *Aedes aegypti* au stade adulte femelle (A), nymphale (B), larvaire (C) ainsi que sa carte de répartition et les zones touchées par la dengue (d'après Malavige et al., 2004).

En plus de son fort impact sanitaire, cette espèce s'élève très facilement au laboratoire. La souche de laboratoire Bora-Bora originaire de Polynésie française est une souche sensible aux insecticides ne présentant aucun mécanisme de résistance. Elle est maintenue en conditions standardisées au laboratoire à une température de 27°C, une hygrométrie de 70-80% et un cycle jour/nuit de 16h/8h. La capacité de dessiccation des œufs permet leur conservation pendant plusieurs mois. Dans ces conditions, le cycle de vie complet du moustique est de 3 semaines environ (Figure 1). Ces caractéristiques (facilité d'élevage, temps de génération court, stockage des œufs) en font un modèle de choix pour le présent travail, notamment pour les expérimentations de sélection au laboratoire. Des souris sont utilisées hebdomadairement pour le repas de sang des femelles accouplées et des papiers imprégnés de miel constituent la nourriture sucrée des adultes. Quant aux larves détritivores, elles sont nourries tout au long de leur développement avec des croquettes pour lapin essentiellement constituées de foin compacté.

L'autre intérêt majeur de cet organisme réside dans son **génom**e entièrement **sé**quencé (Nene et al. 2007), permettant d'aborder ce travail au niveau des gènes et d'utiliser les techniques de pointe de la biologie moléculaire.

3/ Approche expérimentale

Pour répondre aux hypothèses énoncées plus haut, deux grandes approches combinant toxicologie, biochimie, transcriptomique et validation fonctionnelle ont été menées en parallèle. L'impact des xénobiotiques sur la biologie des larves de moustique a été étudié sur le **court terme** d'une part et d'autre part sur le **long terme** (Figure 14). Premièrement, l'effet à court terme des polluants sur la tolérance des moustiques aux insecticides a été étudié en exposant des larves d'*Ae. aegypti* à différents xénobiotiques puis en réalisant des expérimentations toxicologiques, biochimiques, puis enfin transcriptomiques. Les xénobiotiques entraînant une amélioration de la tolérance des larves de moustiques aux insecticides ont été ensuite utilisés pour l'étude de l'impact à long terme des xénobiotiques sur la résistance des moustiques aux insecticides. Les profils transcriptionnels des gènes candidats dégagés au cours de la première étude ont été étudiés de manière plus approfondie afin de déterminer quels gènes sont les meilleurs candidats potentiellement impliqués dans le métabolisme des insecticides. Enfin, une dernière partie de cette thèse a consisté à mettre au point une méthode d'ARN interférant sur larves de moustiques afin d'éteindre spécifiquement l'expression d'un gène et d'apprécier ensuite par des bioessais si ce gène est impliqué dans

l'augmentation de tolérance des larves à certains insecticides chimiques. La complexité de la thématique et les difficultés d'étude des phénomènes impliqués nous ont conduits à réaliser nos expérimentations majoritairement en laboratoire. Une collaboration avec le laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN) de l'Institut pour la Recherche et le Développement (IRD) nous a également permis de travailler sur des souches et populations naturelles d'*Aedes aegypti* de la Martinique, où la résistance des moustiques aux insecticides chimiques est préoccupante (Rosine 1999, Etienne 2006) et où la contamination de l'environnement par des polluants d'origine anthropique est avérée (Bocquene et Franco 2005). Cette thèse a constitué l'un des axes majeurs du projet ANR mosquito-Env depuis 2008.

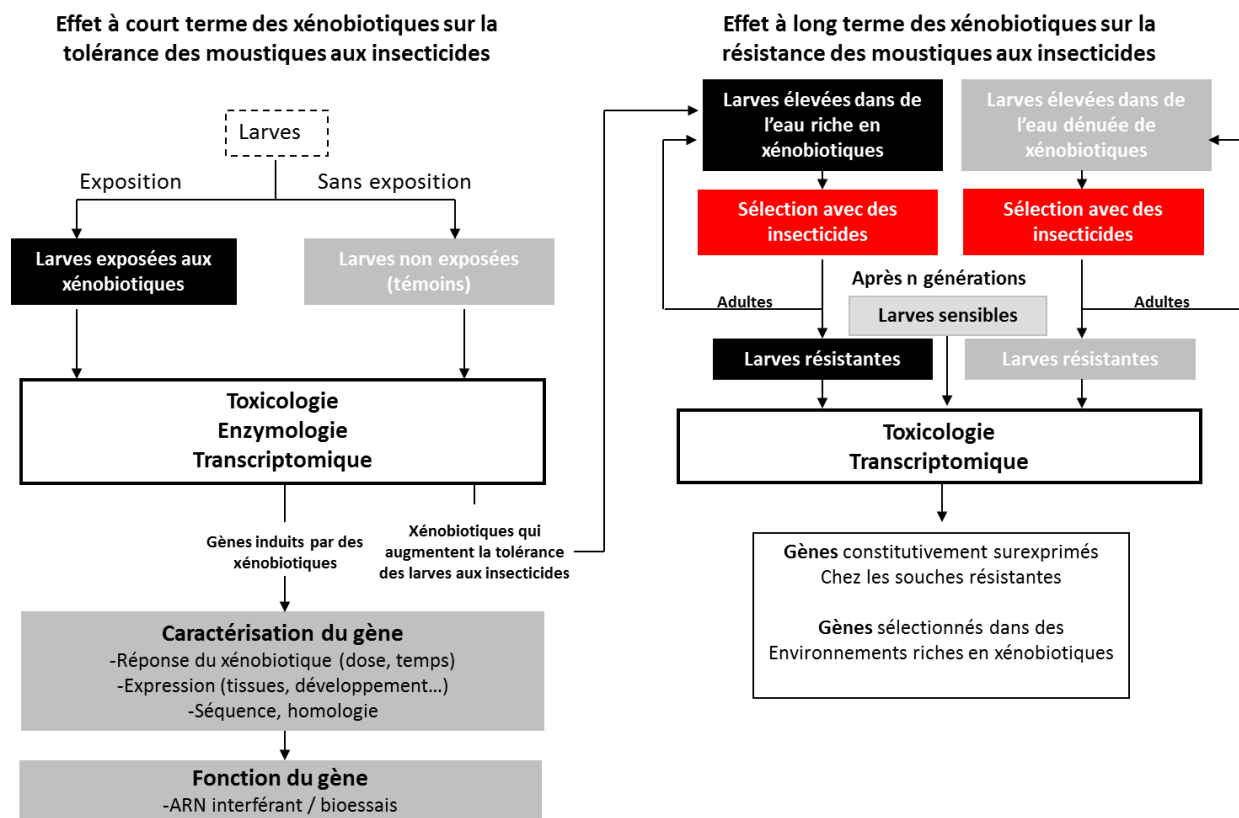


Figure 14 : Approche expérimentale utilisée pour l'étude de l'impact des xénobiotiques sur l'émergence de résistances aux insecticides chez les moustiques.

Chapitre II : Impact à court terme des polluants sur la réponse des moustiques aux insecticides

Dans leurs gîtes naturels, les larves de moustiques sont potentiellement en contact avec de nombreux composés chimiques naturels (xanthotoxines, polyphénols) ou d'origine anthropique (pesticides, médicaments, métaux lourds, HAPs). Dans ce chapitre, l'impact à court terme de ces xénobiotiques a été abordé à différents niveaux d'intégration biologique allant du phénotype au gène (Figure 14, chapitre I). Dans les deux premières études (**Publications I et II**), nous avons étudié l'impact de ces composés sur la tolérance des larves de moustiques à différents insecticides chimiques. Les différences de tolérance observées après exposition des larves de moustiques aux xénobiotiques ont ensuite été reliées aux activités enzymatiques globales de trois grandes familles d'enzymes de détoxification : les CYPs, GSTs et CCEs. Plus précisément, grâce à une approche de criblage par puces à ADN, nous avons pu identifier les gènes de détoxification qui répondent à l'exposition aux polluants chez les larves. En parallèle, une autre approche de criblage plus globale par séquençage sur plateforme Solexa a permis d'identifier d'autres gènes répondant aux polluants (**publication III**). Le rôle potentiel de certains CYPs a été ensuite approfondi par une étude de leurs profils transcriptionnels durant les différents stades de développement et tissus larvaires (**Publication IV**).

En parallèle de ces études, l'impact de l'exposition larvaire à des xénobiotiques sur la tolérance des moustiques adultes aux insecticides a également été abordé de manière préliminaire.

D'une manière globale, cette première partie a permis de mettre en évidence que l'exposition des larves de moustiques à certains xénobiotiques peut modifier la tolérance des larves et adultes aux insecticides chimiques. Elle a également montré l'impact de ces composés chimiques sur la transcription de nombreux gènes dont certains codant pour des enzymes de détoxification. Enfin, plusieurs gènes candidats impliqués dans la réponse des larves à l'exposition aux xénobiotiques et potentiellement impliqués dans la métabolisation des insecticides chimiques ont pu être dégagés.

Liste des publications pour le chapitre II :

Publication I: Poupardin, R., S. Reynaud, C. Strode, H. Ranson, J. Vontas, and J. P. David.

2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **38**:540-551.7

Apport personnel : Design expérimental, expérimentations, interprétation des résultats et écriture du manuscrit.

Publication II: Riaz, M. A., R. Poupardin, S. Reynaud, C. Strode, H. Ranson, and J. P.

David. 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.

Apport personnel : Expérimentations par puces à ADN et analyses statistiques des résultats.

Publication III: David, J. P., E. Coissac, C. Melodelima, R. Poupardin, M. A. Riaz, A.

Chandor-Proust, and S. Reynaud. 2010. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* **11**:216.

Apport personnel : Préparation des échantillons et participation à l'écriture du manuscrit.

Publication IV: Poupardin, R., M. A. Riaz, J. Vontas, J. P. David, and S. Reynaud. 2010.

Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **19**:185-193.

Apport personnel : Design expérimental, expérimentations, interprétation des résultats et écriture du manuscrit.

I/ Impact des xénobiotiques sur la tolérance des moustiques aux insecticides

1/ Impact d'une exposition larvaire aux xénobiotiques sur leur tolérance aux insecticides chimiques (Publications I et II)

1-1/ Choix des xénobiotiques et pré-exposition des larves de moustiques

L'ensemble des protocoles d'exposition des larves de moustiques aux xénobiotiques ont été standardisés afin de minimiser la variabilité observée dans les expérimentations qui en découlent. Des lots de 100 (Publication II) ou 200 larves (Publication I) homogènes sont séparés dans des cristallisoirs contenant 200 ml d'eau avec ou sans xénobiotique ainsi que 50 mg de nourriture (Figure 15). Chaque exposition est réalisée en triplicats et le temps d'exposition est de 24 heures (Publication I) ou 72 heures (Publication II).

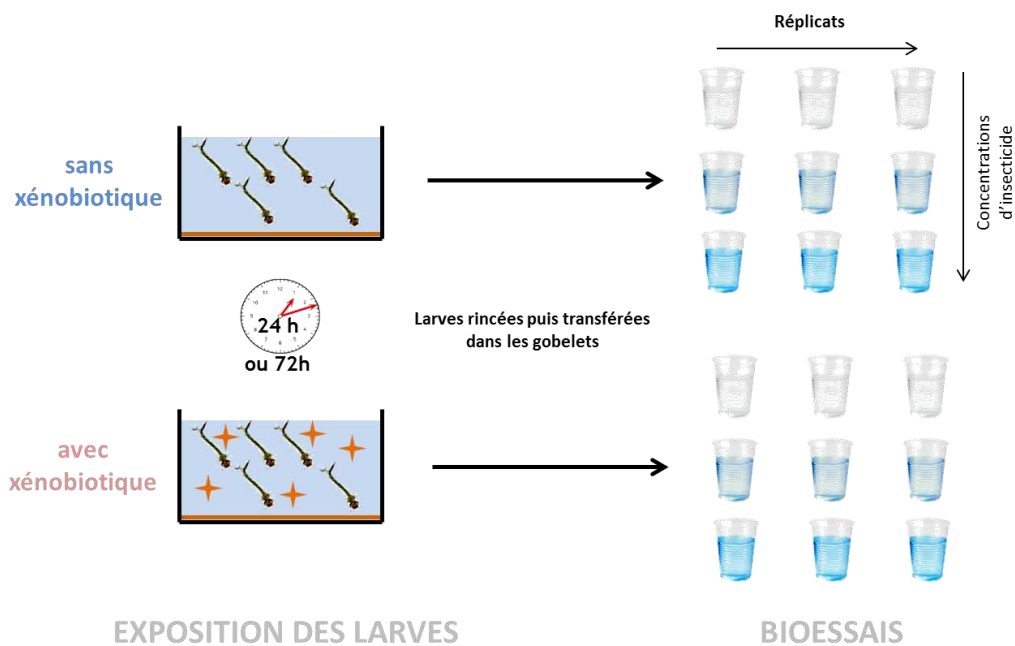
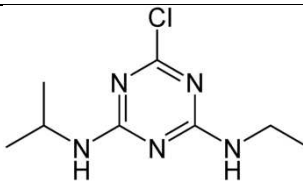
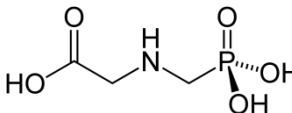
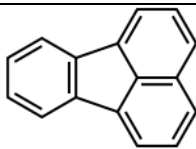
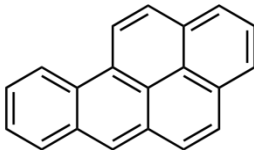
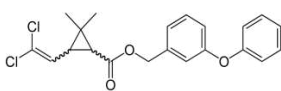
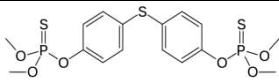
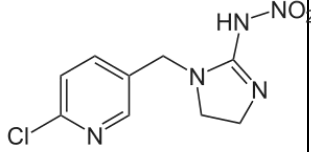
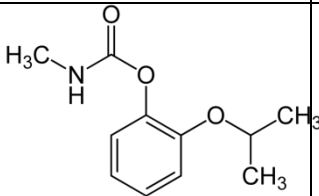


Figure 15 : Protocole d'exposition des larves et bioessais.

Différents xénobiotiques tels que des pesticides (herbicides, insecticides), métaux lourds et HAPs ont été utilisés pour les expositions et/ou les bioessais sur larves. Tous les produits utilisés pour les pré-expositions et/ou les bioessais dans les deux études ont été rassemblés dans le Tableau 1. Afin d'éviter de sélectionner certains génotypes durant la phase d'exposition aux xénobiotiques, des doses sub-létales de xénobiotiques (entraînant une mortalité inférieure à 5%) ont été utilisées pour toutes les expositions larvaires.

Tableau 1: Liste des xénobiotiques utilisés pour les expositions et bioessais.

Type	Nom (Publications)	Formule chimique	Remarques	Expo / Bioessais
Herbicides	Atrazine (Publication I)		Famille Triazines Agit au niveau de la protéine D1 du photosystème II. Interdit depuis 2003 en France suite à la contamination des cours d'eau et nappes phréatiques.	Expo
	Glyphosate (Publication II)		Famille Amino-phosphonates Herbicide le plus utilisé mondialement, notamment sur plantes OGM. Nombreux cas de contaminations des cours d'eau et zones humides.	Expo
HAPs	Fluoranthène (Publication I)		HAP ubiquitaire et retrouvé à des concentrations parfois élevées dans les sédiments (Durand et al. 2003).	Expo
	Benzo[a]pyrène (Publication II)		HAP résultant de la combustion incomplète des combustibles fossiles (Bostrom et al. 2002) également retrouvé à de fortes concentrations dans l'environnement (Lambert and Lane 2004)	Expo
Métal/ion	Sulfate de Cuivre (Publication I)	CuSO₄	Elément majoritaire de la bouillie bordelaise, très utilisée sur la vigne et les arbres fruitiers.	Expo
Insecticides	Perméthrine (Publications I et II)		Famille des pyréthrinoïdes . Agit au niveau des canaux sodium du système nerveux. Utilisé essentiellement en tant qu'adulticide.	Expo / Bioessais
	Téméphos (Publication I)		Famille des Organophosphorés . Agit en bloquant l'acétylcholinestérase. Utilisé essentiellement en tant que larvicide.	Expo / Bioessais
	Imidaclopride (Publication II)		Famille des Néonicotinoïdes Agit en se fixant sur les récepteurs à l'acétylcholine. Insecticide récent non encore utilisé dans la démoustication.	Expo / Bioessais
	Propoxur (Publication II)		Famille des carbamates . Agit en bloquant l'acétylcholinestérase. Utilisé en tant que larvicide et adulticide.	Expo / Bioessais

1-2/ Bioessais sur larves de moustiques exposées ou non à des polluants

Les bioessais ont été réalisés sur larves exposées ou non à des polluants. Avant leur transfert dans les gobelets d'insecticides, les larves ont été rincées à l'eau (Figure 15). Les bioessais réalisés dans les deux études ont révélé que l'exposition des larves à certains xénobiotiques pouvait modifier leur tolérance aux insecticides (Table 1 dans les publications I et II). Ainsi, l'exposition de larves de moustiques à un xénobiotique en particulier peut améliorer leur tolérance à différents insecticides chimiques. Par exemple, l'exposition pendant 24 heures de larves d'*Ae. aegypti* au fluoranthène augmente de façon significative leur tolérance aux insecticides perméthrine et téméphos (Table 1, Publication I). Réciproquement, la tolérance des larves à un insecticide peut être augmentée après exposition à différents xénobiotiques (Figure 16). C'est le cas pour l'insecticide néonicotinoïde imidaclopride dont l'efficacité diminue après exposition des larves au BaP ou glyphosate (Table 1, publication II). Dans cette même étude, nous avons aussi pu montrer que cette augmentation de tolérance est dose-dépendante. Ainsi, une exposition larvaire avec une plus grande concentration de BaP ou de glyphosate entraîne une meilleure tolérance des larves à l'imidaclopride (Table 1, publication II). Cette réciprocité et complexité semblent indiquer que les interactions entre xénobiotiques et insecticides chez les larves sont sûrement d'origine métabolique et non simplement au niveau de la cible.

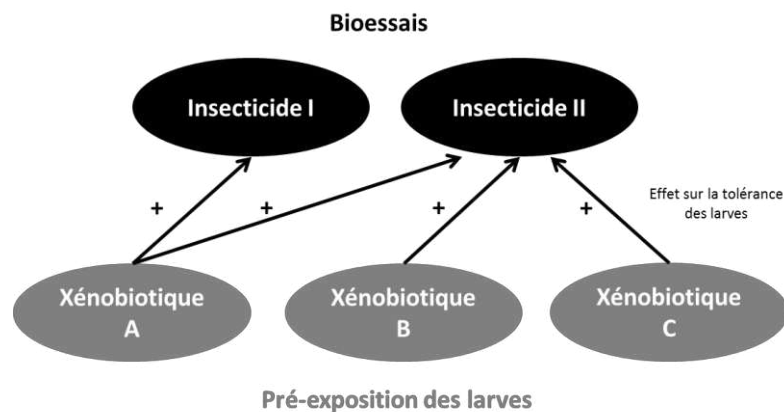


Figure 16 : Schémas d'interactions observées entre l'exposition à certains xénobiotiques et les bioessais avec différents insecticides chimiques de différentes familles.

2/ Impact d'une exposition larvaire aux xénobiotiques sur la tolérance des moustiques adultes aux insecticides.

L'impact de l'exposition prolongée de larves de moustiques à des xénobiotiques environnementaux sur la tolérance des moustiques adultes après émergence n'a encore jamais

été étudié. Nous l'avons uniquement abordé de façon préliminaire dans le cadre de cette thèse et les résultats présentés n'ont pas été publiés pour l'instant. Pour les expérimentations, deux lots de 500 larves de stades II ont été mis dans des récipients contenant 6 litres d'eau seule ou contaminée avec 100 µg/L du HAP fluoranthène et 2 grammes de nourriture. Les solutions ont été renouvelées tous les 2 jours jusqu'à émergence des adultes environ 96 heures après le début de l'exposition. Vingt-quatre heures après émergence des femelles adultes, des bioessais sur femelles adultes ont été réalisés (Figure 17). Les papiers imprégnés de perméthrine fournis par l'OMS pour détecter la résistance sur le terrain (0.75% de perméthrine) entraînant trop de mortalité sur nos moustiques sensibles, nous avons été contraints de fabriquer nos propres papiers avec des doses moins importantes d'insecticide. (Annexe 1 pour la fabrication des papiers imprégnés). Cette expérimentation a été réalisée trois fois de manière indépendante. Pour chaque expérimentation, 3 tubes contenant au moins 25 femelles ont été utilisés (329 femelles testées pour le témoin et 259 femelles testées pour le traitement au fluoranthène).

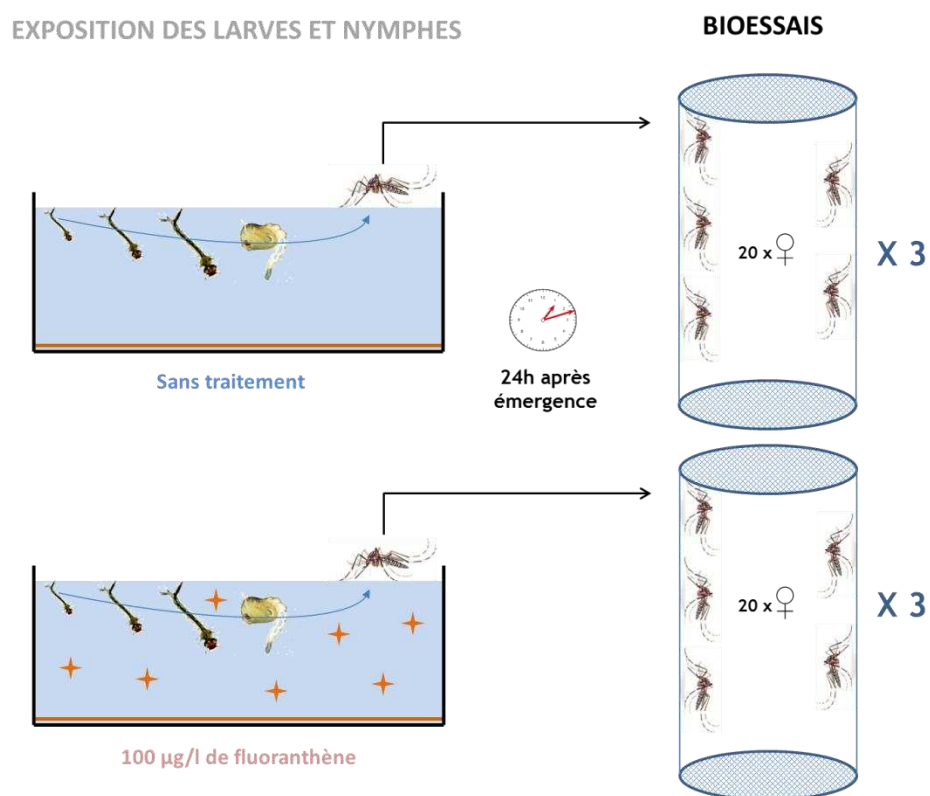


Figure 17 : Approche expérimentale utilisée pour l'exposition ou non des larves et nymphes au polluant et bioessais sur moustiques adultes.

Nos résultats montrent que l'exposition durant 96 heures de larves et de nymphes au fluoranthène peut modifier la tolérance des moustiques adultes à la perméthrine (Figure 18). Une mortalité 2,1 fois moins importante est observée chez femelles adultes exposées au fluoranthène durant leur stade larvaire comparativement au témoin. Ainsi cette étude démontre clairement que l'augmentation de la tolérance des larves aux insecticides due à l'exposition aux xénobiotiques peut être transmise au stade adulte. Ainsi, l'efficacité des larvicides chimiques mais aussi des adulticides est susceptible d'être affectée par la présence de polluants dans l'eau des gîtes larvaires. Une autre question que soulève cette expérimentation est celle de l'impact des polluants atmosphériques sur la tolérance des moustiques adultes aux traitements insecticides. Dans certaines zones fortement urbanisées, ces polluants (fumées, etc...) dégagées par les activités humaines pourraient avoir un impact non négligeable sur la réponse des moustiques adultes aux insecticides.

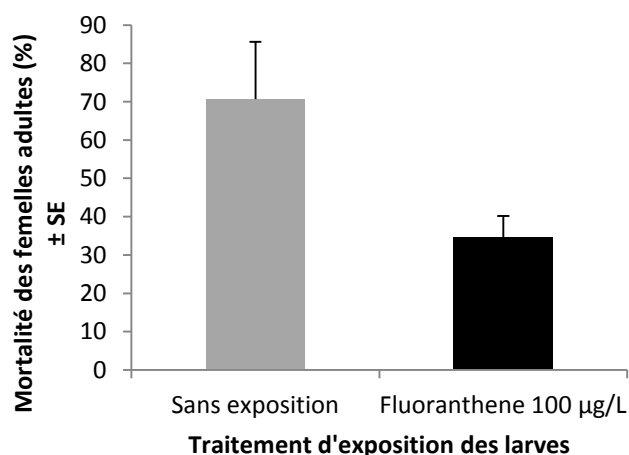


Figure 18: Impact de l'exposition de larves de moustiques au fluoranthène sur la tolérance à la perméthrine des moustiques adultes après émergence. Les expérimentations ont été refaites trois fois dans le temps. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité \pm l'erreur standard (SE).

II/ Recherche des mécanismes impliqués.

1/ Au niveau biochimique (Publications I et II)

Plusieurs études ont montré que l'exposition de larves de moustiques à des polluants pouvait augmenter leur tolérance vis-à-vis de différents insecticides et que cette tolérance accrue pouvait être liée à une augmentation des activités globales des enzymes de détoxification (Suwanchaichinda et Brattsten 2001, 2002, Boyer et al. 2006). Grâce à une approche biochimique, les activités globales des trois principales familles d'enzyme de détoxification ont été évaluées chez des larves d'*Ae. aegypti* après exposition à différents polluants (Publications I et II). Les larves de moustiques ont été exposées dans les mêmes conditions que précédemment. Les activités globales P450 ont été évaluées grâce à la mesure

de l'hydroxylation (dééthylation) de la 7-ethoxycoumarine en 7-Hydroxycoumarine, réaction catalysée par les CYPs (ECOD). La méthode fluorimétrique mise au point par Desousa (Desousa et al. 1995) et adaptée sur microplaques a été utilisée (voir publications I et II). Les activités globales GSTs ont été évaluées par la mesure spectrophotométrique de la conjugaison d'un substrat de référence, le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène), avec le glutathion (Habig et al. 1974). Enfin les activités globales des α -estérases et β -estérases ont été mesurées selon la méthode spectrophotométrique de Van Asperen (Vanasperen 1962) permettant de mesurer la production d' α -naphtol et β -naphtol à partir du α -naphtyl-acétate et β -naphtyl-acétate.

Les résultats ont révélé que certains xénobiotiques peuvent induire les activités globales des enzymes de détoxification. Les activités P450s ECOD sont induites par l'exposition des larves au cuivre, au fluoranthène, à la perméthrine (Figure 2, Publication I) et au benzo[a]pyrene (Figure 2, Publication II). Les niveaux d'inductions de CYPs importants obtenus avec les HAPs confirment leur fort potentiel inductif des CYPs. Les GSTs semblent quant à elles induites par le fluoranthène (Figure 1, Publication I), le propoxur et le benzo[a]pyrene (Figure 1, Publication II). Enfin, seul l'insecticide propoxur induit de manière significative et les α et β -estérases (Figure 3, Publication II). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les **augmentations de tolérance** aux insecticides chimiques observées chez les larves de moustiques exposées aux xénobiotiques pourraient être liées à **l'induction d'enzymes de détoxification**, notamment les CYPs et GSTs.

2/ Au niveau transcriptomique (Publications I, II et III)

Les expérimentations précédentes ont permis de mettre en évidence une augmentation de tolérance des larves de moustiques corrélée à une induction des activités globales d'enzymes de détoxification. Cependant, ces enzymes appartiennent à de grandes familles enzymatiques et les niveaux d'activités mesurées ne correspondent qu'à une moyenne d'activités d'une partie ces enzymes. Pour identifier les enzymes particulièrement impliqués dans la réponse des larves de moustiques à l'exposition aux xénobiotiques, d'autres approches sont nécessaires. La transcriptomique est l'étude de la quantité des ARN messagers produits lors de la transcription des gènes. Plusieurs techniques existent pour quantifier les ARN messagers. Certaines permettent de mesurer les niveaux de transcription d'un grand nombre de gènes voire même le transcriptome complet. Les puces à ADN (microarrays) ou le

séquençage systématique d'ADN complémentaires constituent en ce sens de bonnes approches de criblage global. Cependant, la précision des méthodes globales est souvent faussée par des biais expérimentaux liés à la préparation des échantillons ou bien aux méthodes de détection et d'analyse et des approches plus précises telles que la reverse transcription couplée à la PCR en temps réel (RT-qPCR) peuvent être utiles pour étudier plus finement certains gènes en particulier. De plus, les puces à ADN et les approches par séquençage massif nécessitent de connaître les séquences d'ADN complémentaire des gènes que l'on cible. Cela est possible avec *Ae. aegypti* puisque son génome est entièrement séquencé et annoté depuis 2007 (Nene et al. 2007). Dans ce contexte, nous avons utilisé l'approche puces à ADN afin d'identifier les gènes de détoxification différentiellement transcrits suite à l'exposition des larves de moustiques aux différents xénobiotiques. En parallèle, nous avons aussi utilisé une approche par séquençage haut débit permettant de s'affranchir en partie des biais d'annotation du génome et de quantifier l'expression des gènes par comptage de séquences d'ADNc (« digital expression profiling »).

2-1/ Approche par puces à ADN (Publications I et II)

Les puces à ADN sont basées sur l'hybridation compétitive d'ADNc ou d'ARN marqués avec un fluorophore sur une lame de verre sur laquelle sont fixées des sondes ADN ou ARN complémentaires des ADNc/ARN que l'on cherche à quantifier (Figure 19).

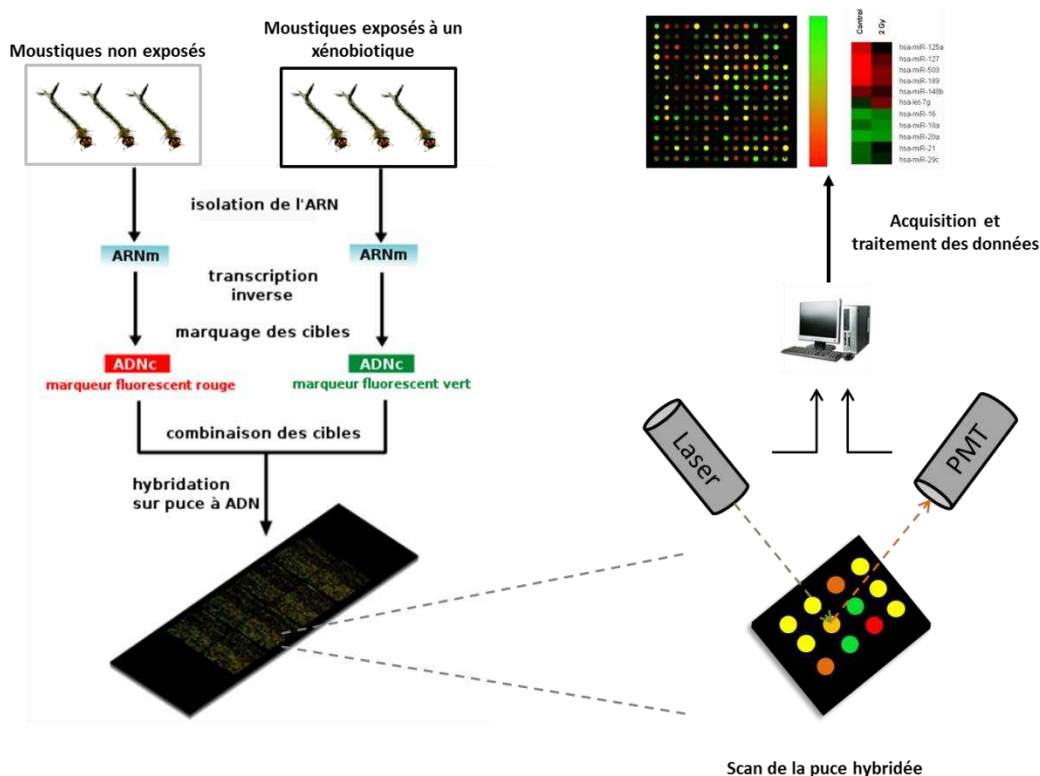


Figure 19 : Principe général du fonctionnement des puces à ADN (exemple d'hybridation avec deux fluorophores)

Pour nos expérimentations (Publications I et II), nous avons utilisé la puce « *Aedes detox chip* » développée à l'école de médecine tropicale de Liverpool (Royaume Uni) contenant l'ensemble des gènes codant pour les trois grandes familles enzymatiques CYPs, GSTs et CCEs. Pour la deuxième étude (Publication II), d'autres gènes codant pour des enzymes impliqués dans le stress oxydatif ont aussi été ajoutés à cette puce à ADN.

Les résultats de ces deux études montrent que l'exposition de larves d'*Ae. aegypti* à certains polluants peut modifier le niveau de transcription de gènes codant pour plusieurs enzymes de détoxification, majoritairement des CYPs (gènes CYPs). La majorité de ces gènes appartiennent à la famille des CYP6 (Publication I et II) ce qui confirme le rôle potentiel de cette famille de CYPs dans la résistance aux xénobiotiques (Feyereisen, 2005, Strode et al. 2008). Certains gènes CYPs, comme CYP6Z8 et CYP6N12 sont induits par plusieurs types de xénobiotiques différents (Table 2, publications I et II) tandis que d'autres, comme CYP9M8 et CYP9M9, sont induits à la fois par un xénobiotique et par un insecticide (Table 2, Publication I). D'autres gènes, codant pour des enzymes impliquées dans le stress oxydant, ont été également induits majoritairement par l'insecticide imidaclopride (Table 2, Publication II). Ces premières études ont permis de dégager plusieurs gènes candidats (majoritairement des CYPs) répondant à une exposition aux xénobiotiques et pouvant être potentiellement impliqués dans la résistance métabolique aux insecticides.

2-2/ Approche par séquençage du transcriptome (Publication III)

En 2010, une analyse globale des variations de niveaux de transcription des gènes entre larves d'*Ae. aegypti* exposées à des xénobiotiques et non exposées a été réalisée grâce à la technologie de Digital gene expression tag profiling (DGETP) faisant appel au séquençage à très haut débit Solexa (Illumina) (Publication III). Cette approche originale n'avait encore jamais été développée chez les insectes. Dans cette expérience, les conditions d'exposition des larves sont similaires aux études précédentes si ce n'est le temps d'exposition de 48 heures et des concentrations de polluants différentes. Trois polluants et trois insecticides ont été utilisés à des doses sub-létales pour cette étude : l'insecticide pyréthrianoïde perméthrine, l'insecticide carbamate propoxur, l'insecticide neonicotinoïde imidaclopride, l'herbicide atrazine, le HAP fluoranthène et le sulfate de cuivre. Après exposition des larves aux différents xénobiotiques, les ARN totaux ont été extraits de lots de 30 larves, dosés par nanodrop (ThermoFischer), contrôlés qualitativement par bioanalyser (Agilent) puis ensuite

confiés à la société Illumina (USA) pour la préparation des banques de fragments d'ADNc (tags) et séquençage sur plateforme Solexa (Figure 20).

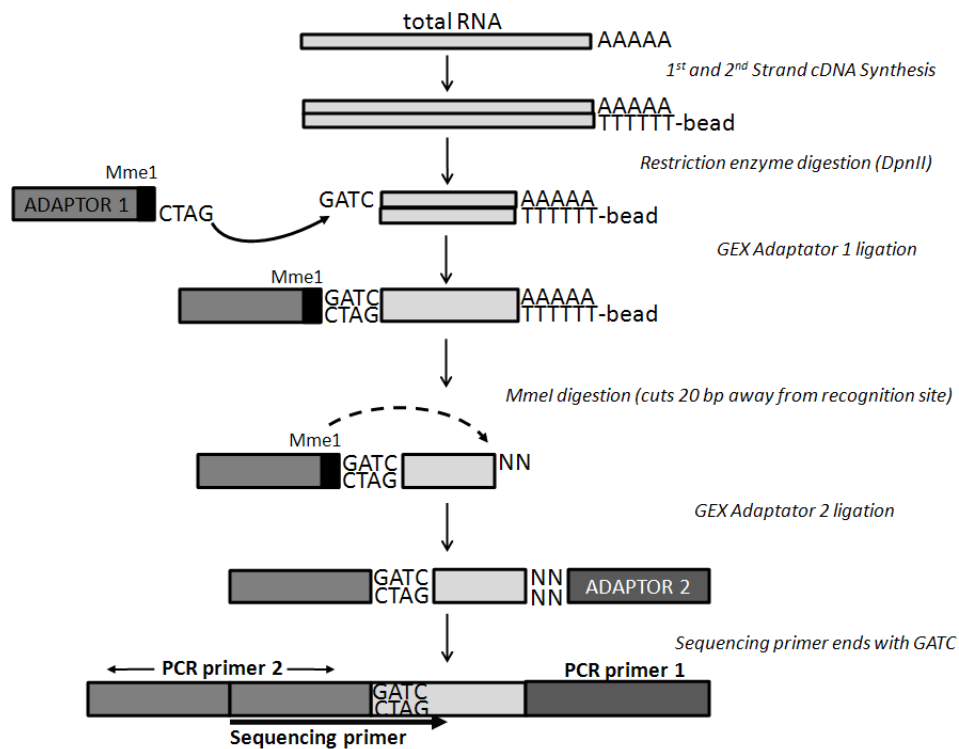


Figure 20: Principe de la méthode DGETP pour la préparation des banques d'ADNc

Pour chaque échantillon, les ARNs totaux issus de trois réplicats d'exposition indépendants ont été regroupés puis rétrotranscrits en ADN complémentaires et fixés à des billes polyT, puis digérés par l'enzyme DpnII qui reconnaît le site GATC (fréquence de coupure d'environ 300 pb). Du fait de l'utilisation de billes polyT, les fragments contenant le site de restriction DpnII et la séquence PolyA sont ensuite purifiés. Un adaptateur contenant le site de reconnaissance pour l'enzyme Mme1 est ensuite ligué à ces fragments (côté 5'). L'enzyme de restriction Mme1 possède la capacité de couper des fragments de 20 pb en aval de son site de restriction. Cette méthode (décrite dans la Publication III) permet donc d'obtenir pour chaque transcrit possédant un site DpnII, une séquence de 20 pb spécifique proche du site de polyadénylation (PolyA) et entourée de deux adaptateurs connus (tag). Après quelques cycles d'amplification par PCR, ces tags sont ensuite séquençés sur séquenceur à très haut débit « Genome Analyzer » (Illumina).

Dans notre étude, le séquençage de sept banques de tags d'ADNc (correspondant aux six expositions différentes et au témoin) a permis d'obtenir 29,45 millions de séquences (100% reads) correspondant à 726 269 tags différents (Table 1, publication III).

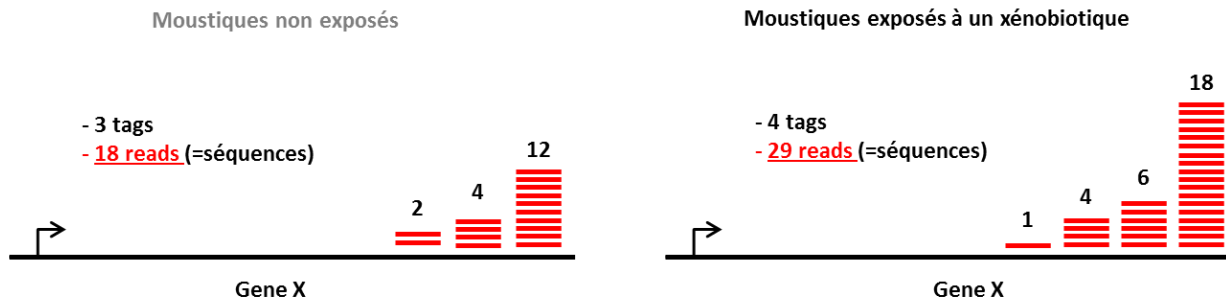


Figure 21: Principe du comptage des séquences (=reads) pour un gène

Par un travail de bioinformatique réalisé par Eric Coissac et Christelle Melodelima, ces séquences ont été localisées sur le génome d'*Ae. aegypti* (mapping) grâce au logiciel TagMatcher développé dans notre laboratoire, puis regroupées en fonction des gènes connus et régions génomiques (clustering). De manière à supprimer le bruit de fond de notre jeu de séquences, seules les tags séquencés plus de 20 fois (20 reads) sur l'ensemble des 7 échantillons ont été retenus (soit 95,5% des séquences). Ensuite, 42.7% des « reads » ont été localisées sans ambiguïté (1 seule position sans erreur) sur 6850 gènes connus d'*Ae. aegypti* (le génome contient plus de 16 000 gènes) avec un nombre moyen de 217 « reads » par gène. Le fait que la digestion initiale par l'enzyme DpnII ne soit pas toujours totale (digestion partielle, variations alléliques ...) a parfois généré plusieurs tags par transcrite avec un nombre de reads décroissant depuis la partie 3' vers la partie 5'. Ainsi, tous les « reads » des tags localisés sur le même gène (bornes des gènes selon l'annotation de génome + 300bp en aval) ont été ensuite regroupées et additionnées pour obtenir un nombre de « reads » par gène et par traitement (Figure 21). Le nombre de « reads » par gène (ou par cluster génomique hors des gènes annotés) a ensuite été utilisé pour calculer un rapport de transcription (« transcription ratio » TR) normalisé pour chaque gène entre chaque traitement et le témoin (larves non exposées). La différence statistiquement significative ou non des TRs par rapport à 1 (pas de différence de transcription) a ensuite été testée à l'aide d'un test de Fisher sur les nombres de « reads » normalisés, suivi d'une correction de tests multiples. Les TRs obtenus pour chaque gène ont ensuite été comparés entre les différents traitements (Publication III).

Les résultats de cette étude confirment que l'exposition des larves de moustiques à des doses sub-létales de divers types de xénobiotiques peut modifier le niveau de transcription de

nombreux gènes. Ainsi, plus de 450 gènes dont 115 codant pour des enzymes (Figure 3, publication III), sont différentiellement transcrits chez les larves exposées à au moins l'un des six xénobiotiques étudiés en comparaison avec les larves témoins non exposées. Ces gènes codent notamment pour des enzymes de détoxification mais aussi pour des protéines cuticulaires, des transporteurs et de nombreux gènes de réponse au stress. Cette étude souligne l'impact cryptique (pas de modification apparente du phénotype) mais réel des polluants, même à faible dose sur la biologie des moustiques. Elle met également en évidence l'implication d'autres gènes que ceux codant pour les enzymes de détoxification dans la réponse des larves de moustiques aux xénobiotiques.

3/ Caractérisation des profils transcriptionnels de gènes candidats potentiellement impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (Publication IV).

Dans les deux premières études (Publication I et II), nous avons mis en évidence que l'augmentation de tolérance des larves de moustiques aux insecticides chimiques après exposition à certains xénobiotiques pouvait être liée à une induction de certaines enzymes de détoxification, majoritairement des CYPs (publication I). Cependant, le rôle direct de ces enzymes de détoxification dans le métabolisme des xénobiotiques n'a pas encore été démontré. Pour cela, d'autres approches de validation fonctionnelle sont nécessaires.

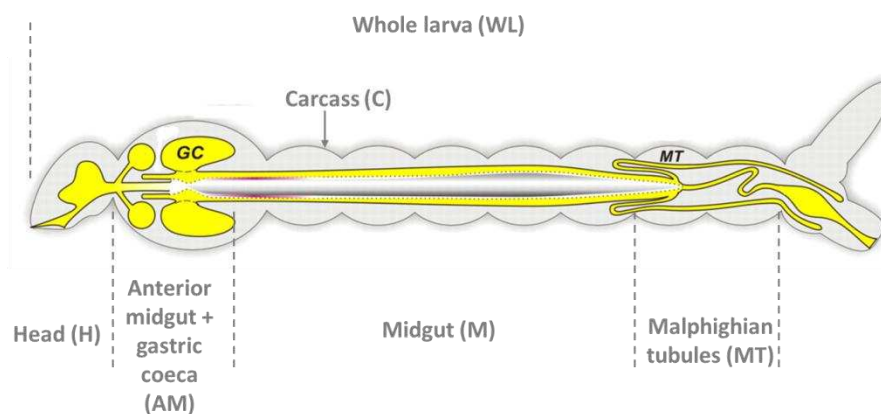


Figure 22 : Représentation schématique des différents tissus larvaires utilisés pour l'étude de la transcription tissulaire des gènes CYP.

Ces approches lourdes expérimentalement nécessitent de travailler sur un ensemble de gènes plus réduit. Afin de déterminer les meilleurs gènes candidats potentiellement impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, une étude plus approfondie de leurs profils transcriptionnels a été réalisée par reverse transcription suivie de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR, Publication IV). Pour cela, les niveaux d'expression constitutive de onze CYPs ont été mesurés au cours des différents stades de développement d'*Ae. aegypti* ainsi que dans les différents tissus larvaires (Figure 22). La capacité d'induction de ces CYPs a également été étudiée plus précisément dans le temps en utilisant des doses plus faibles de xénobiotiques que celles utilisées précédemment.

Cette étude a révélé que, parmi les 11 gènes CYP étudiés, beaucoup (surtout des CYP6s) sont préférentiellement transcrits dans des tissus fréquemment impliqués dans les mécanismes de détoxification tels que l'intestin (Midgut (M)) et les tubes de Malpighi (Malpighian tubules (MT)). Certains de ces gènes sont également inductibles par de faibles doses de xénobiotique avec un pic d'induction situé entre 48 et 72 heures après le début de l'exposition. Nous avons aussi montré que la transcription des gènes CYP étudiés est très variable selon les différents stades de développement et le sexe. Cependant, certains CYPs comme CYP9M8 et CYP6AL1 semblent préférentiellement transcrits au stade nymphal suggérant un rôle mineur dans la détoxification des xénobiotiques. De plus, la transcription de ces mêmes gènes est induite par l'exposition des larves à la 20-hydroxyecdysone, hormone impliquée dans les mues larvaires et la métamorphose. Ces gènes pourraient donc coder pour des CYPs impliquées dans le développement plutôt que dans la réponse aux xénobiotiques environnementaux. Enfin, une étude in-silico de la séquence protéique de certaines de ces enzymes a montré leur similitude avec d'autres CYPs d'insectes potentiellement impliqués dans la résistance aux insecticides. En conclusion, cette étude a permis de conforter l'hypothèse que certains CYPs sont induits par plusieurs xénobiotiques et de dégager des gènes ayant de fortes chances d'être impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques comme CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6M11 et CYP6N12.

Publication I

Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides[☆]

Rodolphe Poupardin^a, Stéphane Reynaud^a, Clare Strode^b, Hilary Ranson^b,
John Vontas^c, Jean-Philippe David^{a,*}

^aLaboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR CNRS-Université Joseph Fourier 5553, Équipe Perturbations Environnementales et Xénobiotiques, Domaine Universitaire de Saint-Martin d'Hères, 2233, rue de la piscine Bât D Biologie, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

^bVector Research Group, Liverpool School of Tropical Medicine, UK

^cLaboratory of Pesticide Science, Agricultural University of Athens, Greece

Received 24 September 2007; received in revised form 14 January 2008; accepted 19 January 2008

Abstract

The effect of exposure of *Aedes aegypti* larvae to sub-lethal doses of the pyrethroid insecticide permethrin, the organophosphate temephos, the herbicide atrazine, the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene and the heavy metal copper on their subsequent tolerance to insecticides, detoxification enzyme activities and expression of detoxification genes was investigated. Bioassays revealed a moderate increase in larval tolerance to permethrin following exposure to fluoranthene and copper while larval tolerance to temephos increased moderately after exposure to atrazine, copper and permethrin. Cytochrome P450 monooxygenases activities were induced in larvae exposed to permethrin, fluoranthene and copper while glutathione S-transferase activities were induced after exposure to fluoranthene and repressed after exposure to copper. Microarray screening of the expression patterns of all detoxification genes following exposure to each xenobiotic with the *Aedes Detox Chip* identified multiple genes induced by xenobiotics and insecticides. Further expression studies using real-time quantitative PCR confirmed the induction of multiple *CYP* genes and one carboxylesterase gene by insecticides and xenobiotics. Overall, this study reveals the potential of xenobiotics found in polluted mosquito breeding sites to affect their tolerance to insecticides, possibly through the cross-induction of particular detoxification genes. Molecular mechanisms involved and impact on mosquito control strategies are discussed.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Mosquitoes; *Aedes aegypti*; Induction; Resistance; Insecticides; Xenobiotics; Detoxification; Cytochrome P450 monooxygenases; Glutathione S-transferases; Carboxylesterases

1. Introduction

Mosquitoes transmit a wide range of human and animal pathogens, and insecticides are widely employed in their control. The efficacy of these insecticides is influenced

by the mosquitoes' history of past exposure. Long-term exposure to a toxicant will eventually select for mutations conferring a level of resistance to that toxicant and indeed, insecticide-resistant populations of mosquitoes are now threatening the success of control programmes. Extensive research efforts are aimed at elucidating the molecular basis of this resistance in order to facilitate the management of insecticide resistance in the field. Less attention has been paid to the short-term effect of exposure to insecticides or other xenobiotics on the mosquitoes' tolerance to insecticides and yet this could also have a significant impact on the efficacy of mosquito control.

[☆]The description of the microarray '*Aedes Detox Chip*' can be accessed at ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) accession no. A-MEXP-623. All experimental microarray data can be accessed at VectorBase (<http://VectorBase.org>) and ArrayExpress database accession no. E-TABM-353.

*Corresponding author. Tel.: +33 4 76 51 44 59; fax: +33 4 76 51 44 63.
E-mail address: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr (J.P. David).

For example, we have shown that *Aedes aegypti* larvae exposed to the herbicide atrazine become more tolerant to the organophosphate temephos (Boyer et al., 2006). Similarly, exposure of *Aedes albopictus* larvae to benzothiazole (a major leachate compound of automobile tires) and pentachlorophenol (a wood-protecting agent) can increase their tolerance to insecticides such as carbaryl, rotenone and temephos (Suwanchaichinda and Brattsten, 2001, 2002). This increase in tolerance in *Ae. albopictus* is correlated with an induction of cytochrome P450 activity. This enzyme family, together with the carboxylesterases and glutathione transferases, play a central role in the detoxification and in the metabolism of insecticides and other xenobiotics (Feyereisen, 2005; Hemingway et al., 2002, 2004).

Recently, microarray-based approaches have been used to investigate the effect of xenobiotic exposure on the expression of detoxification genes in *Drosophila*. Phenobarbital and the herbicide atrazine induced the expression of multiple P450s (*CYP* for genes) and *GST* genes in adult flies including genes previously linked to insecticide resistance (Le Goff et al., 2006). In mammals, a causal link between the induction of particular detoxification enzymes by xenobiotics and their ability to metabolize them has been demonstrated and successfully utilized to identify drug metabolizing enzymes (Luo et al., 2004; Waxman, 1999). This approach was also used to identify two *CYP* genes (*CYP6B1* and *CYP6B3*) in the black swallowtail *Papilio polyxenes* induced by and metabolizing furanocoumarins, toxins produced by their host plant (Petersen et al., 2001; Wen et al., 2003). Likewise, other *CYP* genes able to metabolize xanthotoxin were characterized in the cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Li et al., 2000; Sasabe et al., 2004). Hence, studying the induction profile of insect detoxification enzymes has been suggested as a means to identify the major enzymes involved in insecticide detoxification. In *Drosophila*, exposure to high concentrations of insecticides induced the expression of few detoxification genes while two known inducers (phenobarbital and caffeine) and piperonyl butoxide induced multiple detoxification genes, including those involved in insecticide metabolism (Willoughby et al., 2006, 2007). In mosquitoes, insecticides have also been shown to induce detoxification enzymes. By using a microarray representing more than 11,000 unique ESTs, Vontas et al. (2005) identified *Anopheles gambiae* detoxification genes induced by the insecticide permethrin.

Little is known about regulatory elements controlling the induction of detoxification genes by chemicals in mosquitoes. In vertebrates, xenobiotics such as planar aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls (PCB) can trigger the induction of *CYP* genes via the intracellular aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Goksoyr and Husoy, 1998). Korashy and El-Kadi (2005) have suggested the possible involvement of this nuclear receptor in the induction of *CYP* genes by heavy metals. Upon binding of a ligand, AhR migrates to the nucleus where it dimerizes with

'ARNt' (AhR nuclear translocator) before binding to specific DNA sequences called xenobiotic response elements (XREs) located in the upstream region of *CYP* genes (Backlund and Ingelman-Sundberg, 2005; Petrusis and Perdew, 2002). AhR–XRE pathway was shown to be conserved in insects as the black swallowtail caterpillar (*P. polyxenes*) responds to xanthotoxin by inducing *CYP6B1* via XRE-like binding sites (Brown et al., 2005; McDonnell et al., 2004). Putative XRE binding sites were also found upstream of *An. gambiae* *CYP6* genes induced by permethrin (David et al., personal communication). Other regulatory elements such as the ecdysone response element (EcRE) (Gilbert et al., 2002), the constitutive androstane receptor family (CAR) (King-Jones et al., 2006) and the antioxidant response element (ARE) (Li et al., 2002) have been involved in insect response to xenobiotics and may participate in the cross-induction of detoxification genes in mosquitoes.

Here, we investigate the capacity of various xenobiotics to modify the tolerance of *Ae. aegypti* larvae to two chemical insecticides through the induction of detoxification enzymes. We exposed mosquito larvae for 24 h to sublethal doses of three different xenobiotics likely to be found in highly polluted breeding sites (the herbicide atrazine, the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene and the heavy metal copper) and two chemical insecticides (the pyrethroid permethrin and the organophosphate temephos). After exposure to each xenobiotic, larval tolerance to insecticides and detoxification enzyme activities were compared. Expression patterns of detoxification genes following exposure to xenobiotics and insecticides were compared by using the microarray '*Aedes Detox Chip*' (Strode et al., 2007) and real-time quantitative PCR. To investigate the role of particular regulatory elements in cross-induction mechanisms, a comparative analysis of the 1000 bp upstream region of selected detoxification genes was performed. Overall, this study suggests that the cross-induction of detoxification enzymes involved in insecticide metabolism by environmental xenobiotics may enhance the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides.

2. Materials and methods

2.1. Mosquitoes and xenobiotics

A laboratory strain of *Ae. aegypti* (Bora-Bora strain, susceptible to insecticides) was reared in standard insectary conditions (26 °C, 8 h/12 h light/dark period, tap water) and used for all experiments. Larvae were reared in similar conditions with controlled amount of larval food (hay pellets) for 5 days (fourth stage) before exposure for 24 h to five different xenobiotics belonging to various chemical classes likely to be found in highly polluted mosquito larvae habitats: the pyrethroid insecticide permethrin (Chem Service, USA), the organophosphate insecticide temephos (Abate 500 E, Bayer, France), the herbicide atrazine (Cluzeau, France), the polycyclic

aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene (Aldrich, France) and the heavy metal copper (obtained from CuSO₄; Prolabo, France). Atrazine is a herbicide heavily used worldwide and is likely to be found in mosquito breeding sites near cultivated areas (e.g. field drainpipes). Similarly, copper is the major component of Bordeaux mixture and is massively used to control fungus on grapes and other berries. Finally, fluoranthene is one of the most ubiquitous PAH and is found in high concentrations in road sediments (Durand et al., 2003). High doses of fluoranthene are likely to be found in urban mosquito breeding sites such as road trenches.

2.2. Pre-exposure to xenobiotics

Pre-exposures to all xenobiotics were performed in triplicate with 200 homogenous fourth stage larvae in 200 ml tap water and 50 mg larval food. Doses of xenobiotics used for larval pre-exposure were chosen according to the doses likely to be found in highly polluted mosquito breeding sites (INERIS, <http://www.ineris.fr/rsde/>). For insecticides, preliminary experiments allowed us to choose a dose resulting in less than 5% larval mortality after 24 h exposure (not shown). This low mortality threshold was chosen in order to minimize the effect of the artificial selection of particular phenotypes more resistant to the insecticide during pre-exposure. Doses of xenobiotics used for pre-exposures were 1.5 ppb permethrin, 2 ppb temephos, 10 ppb atrazine, 0.25 ppm fluoranthene and 1.24 ppm copper (from CuSO₄). After 24 h, larvae were collected, rinsed twice in tap water and immediately used for subsequent bioassays, determination of detoxification enzyme activities and RNA extractions. Larval pre-exposures were repeated three times with egg batches from different generations.

2.3. Bioassays

Larval bioassays were conducted comparatively on larvae exposed to each xenobiotic and unexposed larvae (controls) with the two insecticides permethrin and temephos. Bioassays were performed in triplicate with 25 larvae in 50 ml insecticide solution and repeated three times with larvae from different xenobiotic exposure experiments. Four different insecticide concentrations leading to larval mortality ranging from 5% to 95% in unexposed larvae were used. Temephos and permethrin were used at 6, 10, 15, 20 µg/l and 2, 3, 4, 5 µg/l, respectively. Larval mortality was monitored after 24 h contact with insecticide and further analysed using the Log-Probit software developed by Raymond (1993). For each insecticide, mean LC₅₀ was determined and tolerance ratios for larvae exposed to each xenobiotic comparatively with unexposed larvae were calculated and expressed as %-increased tolerance. Because comparisons of LC₅₀ values may not well represent differential tolerance across all doses of insecticide used for bioassays, differential insecticide

tolerance between larvae exposed to each xenobiotics and controls was further analysed by generating a Generalized Linear Model (GLM) from dose–mortality data followed by a likelihood ratio test using R software (2007).

2.4. Glutathione S-transferase activities

Glutathione S-transferase (GST) activities were measured on larval body extracts with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB; Sigma) as substrate (Habig et al., 1974). Fifty larvae were homogenized in 500 µl of phosphate buffer (0.05 M, pH 7.2) containing 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma), 0.5 mM dithiothreitol (DTT; Fluka), 0.8 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF; Sigma) and 1.5% polyvinylpyrrolidone (PVP; Sigma). Homogenates were then centrifugated at 16,000g at 4 °C for 20 min. Resulting supernatants were used for protein content determination using the Bradford method and kept at –20 °C until use. Reaction mixture contained 2.5 ml of 0.1 M phosphate buffer, 1.5 µM reduced glutathione (Sigma), 1.5 µM CDNB and 200 µg proteins. The absorbance of the reaction was measured after 1 min at 340 nm with a UVIKON 930 spectrophotometer. Results were expressed as mean nanomoles of conjugated CDNB per mg of protein/min ± S.E. Three biological replicates per treatment were made and each measure was repeated five times. Statistical comparison of GST activities between controls and pre-exposed larvae was performed by using a Mann and Whitney test ($N = 15$).

2.5. Cytochrome P450 monooxygenase activities

P450 monooxygenase activities were comparatively evaluated by measuring ethoxycoumarin-*O*-deethylase (ECOD) activities on microsomal fractions based on the microfluorimetric method of De Sousa et al. (1995). One-gram fresh fourth stage larvae were homogenized in 2 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 0.4 mM PMSF. The homogenate was centrifugated at 10,000g for 20 min at 4 °C and the resulting supernatant was ultracentrifugated at 100,000g for 1 h at 4 °C. The microsomal fraction was then resuspended in 0.05 M phosphate buffer and the microsomal protein content was determined by the Bradford method. Twenty micrograms microsomal proteins were then added to 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.4 mM 7-ethoxycoumarin (7-Ec, Fluka) and 0.1 mM NADPH for a total reaction volume of 100 µl and incubated at 30 °C. After 15 min, the reaction was stopped and the production of 7-hydroxycoumarin (7-OH) was evaluated by measuring the fluorescence of each well (380 nm excitation, 460 nm emission) with a Fluoroskan Ascent spectrofluorimeter (Labsystems, Helsinki, Finland) in comparison with a scale of 7-OH (Sigma). P450 activities were expressed as mean picomoles of 7-OH per mg of microsomal protein/min ± S.E. Three biological replicates per treatment were made and each measure was repeated

five times. Statistical comparison of P450 activities between controls and pre-exposed larvae was performed by using a Mann and Whitney test ($N = 15$).

2.6. Esterase activities

Esterase activities were comparatively measured on cytosolic fractions from the 100,000g supernatant according to the method described by Van Asperen (1962) with α -naphthylacetate and β -naphthylacetate used as substrates (α -NA and β -NA, Sigma). Thirty micrograms of cytosolic proteins were added to 0.025 mM phosphate buffer (pH 6.5) with 0.5 mM of α -NA or β -NA for a total volume reaction of 180 μ l and incubated at 30 °C. After 15 min, reaction was stopped by the addition of 20 μ l of 10 mM Fast Garnett (Sigma) and 0.1 M sodium dodecyl sulphate (SDS, Sigma). The production of α - or β -naphthol was measured at 550 nm with a Σ 960-microplate reader (Metertech, Taipei, Taiwan) in comparison with a scale of α -naphthol or β -naphthol and expressed as mean μ moles of α - or β -naphthol per mg of cytosolic protein/min \pm S.E. Three biological replicates per treatment were made and each measure was repeated 10 times. Statistical comparison of esterase activities between controls and pre-exposed larvae was performed by using a Mann and Whitney test ($N = 30$).

2.7. Microarray screening of detoxification genes differentially expressed after xenobiotic exposure

Microarray construction. The 'Aedes Detox Chip' DNA-microarray, developed by Strode et al. (2007), was used to monitor changes in the expression of detoxification genes in larvae exposed to each xenobiotic compared to unexposed larvae. This microarray contains 247 70-mer probes representing 204 detoxification genes including all cytochrome P450 monooxygenases (P450s), GSTs and carboxy/cholinesterases (CCEs) from the mosquito *Ae. aegypti*. Each 70-mer probe, plus six housekeeping genes and 23 artificial control genes (Universal Lucidea Scorecard, G.E. Health Care, Bucks, UK) were spotted four times on each array as previously described (David et al., 2005).

2.7.1. Samples preparation and hybridizations

RNA extractions, cRNA synthesis and labelling reactions were performed independently for each biological replicate. Total RNA was extracted from batches of 30 fourth stage larvae using the PicoPureTM RNA isolation kit (Arcturus Bioscience, Mountain View, USA) according to manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed by digesting total RNA samples with DNase I by using the RNase-free DNase Set (Qiagen). Total RNA quantity and quality were assessed by spectrophotometry before further use. Messenger RNAs were amplified using a RiboAmpTM RNA amplification kit (Arcturus Bioscience) according to manufacturer's instructions. Amplified RNAs

were checked for quantity and quality by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. For each hybridization, 8 μ g of amplified RNAs were reverse transcribed into labelled cDNA and hybridized to the array as previously described by David et al. (2005). Each comparison was repeated three times with different biological samples. For each biological replicate, two hybridizations were performed in which the Cy3 and Cy5 labels were swapped between samples for a total of six hybridizations per comparison. All hybridizations were performed against a global reference sample obtained from a pool of amplified RNAs from unexposed larvae obtained from each biological replicate.

2.7.2. Data analysis

Spot finding, signal quantification and spot superimposition for both dye channels were performed using Genepix 5.1 software (Axon Instruments, Molecular Devices, Union City, CA, USA). For each dataset, any spot satisfying one of the following conditions for any channel was removed from the analysis: (i) intensity values less than 300 or more than 65,000, (ii) signal-to-noise ratio less than 3, (iii) less than 60% of pixel intensity superior to the median of the local background \pm 2SD. Data files were then loaded into Genespring 6.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for normalization and statistic analysis. For each array, the spot replicates of each gene were merged and expressed as median ratios \pm SD. Data from dye swap experiments were then reversed and ratios were log transformed. Ratio values below 0.01 were set to 0.01. Data were then normalized using the local intensity-dependent algorithm *Lowess* (Cleveland and Devlin, 1988) with 20% of data used for smoothing. For each comparison, only genes detected in at least 50% of all hybridizations were used for further statistical analysis. Mean expression ratios were then submitted to a one-sample Student's *t*-test against the baseline value of 1 (equal gene expression in both samples). Genes showing an expression ratio > 1.5-fold in either direction and a *t*-test *P*-value lower than 0.00052 (equivalent to $P < 0.01$ with Bonferroni's multiple testing correction) were considered significantly differentially expressed after xenobiotic exposure.

2.8. Quantitative real-time PCR

Expression profiles of selected detoxification genes in fourth stage larvae after exposure to each xenobiotic were validated by real-time quantitative PCR. Larval exposures were performed as previously described on three biological replicates independent from those used for microarray analysis. Thirty larvae were collected after 24 h exposure to each xenobiotic and immediately used for total RNA extraction using Trizol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Four microgram total RNAs were then treated with DNase I (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with superscript III and oligo-dT₂₀ primer

for 60 min at 50 °C according to manufacturer's instructions. Resulting cDNAs were diluted 125 times for real-time quantitative PCR reactions (10 times for *CYP12F8* due to low expression). Real-time quantitative PCR reactions of 25 µl were performed on an iQ5 system (BioRad) using iQ SYBR Green supermix (BioRad), 0.3 µM of each primer and 5 µl of diluted cDNAs according to manufacturer's instructions. For each gene analysed, a cDNA dilution scale from 5 to 50,000 times was performed in order to assess efficiency of PCR. Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method taking into account PCR efficiency (Pfaffl, 2001) and using the gene encoding the ribosomal protein L8 (*AeRPL8*, GenBank accession no.: DQ440262) for normalization. This gene was chosen among six housekeeping genes regarding its low expression variations from microarray experiments. Results were expressed as mean expression ratios (\pm S.E.) between larvae exposed to each xenobiotic and controls. Only genes showing more than 2-fold over-expression in larvae exposed to xenobiotic comparatively to controls were considered significantly induced. Comparison of basal expression of detoxification genes was based on normalized expression levels obtained from control larvae.

2.9. Comparative promoter analysis

Genomic fragments of 1000 bp upstream of the first codon of each gene analysed by real-time quantitative RT-PCR were extracted from *Ae. aegypti* genomic sequence (1.0 Genebuild, Nene et al., 2007). Each genomic fragment was then blasted against Genbank protein database (Blastx) to ensure no protein coding sequences were located within those fragments. Presence and position of putative TATA boxes and transcription starting sites were manually annotated. Promoter elements search was performed with TESS software (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/teess/>). Search was focused on the presence of the core sequence of xenobiotic response elements (XREs) essential for AhR binding (XRE, 5'-GCGTG-3'), the

antioxidant response element ARE, (5'-TMANNRT-GACNNNGCRWWW-3') based on mammalian sequences, the *Drosophila* EcRE (5'-RRKKCANTSAMC-3') and the direct repeat motifs DR4 (CAR/RXR, 5'-RGGT-CANNNNAGTNCA-3'), DR3 (PXR/RXR, 5'-RGKT-CANNNAGTTCA-3') and DR1 (PPAR/RXR, 5'-AGGG-CANAGKYSA-3') shown to be involved in xenobiotic response (review in Masahiko and Honkakoski, 2000). Search parameters were as follows: maximum allowed string mismatch = 20%, minimum log-likelihood ratio score = 8, minimum string length = 5 and minimum *Lg*-likelihood ratio = 6. Only sites showing *Lg* scores above 0.85 (equivalent to perfect match for XRE core sequence) were considered significant.

3. Results

Exposing *Ae. aegypti* larvae to a sub-lethal dose of the herbicide atrazine, the heavy metal copper, the PAH fluoranthene and the two insecticides permethrin and temephos for 24 h affected their subsequent tolerance to insecticides (Table 1). Larval tolerance to the pyrethroid insecticide permethrin was moderately improved after exposure to fluoranthene and copper (25% and 11% increase in LC₅₀, respectively), almost unaffected after exposure to temephos (4% increase in LC₅₀) and not affected after exposure to atrazine and permethrin. Larval tolerance to the organophosphate temephos was moderately augmented after exposure to atrazine, permethrin, copper and fluoranthene (20%, 18%, 16% and 11% increase in LC₅₀, respectively) but only slightly increased after exposure to temephos (7% increase in LC₅₀).

Larval exposure to xenobiotics and insecticides led to significant modifications of their GST and P450 activities. GST activities (Fig. 1) were slightly but significantly induced in larvae exposed to fluoranthene (\times 1.23-fold and $P < 0.05$) while exposure to copper lead to a significant decrease in GST activities (/1.40-fold and $P < 0.05$). Exposure to atrazine, permethrin and temephos did not

Table 1
Differential tolerance of *Ae. aegypti* larvae to permethrin and temephos after exposure for 24 h to xenobiotics and insecticides^a

Treatment	Permethrin			Temephos		
	LC ₅₀ (µg/l) (CI _{95%})	Increased tolerance (%)	Likelihood ratio test <i>P</i> -value	LC ₅₀ (µg/l) (CI _{95%})	Increased tolerance (%)	Likelihood ratio test <i>P</i> -value
Controls	3.8 (3.6–4.0)	–	–	13.4 (12.1–15.0)	–	–
Atrazine	3.8 (3.6–4.0)	1	ns	16.1 (14.6–17.8)	20	***
Copper	4.2 (4.0–4.5)	11	***	15.6 (14.3–17.1)	16	***
Fluoranthene	4.7 (4.5–5.0)	25	***	14.9 (13.4–16.5)	11	***
Permethrin	3.9 (3.6–4.2)	3	ns	15.8 (14.7–17.0)	18	***
Temephos	4.0 (3.8–4.2)	4	*	14.4 (12.8–16.8)	7	*

^aLarvae were exposed for 24 h to sub-lethal doses of five different xenobiotics (atrazine, copper, fluoranthene, permethrin and temephos). For each treatment, increased tolerance of larvae exposed to each insecticide comparatively to unexposed larvae (controls) was calculated by comparing LC₅₀ values. For each comparison, a Generalized Linear Model (GLM) followed by a likelihood ratio test was used for statistical comparisons of larval tolerance to each insecticide (ns: non significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$).

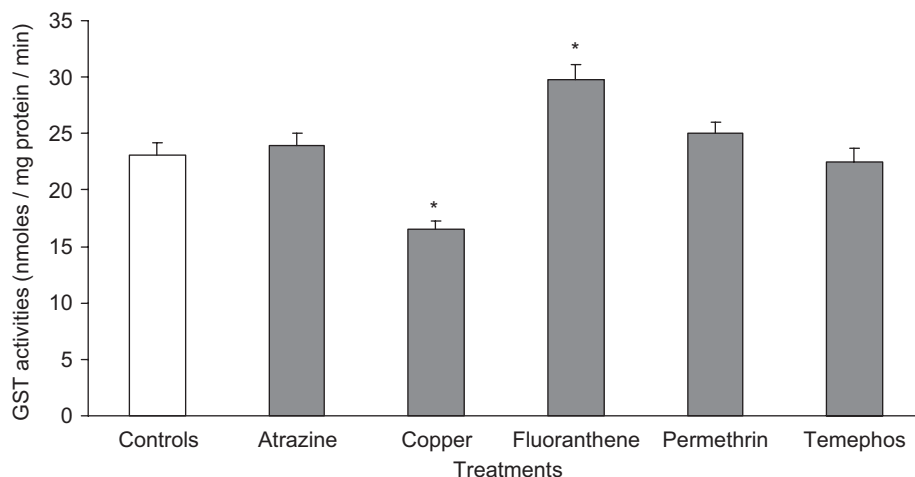


Fig. 1. Differential GST activities of *Ae. aegypti* larvae exposed for 24 h to sub-lethal doses of five different xenobiotics (atrazine, copper, fluoranthene, permethrin and temephos). Larval GST activities were measured with the CDNB method (Habis et al. 1974) on 200 μ g microsomal proteins during 1 min and expressed as nmol of conjugated CDNB/ μ g protein/min (\pm S.E.). For each treatment, statistical comparison of GST activities between xenobiotic-exposed larvae and controls were performed with a Mann and Whitney's test ($N = 15$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

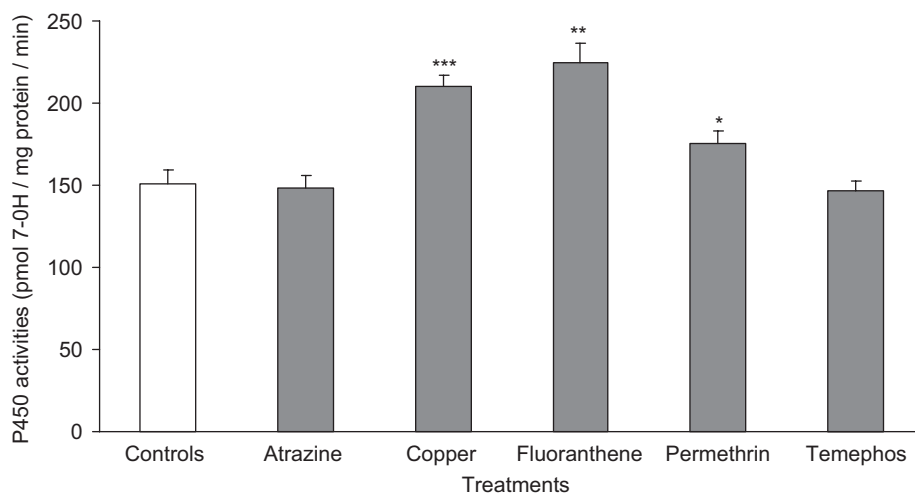


Fig. 2. Differential P450 activities of *Ae. aegypti* larvae exposed for 24 h to sub-lethal doses of five different xenobiotics (atrazine, copper, fluoranthene, permethrin and temephos). Larval P450 activities were measured with the ECOD method (De Sousa et al. 1995) on 20 μ g microsomal proteins after 15 min and expressed as pmol of 7-OH produced/mg microsomal protein/min (\pm S.E.). For each treatment, statistical comparison of P450 activities between xenobiotic-exposed larvae and controls were performed with a Mann and Whitney's test ($N = 15$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

significantly affect larval GST activities. Microsomal larval P450 activities (Fig. 2) were induced after exposure to fluoranthene, copper and permethrin ($\times 1.5$ -fold, $\times 1.4$ -fold and $\times 1.2$ -fold with P -values < 0.001 , < 0.001 and < 0.05 , respectively) while no significant changes in P450 activities were observed after exposure to atrazine or temephos. No significant modification of global larval α - or β -cytosolic esterase activities were observed in larvae exposed to any xenobiotic (Fig. 3).

By using the microarray 'Aedes Detox Chip' (Strode et al., 2007), we identified 12 detoxification genes significantly induced in fourth stage larvae following a 24 h exposure to a sub-lethal dose of xenobiotics or insecticides (Table 2 and Supplementary Table 1). Among them, 11 genes encode P450s (CYPs) and one encodes a

carboxylesterase (CCE). Larvae exposed to fluoranthene showed a significant over-expression of five CYP genes (*CYP6N12*, *CYP6Z8*, *CYP6M6*, *CYP6Z9* and *CYP12F8*). Exposing larvae to the herbicide atrazine induced three CYP genes (*CYP9M8*, *CYP6AL1* and *CYP9M9*) and one gene encoding a putative juvenile hormone (JH) esterase (*CCEjhe1F*). Exposure to copper significantly induced two CYP genes (*CYP6M11* and *CYP9J15*). Finally, larvae exposed to permethrin revealed a significant over-expression of three CYP genes (*CYP9M9*, *CYP314A1* and *CYP9M8*) while temephos exposure did not significantly induce any detoxification gene. Microarray screening revealed that different xenobiotics can significantly induce identical genes (*CYP9M9* and *CYP9M8* induced by both atrazine and permethrin).

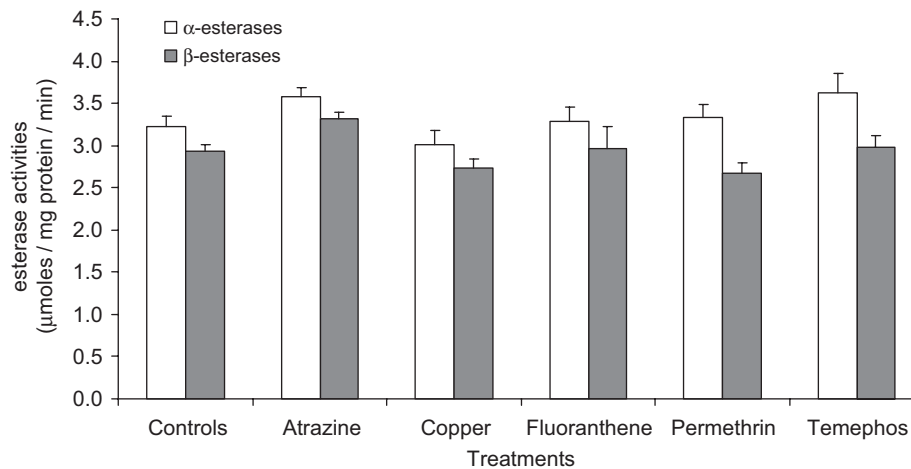


Fig. 3. Differential esterase activities of *Ae. aegypti* larvae exposed for 24 h to sub-lethal doses of five different xenobiotics (atrazine, copper, fluoranthene, permethrin and temephos). Larval α -esterase (white bars) and β -esterase (dark bars) activities were measured with the naphthyl acetate method (Van Asperen, 1962) on 30 μ g cytosolic proteins after 15 min and expressed as μ mol α - or β -naphthol produced/mg protein/min (\pm S.E.). For each treatment, statistical comparison of α - and β -esterase activities between xenobiotic-exposed larvae and controls were performed with a Mann and Whitney's test ($N = 30$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Table 2

Microarray analysis of the induction of detoxification genes in *Ae. aegypti* larvae after exposure for 24 h to xenobiotics and insecticides^a

Gene	Atrazine		Copper		Fluoranthene		Permethrin		Temephos	
	Ratio	<i>P</i> -value	Ratio	<i>P</i> -value	Ratio	<i>P</i> -value	Ratio	<i>P</i> -value	Ratio	<i>P</i> -value
<i>CYP9M9</i>	1.57	3.5E-07	1.22	2.1E-01	2.85	6.4E-04	2.56	4.5E-05	1.33	4.3E-01
<i>CYP9M8</i>	3.38	2.9E-06	0.46	1.6E-01	0.58	2.4E-01	1.63	1.3E-04	0.71	2.6E-01
<i>CYP6M11</i>	0.97	7.9E-01	2.56	9.7E-08	1.82	1.7E-02	2.12	3.1E-03	1.20	3.5E-01
<i>CYP6Z8</i>	1.04	6.1E-01	0.92	5.3E-01	1.73	1.6E-04	0.89	3.7E-01	0.76	1.2E-01
<i>CYP6Z9</i>	1.11	2.3E-01	1.04	6.9E-01	1.56	8.4E-06	1.34	4.9E-03	0.83	2.6E-01
<i>CYP6M6</i>	1.00	9.8E-01	1.23	1.1E-01	1.71	7.8E-09	1.03	7.3E-01	0.61	1.2E-01
<i>CYP314A1</i>	1.29	2.3E-03	1.19	2.7E-01	1.93	1.1E-03	1.92	6.1E-05	1.53	5.7E-02
<i>CYP6AL1</i>	1.62	2.0E-04	0.66	2.2E-01	0.22	1.7E-03	0.79	4.4E-01	0.61	8.7E-02
<i>CYP9J15</i>	1.04	6.1E-01	1.56	2.3E-04	1.04	7.4E-01	0.99	9.6E-01	0.82	2.7E-01
<i>CYP6N12</i>	1.07	3.8E-01	1.12	3.4E-01	2.23	1.6E-04	1.14	1.1E-01	0.71	1.2E-01
<i>CYP12F8</i>	1.02	7.9E-01	1.28	2.3E-02	1.50	1.3E-05	0.94	5.0E-01	0.80	1.5E-01
<i>CCEjhe1F</i>	2.03	3.8E-07	1.10	8.3E-01	1.12	5.8E-01	1.22	2.1E-01	0.77	6.0E-01

^aLarvae were exposed for 24 h to sub-lethal doses of five different xenobiotics and insecticides (atrazine, copper, fluoranthene, permethrin and temephos) before microarray analysis of the expression of detoxification genes. Only genes showing a significant differential expression after a minimum of one treatment are shown. Expression ratios between treated larvae and controls are indicated for each treatment. Expression ratios and *P*-values of genes considered significantly induced are shown in bold.

Real-time quantitative RT-PCR on different biological replicates was used to validate the expression pattern of the 12 genes isolated from microarray experiments (Fig. 4). The specific inductions of *CYP6M6* by fluoranthene and *CYP6M11* by copper were confirmed (2.2- and 3.4-fold, respectively). Interestingly, the induction of *CYP9M9*, *CYP9M8*, *CYP6Z8*, *CYP6AL1*, *CYP6N12* and *CCEjhe1F* by one xenobiotic was confirmed but multiple inductions of these genes by other xenobiotics were also observed. All these genes were induced by fluoranthene and permethrin with *CYP9M9* and *CYP6N12* being induced by one more xenobiotic (temephos and copper, respectively) and *CYP9M8*, *CYP6Z8*, *CYP6AL1* and *CCEjhe1F* being induced by at least four xenobiotics. High induction ratios were obtained for *CYP9M9* (fluoranthene

5.4-fold), *CYP9M8* (atrazine 6.0-fold, fluoranthene 5.9-fold), *CYP6Z8* (fluoranthene 4.6-fold), *CYP6AL1* (atrazine 14.3-fold, fluoranthene 10.1-fold and permethrin 6.4-fold) and *CCEjhe1F* (atrazine 15.5-fold, copper 6.3-fold, fluoranthene 10.2-fold and permethrin 7.7-fold). Finally, induction of *CYP9J15* by copper, *CYP12F8* and *CYP6Z9* by fluoranthene and *CYP314A1* by permethrin were not confirmed by real-time quantitative RT-PCR.

Comparison of the basal expression levels of those 12 detoxification genes in fourth stage larvae revealed wide differences in their basal expression level (Fig. 5). As expected, expression of most detoxification genes was considerably lower than the expression of the housekeeping gene *AeRPL8* (from 60 to >40,000-fold reduction).

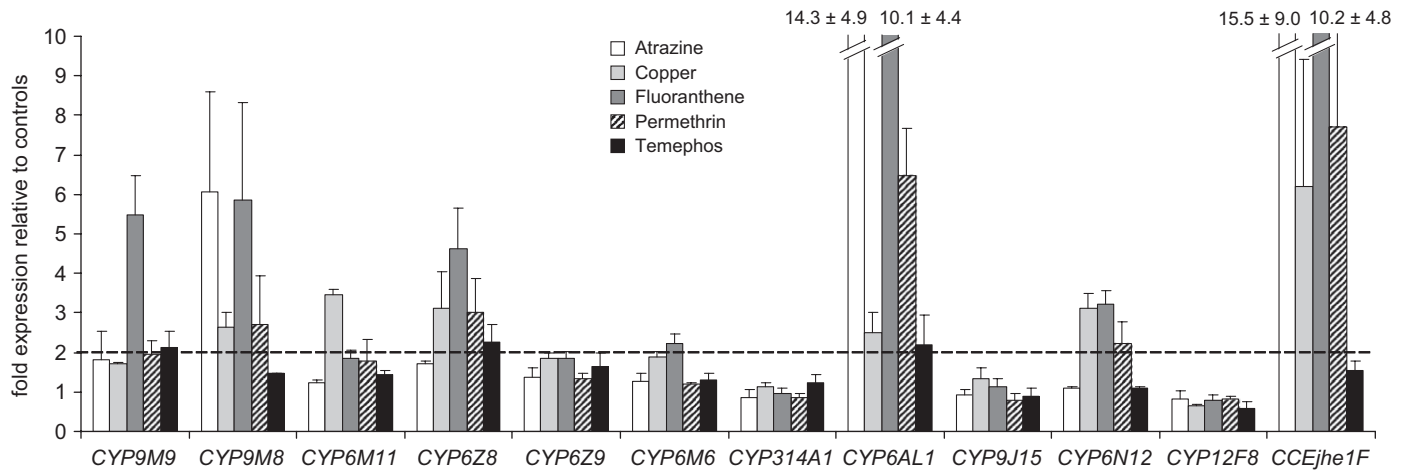


Fig. 4. Comparative real-time quantitative RT-PCR analysis of the differential expression of 12 selected detoxification genes in *Ae. aegypti* larvae exposed for 24 h to sub-lethal doses of five different xenobiotics (atrazine, copper, fluoranthene, permethrin and temephos). Gene expression values are indicated as fold expression (\pm S.E.) in larvae exposed to each xenobiotic comparatively to unexposed larvae (controls). The housekeeping gene *AeRPL8* was used as internal control for normalization. Horizontal broken line indicates a 2-fold over-expression in treated larvae comparatively to controls.

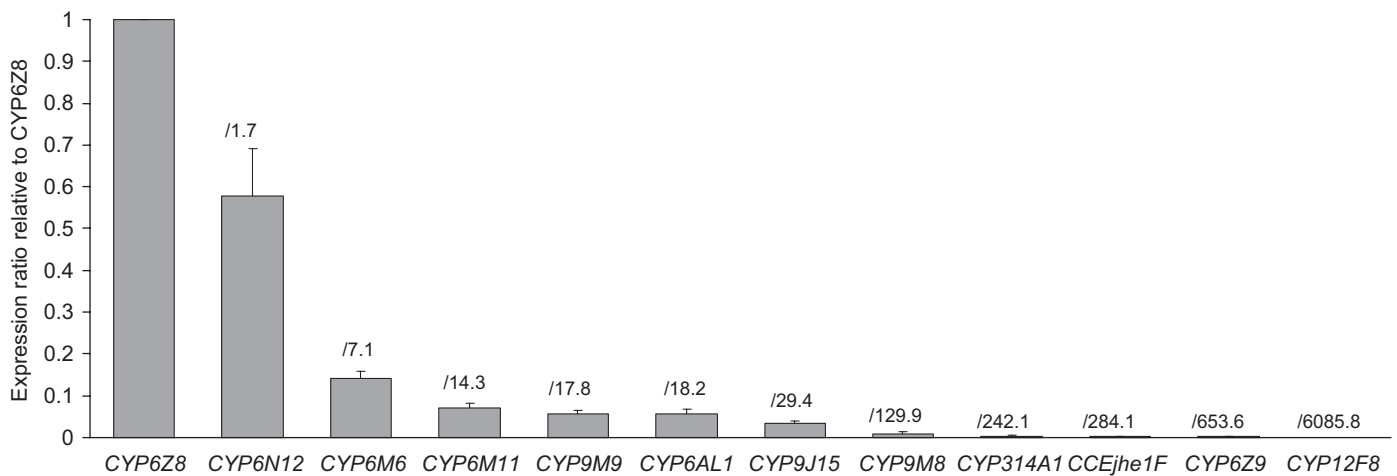


Fig. 5. Constitutive expression levels of 12 selected detoxification genes in *Ae. aegypti* larvae. Gene expression was measured by real-time quantitative RT-PCR in fourth-stage larvae in absence of xenobiotics. Expression levels were normalized with the housekeeping gene *AeRPL8* and are shown as expression ratios relative to the gene showing the highest expression (mean \pm S.E.). Fold expression is indicated above each bar.

Among detoxification genes, larval basal expression levels vary greatly, with *CYP6Z8* and *CYP6N12* showing high expression levels, *CYP314A1*, *CCEjhe1F* and *CYP6Z9* being low expressed and *CYP12F8* being hardly detectable by real-time quantitative PCR (Fig. 5).

To investigate the role of the AhR pathway in the induction of detoxification genes by xenobiotics, a preliminary analysis of the 1000 bp upstream region of the 12 genes analysed by real-time RT-PCR was performed (Fig. 6), looking for putative XRE binding sites together with other known regulatory elements such as the EcRE, the ARE and direct repeats DR4 (CAR/RXR), DR3 (PXR/RXR) and DR1 (PPAR/RXR). Five *CYP* genes (*CYP6Z8*, *CYP6M6*, *CYP9J15*, *CYP6N12* and *CYP12F8*) and the JH esterase *CCEjhe1F* possess at least one XRE element in their 1000 bp upstream sequence with *CYP6Z8*

and *CCEjhe1F* possessing five and three XRE elements, respectively. Among these, three genes (*CYP6Z8*, *CYP6N12* and *CCEjhe1F*) were induced by multiple xenobiotics. On the other hand, other genes responding to multiple xenobiotics did not reveal the presence of putative XRE elements. ARE were found upstream of *CYP6N12*, *CYP6M11* and *CYP6M6* and may reflect the involvement of this element in the response to metabolic stress. Ten promoter sequences contain putative EcRE elements. Interestingly, EcRE was the only element found upstream of four genes including the mitochondrial P450 *CYP314A1*, the ortholog of the *Drosophila* and *Anopheles* P450s 'Shade' involved in ecdysone metabolism (Gilbert, 2004). Finally, no putative direct repeat DR4, DR3 or DR1 were found with significant *Lq* scores upstream any detoxification gene.

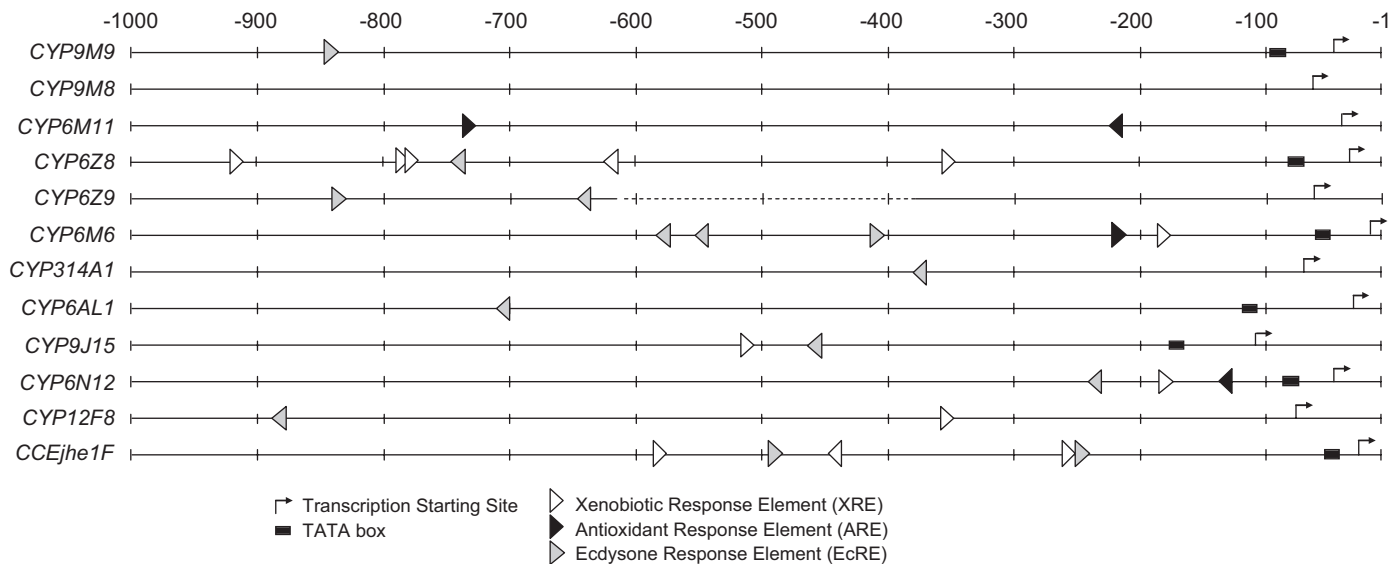


Fig. 6. Comparative analysis of the promoter regions of 12 selected detoxification genes in *Ae. aegypti*. Automated analysis was performed with TESS software. Search was focused on the presence of the core sequence of xenobiotic responsive elements (XRE) essential for Ah-R binding, the antioxidant responsive element (ARE), based on mammalian sequences, the *Drosophila* ecdysone response element (EcRE) and the mammalian direct repeat motifs DR4, DR3 and DR1. Only elements showing Lq scores above 0.85 (equivalent to perfect match for XRE elements) are shown. Putative TATA boxes and transcription starting sites are indicated. Sequences are numbered from the first base of the first codon. Dotted line represents missing sequence data.

4. Discussion

In the last 60 years, the amount of anthropogenic xenobiotics released into natural ecosystems has dramatically increased. Although the effect of these chemicals on human health is intensively studied, their impact on insect metabolism and insecticide resistance mechanisms remains poorly understood. Here we investigated the potential of various xenobiotics likely to be found in polluted mosquito breeding sites to modify the tolerance of mosquito larvae to insecticides through the cross-induction of detoxification enzymes. We showed that the presence of xenobiotics in the water where mosquito larvae develop can modify their tolerance to chemical insecticides. Although the increases in insecticide tolerance reported here are marginal comparatively to inherited resistance levels obtained after many generations of selection with insecticides, our results show that the presence of particular xenobiotics may contribute to insecticide tolerance in mosquito larvae. This phenomenon might be more pronounced in highly polluted mosquito breeding sites or following a temporary dramatic pollution event. [Suwanchaichinda and Brattsten \(2001\)](#) exposed *Ae. albopictus* larvae for 48 h to various herbicides and fungicides before measuring their tolerance to the insecticide carbaryl. Interestingly, no significant effect was observed with atrazine, simazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) while a 70% reduced mortality to 1 ppm carbaryl and a significant increase of P450 activities were observed after exposing larvae to 2 ppm pentachlorophenol.

Many studies have revealed the capacity of insect detoxification enzymes to be induced by xenobiotics and the relationship between elevated detoxifying enzyme levels

and tolerance to chemical insecticides ([Enayati et al., 2005](#); [Feyereisen, 2005](#); [Hemingway et al., 2004](#); [Yu, 1996](#)). Our work demonstrates that fluoranthene, copper, and permethrin induce P450 activities while GST activities were only induced by fluoranthene and repressed by copper. Microarray data indicate that the repression of GST activities by copper is not likely to be the consequence of gene repression. As described in other studies, this repression is rather likely to result from the inhibition of GST enzymes through radical oxygen species-induced oxidation and non-specific Cu^{2+} binding to protein thiol groups ([Letelier et al., 2006](#)).

The three xenobiotics with the highest effect on increasing larvae tolerance to insecticides were also the best inducers of P450 activities. This trend supports the central role of this enzyme family in the increased tolerance of larvae to insecticides through their induction by environmental xenobiotics and insecticides. Our study showed that larval pre-exposure to a sub-lethal dose of one insecticide does not necessarily lead to significant increased tolerance to the insecticide. This may indicate that the dose or the duration of exposure was not sufficient to obtain a significant toxicological effect. However, this also suggests that insecticides may not always be the most potent inducers of detoxifying enzymes able to metabolize them. The latter hypothesis is supported by results obtained in *Drosophila* by [Willoughby et al. \(2006\)](#) showing that a short exposure to high lethal concentrations of insecticides only induce few detoxification genes comparatively to phenobarbital and caffeine inducing multiple *CYP* and *GST* genes including those involved in insecticide resistance.

We used the microarray *Aedes Detox Chip* to screen for detoxification genes induced in fourth stage larvae after exposure to fluoranthene, copper, atrazine, permethrin or temephos. Among the 12 detoxification genes identified, 11 encode P450s including nine genes belonging to the *CYP6* and *CYP9* families. This finding supports the work of Strode et al. (2007) showing the expansion of these *CYP* families in *Ae. aegypti* and their probable involvement in the adaptation of this mosquito species to xenobiotics and insecticides. Real-time quantitative RT-PCR experiments confirmed the induction of seven *CYP* genes (*CYP9M9*, *CYP9M8*, *CYP6M11*, *CYP6Z8*, *CYP6M6*, *CYP6AL1*, *CYP6N12*) and the JH esterase *CCEjhe1F* by xenobiotics and insecticides, and revealed cross-induction patterns not evidenced by microarray analysis. Conversely, the induction patterns of four *CYP* genes (*CYP6Z9*, *CYP314A1*, *CYP9J15* and *CYP12F8*) obtained from microarray data were not confirmed. Discrepancies between microarrays and real-time quantitative RT-PCR data can result from biological variations (different biological samples used for microarray and RT-PCR) or technical issues during microarray experiments. The low gene induction levels obtained from microarray data may be partially explained by the well-known underestimation of expression ratios by microarrays compared with real-time quantitative RT-PCR (Yuen et al., 2002). Our results reveal that the risk of error in both techniques is much greater for genes with very low expression levels (Fig. 5) and confirm that microarray experiments require cross-validation with other gene-expression profiling techniques.

Many *CYP* genes belonging to *CYP6* and *CYP9* families were induced by multiple xenobiotics including the insecticide permethrin. Conversely, temephos did not appear as a strong *CYP* inducer, confirming microarray data and poor toxicological effects obtained after temephos exposure. In *An. gambiae*, *CYP6Z* genes are over-transcribed in the permethrin-resistant strain RSP (Nikou et al., 2003) and induced by permethrin (J.P. David, personal communication). Our results show that *CYP6Z8*, closely related to *An. gambiae CYP6Zs*, is induced by copper, fluoranthene, permethrin and temephos, supporting the chemoprotective role of *CYP6Zs* in mosquitoes. In addition, the very high expression level of *CYP6Z8* in larvae may indicate that this particular P450 plays a major role in xenobiotic response during the aquatic larval stages. *CYP6AL1* was also found induced by all xenobiotics. Previous studies revealed the induction of this gene in *Ae. aegypti* larvae after ingestion of arborescent decomposed leaf litter containing bacterial toxins, indicating a possible role in stress response (David et al., 2006; Tilquin et al., personal communication). Although the induction of *CYP6N12*, *CYP6M6*, *CYP6M11*, *CYP9M8* and *CYP9M9* have not yet been documented in *Ae. aegypti*, closely related genes were found up-regulated in adults of a permethrin-resistant strain (*CYP9M6*) or induced by permethrin (*CYP6N6* and *CYP9M5*), suggesting that these *CYP* sub-families are involved in insecticide response

(W.C. Black, personal communication). The JH esterase *CCEjhe1F* was found induced by atrazine, copper, fluoranthene and permethrin and may contribute to the increased tolerance to temephos observed after exposure to those xenobiotics. By studying its expression pattern, protein sequence and JH metabolism capacity, Bai et al. (2007) characterized this gene (GenBank accession no.: EAT43357) as a functional JH esterase regulated by JH level. Interestingly, this gene was highly induced by atrazine which is considered as an endocrine disruptor in vertebrate (Hayes et al., 2006). Whether xenobiotics and insecticides interact with hormone levels or can directly affect JH esterase gene regulation is not clear but interactions between hormone metabolism and xenobiotic response may occur.

Automated analysis of the promoter region of detoxification genes revealed the presence of XRE elements within 1000 bp upstream of first codon for six detoxification genes out of 12. Interestingly, promoter sequences of *CYP6Z8* and *CCEjhe1F*, both induced by multiple xenobiotics, contains three and five XRE elements, respectively, suggesting that this element may be linked to cross-induction capacity. However, no XRE elements were found in other genes induced by multiple xenobiotics, and no obvious relationship came into view between xenobiotic response and the presence of XRE or other particular regulatory element. This may be due to complex interactions between different regulatory elements and xenobiotics but also to the presence of additional elements further upstream or in other genomic regions. Confirming the role of particular regulatory elements in xenobiotic induction mechanisms in mosquitoes will require further *in silico* and experimental studies.

The present study represents a first-step in understanding the molecular mechanisms by which environment can influence the tolerance of mosquitoes to insecticides. The unambiguous demonstration of the role of environmental xenobiotics in the regulation of detoxification enzymes able to metabolize insecticides requires additional experiments. In this concern, the *in vitro* expression of genes showing cross-induction patterns between insecticides and environmental xenobiotics will allow testing for their capacity to bind and metabolize insecticides. Finally, our study was focused on the short-term effect of xenobiotics on the phenotypic plasticity associated with the tolerance of mosquito larvae to insecticides. Considering the persistent contamination of wetlands by anthropogenic chemicals and the potential effect of phenotypic plasticity on the selection of particular genes (Ghalambor et al., 2007), the question of the long-term impact of environmental xenobiotics on inherited insecticide resistance also represents a crucial future research direction.

Acknowledgments

The present research project was co-funded by the French National Research Agency (ANR Grant MOSQUITO-ENV

07SEST014), the 'Entente Interdépartementale de Démoustication Rhône-Alpes' (EID), the Laboratory of Alpine Ecology (LECA) and the Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM). We are grateful to J. Patouraux, T. Gaude and A. Ball for technical help. We thank Prof. A. Cossins, Dr. M. Hughes and the Liverpool Microarray User Community for microarray printing and data analysis. We thank Dr. MacCallum and Vectorbase for technical support for microarray data deposition. We are grateful to Dr. C. Dauphin-Villemant, Dr. L. Després, Dr. M. Paine, Pr. P. Ravanel and three anonymous reviewers for useful comments on the manuscript.

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ibmb.2008.01.004.

References

- Backlund, M., Ingelman-Sundberg, M., 2005. Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cell. Signal.* 17, 39–48.
- Bai, H., Ramaseshadri, P., Palli, S.R., 2007. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 829–837.
- Boyer, S., Sérour, J., Lempérière, G., Raveton, M., Ravanel, P., 2006. Do herbicide treatments reduce the sensitivity of mosquito larvae to insecticides? *Chemosphere* 65, 721–724.
- Brown, R.P., McDonnell, C.M., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2005. Regulation of an insect cytochrome P450 monooxygenase gene (*CYP6B1*) by aryl hydrocarbon and xanthotoxin response cascades. *Gene* 358, 39–52.
- Cleveland, W.S., Devlin, S.J., 1988. Locally-weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *J. Am. Stat. Assoc.* 83, 596–610.
- David, J.P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P.M., Louis, C., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4080–4084.
- David, J.P., Boyer, S., Mesneau, A., Ball, A., Ranson, H., Dauphin-Villemant, C., 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 410–420.
- De Sousa, G., Cuany, A., Brun, A., Amichot, M., Rhamani, R., Bergé, J.B., 1995. A microfluorimetric method for measuring ethoxycoumarin-*O*-deethylase activity on individuals *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Anal. Biochem.* 229, 86–91.
- Durand, C., Ruban, V., Amblès, A., Clozel, B., Achard, L., 2003. Characterisation of road sediments near Bordeaux with emphasis on phosphorus. *J. Environ. Monit.* 5, 463–467.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14, 3–8.
- Feyereisen, R., 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, pp. 1–77.
- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P., Reznick, D.N., 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21, 394–407.
- Gilbert, L.I., 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 1–10.
- Gilbert, L.I., Rybczynski, R., Warren, J.T., 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Ann. Rev. Entomol.* 47, 883–916.
- Goksoyr, A., Husoy, A.M., 1998. Immunochemical approaches to studies of *CYP1A* localization and induction by xenobiotics in fish. *EXS* 86, 165–202.
- Habig, H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 114, 17–18.
- Hemingway, J., Field, L., Vontas, J., 2002. An overview of insecticide resistance. *Science* 298, 96–97.
- 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.
- King-Jones, K., Horner, M.A., Lam, G., Thummel, C.S., 2006. The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic responses in *Drosophila*. *Cell Metab.* 4, 37–48.
- Korashy, H.M., El-Kadi, A.O., 2005. Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicol. Sci.* 88, 39–51.
- Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., Ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R., 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 674–682.
- Letelier, M.E., Martínez, M., González-Lira, V., Faúndez, M., Aracena-Parks, P., 2006. Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chem. Biol. Interact.* 164, 39–48.
- Li, X., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2000. Molecular cloning and expression of *CYP6B8*: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 75–84.
- Li, W., Petersen, R.A., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2002. CYP6B cytochrome P450 monooxygenases from *Papilio canadensis* and *Papilio glaucus*: potential contributions of sequence divergence to host plant associations. *Insect Mol. Biol.* 11, 543–551.
- Luo, G., Guenther, T., Gan, L.S., Humphreys, W.G., 2004. *CYP3A4* induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr. Drug Metab.* 5, 483–505.
- Masahiko, N., Honkakoski, P., 2000. Induction of drug metabolism by nuclear receptor CAR: molecular mechanisms and implications for drug research. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, 259–264.
- McDonnell, C.M., Brown, R.P., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2004. Conserved regulatory elements in the promoters of two allelochemical-inducible cytochrome P450 genes differentially regulate transcription. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1129–1139.
- Nene, V., Wortman, J.R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z.J., Loftus, B., Xi, Z., Megy, K., Grabherr, M., Ren, Q., Zdobnov, E.M., Lobo, N.F., Campbell, K.S., Brown, S.E., Bonaldo, M.F., Zhu, J., Sinkins, S.P., Hogenkamp, D.G., Amedeo, P., Arensburger, P., Atkinson, P.W., Bidwell, S., Biedler, J., Birney, E., Bruggner, R.V., Costas, J., Coy, M.R., Crabtree, J., Crawford, M., Debryun, B., Decaprio, D., Eiglmeier, K., Eisenstadt, E., El-Dorri, H., Gelbart, W.M., Gomes, S.L., Hammond, M., Hannick, L.I., Hogan, J.R., Holmes, M.H., Jaffe, D., Johnston, J.S., Kennedy, R.C., Koo, H., Kravitz, S., Kriventseva, E.V., Kulp, D., Labutti, K., Lee, E., Li, S., Lovin, D.D., Mao, C., Mauceli, E., Menck, C.F., Miller, J.R., Montgomery, P., Mori, A., Nascimento, A.L., Naveira, H.F., Nusbaum, C., O'Leary, S., Orvis, J., Pertea, M., Quesneville, H., Reidenbach, K.R., Rogers, Y.H., Roth, C.W., Schneider, J.R., Schatz, M., Shumway, M., Stanke, M., Stinson, E.O., Tubio, J.M., Vanzee, J.P., Verjovski-Almeida, S., Werner, D., White, O., Wyder, S., Zeng, Q., Zhao, Q., Zhao, Y., Hill, C.A., Raikhel, A.S., Soares, M.B.,

- Knudson, D.L., Lee, N.H., Galagan, J., Salzberg, S.L., Paulsen, I.T., Dimopoulos, G., Collins, F.H., Birren, B., Fraser-Liggett, C.M., Severson, D.W., 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316, 1718–1723.
- Nikou, D., Ranson, H., Hemingway, J., 2003. An adult-specific *CYP6P450* gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318, 91–102.
- Petersen, R.A., Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2001. Expression of *CYP6B1* and *CYP6B3* cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 679–690.
- Petrulis, J.R., Perdew, G.H., 2002. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem. Biol. Interact.* 141, 25–40.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- R Development Core Team, 2007. R: a language and environment for statistical computing. <<http://www.R-project.org>>.
- Raymond, M., 1993. PROBIT software: CNRS UMII, licence L93019, Avenix, France.
- Sasabe, M., Wen, Z., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2004. Molecular analysis of *CYP321A1*, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. *Gene* 338, 163–175.
- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N., Lumjuan, N., Nelson, D.R., Parakrama Karunaratne, S.H.P., Hemingway, J., Black, W.C., Ranson, H., 2007. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 113–123.
- Suwanchaichinda, C., Brattsten, L.B., 2001. Effect of exposure to pesticides on carbaryl toxicity and cytochrome P450 activities in *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 70, 63–73.
- Suwanchaichinda, C., Brattsten, L.B., 2002. Induction of microsomal cytochrome P450s by tire-leachate compounds, habitat components of *Aedes albopictus* mosquito larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 49, 71–79.
- Van Asperen, K., 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8, 401–408.
- Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A.C., David, J.P., Kafatos, F.C., Louis, C., et al., 2005. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol. Biol.* 14, 509–521.
- Waxman, D.J., 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 11–23.
- Wen, Z., Pan, L., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2003. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* *CYP6B1* co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 937–947.
- Willoughby, L., Chung, H., Lumb, C., Robin, C., Batterham, P., Daborn, P.J., 2006. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 934–942.
- Willoughby, L., Batterham, P., Daborn, P.J., 2007. Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. *Pest. Manag. Sci.* 63, 803–808.
- Yu, S.J., 1996. Insect glutathione S-transferases. *Zool. Stud.* 35, 9–19.
- Yuen, T., Wurmbach, E., Pfeffer, R.L., Ebersole, B.J., Sealfon, S.C., 2002. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 30, e48.

Publication II



Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics[☆]

Muhammad Asam Riaz^a, Rodolphe Poupardin^a, Stéphane Reynaud^a, Clare Strode^b, Hilary Ranson^b, Jean-Philippe David^{a,*}

^a Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, UMR CNRS 5553), équipe Perturbation Environnementales et Xenobiotiques, France

^b Vector Research Group, Liverpool School of Tropical Medicine, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2008

Received in revised form 19 March 2009

Accepted 20 March 2009

Keywords:

Mosquitoes

Aedes aegypti

Induction

Resistance

Insecticides

Xenobiotics

Detoxification

Cytochrome P450 monooxygenases

Glutathione S-transferases

Esterases

Oxidative stress

ABSTRACT

The effect of exposure of *Aedes aegypti* larvae for 72 h to sub-lethal concentrations of the herbicide glyphosate and the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene on their subsequent tolerance to the chemical insecticides imidacloprid, permethrin and propoxur, detoxification enzyme activities and transcription of detoxification genes was investigated. Bioassays revealed a significant increase in larval tolerance to imidacloprid and permethrin following exposure to benzo[a]pyrene and glyphosate. Larval tolerance to propoxur increased moderately after exposure to benzo[a]pyrene while a minor increased tolerance was observed after exposure to glyphosate. Cytochrome P450 monooxygenases activities were strongly induced in larvae exposed to benzo[a]pyrene and moderately induced in larvae exposed to imidacloprid and glyphosate. Larval glutathione S-transferases activities were strongly induced after exposure to propoxur and moderately induced after exposure to benzo[a]pyrene and glyphosate. Larval esterase activities were considerably induced after exposure to propoxur but only slightly induced by other xenobiotics. Microarray screening of 290 detoxification genes following exposure to each xenobiotic with the DNA microarray *Aedes Detox Chip* identified multiple detoxification and red/ox genes induced by xenobiotics and insecticides. Further transcription studies using real-time quantitative RT-PCR confirmed the induction of multiple P450 genes, 1 carboxy/choline esterase gene and 2 red/ox genes by insecticides and xenobiotics. Overall, this study reveals the potential of benzo[a]pyrene and glyphosate to affect the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides, possibly through the cross-induction of particular genes encoding detoxification enzymes.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mosquitoes transmit numerous human and animal pathogens and chemical insecticides are widely employed in their control. However the success of control programs is now threatened as the repeated exposure of mosquito populations to chemical insecticides has led to the selection of mutations conferring an increased resistance to these insecticides (Hemingway et al., 2004). Inherited resistance to chemical insecticides is usually caused by mutations

in the protein targeted by the insecticide (target-site resistance) or the increases in the rate of bio-degradation of the insecticide (metabolic resistance). Considerable research efforts are focused on elucidating the molecular basis of these resistance mechanisms but less attention has been paid to the short-term effect of exposure to insecticides or other xenobiotics on the mosquitoes' tolerance to insecticides and yet this could also have a significant impact on the efficacy of mosquito control. More precisely, it can be hypothesized that in polluted environments, xenobiotics found in mosquito habitats may induce particular enzymes involved in the degradation of chemical insecticides, leading to an increased tolerance of mosquitoes to insecticides. This is supported by the capacity of detoxification enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases (P450s or CYP for genes), glutathione S-transferases (GSTs) and carboxy/choline esterases (CCEs), to be induced by various chemicals (Hemingway et al., 2002, 2004; Feyereisen, 2005).

To date, few studies have investigated molecular interactions between other environmental xenobiotics and insecticides in aquatic insects. Exposure of *Ae. albopictus* larvae to benzothiazole (a major leachate compound of automobile tires) and

[☆] Data deposition: The description of the microarray 'Aedes Detox Chip' can be accessed at <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>. Experimental microarray data have been deposited at VectorBase.org and can be accessed at: [http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/experiment/Larval%20response%20to%20%20pollutants%20and%20%20insecticides%20\(Riaz%20et%20al.,%202009\)](http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/experiment/Larval%20response%20to%20%20pollutants%20and%20%20insecticides%20(Riaz%20et%20al.,%202009)).

* Corresponding author at: Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR CNRS-Université 5553, Unit Perturbations Environnementales et Xenobiotiques, Domaine Universitaire de Saint-Martin d'Hères, 2233, rue de la piscine Bât D Biologie, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France. Tel.: +33 476 51 44 59; fax: +33 476 51 44 63.

E-mail address: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr (J.-P. David).

pentachlorophenol (a wood-protecting agent) increased their tolerance to different types of insecticides such as carbaryl, rotenone and temephos (Suwanachinda and Brattsten, 2001, 2002). This increased tolerance was correlated with an induction of P450 activity. Recently, microarray-based approaches have been used to investigate the effect of xenobiotic exposure on the transcription of detoxification genes in *Drosophila*. The barbiturate phenobarbital and the herbicide atrazine induced the transcription of multiple CYPs and GSTs in adult flies including genes previously linked to insecticide resistance (Le Goff et al., 2006). In mammals, a causal link between the induction of particular detoxification enzymes by xenobiotics and their ability to metabolize them has been demonstrated and successfully utilized to identify drug metabolizing enzymes (Waxman, 1999; Luo et al., 2004). This approach was also used to identify two CYP6 genes in *Papilio polyxenes* metabolizing furanocoumarins, toxins produced by their host plant (Petersen et al., 2001; Wen et al., 2003). Hence, studying the induction profile of insect detoxification enzymes has been suggested as a mean to identify the major enzymes involved in insecticide detoxification. In *Drosophila*, exposure to high concentrations of insecticides induced the transcription of few detoxification genes while two known inducers (phenobarbital and caffeine) and piperonyl butoxide induced multiple detoxification genes, including those involved in insecticide metabolism (Willoughby et al., 2006, 2007). In mosquitoes, insecticides have also been shown to induce detoxification enzymes. By using a microarray representing more than 11,000 unique ESTs, Vontas et al. (2005) identified *Anopheles gambiae* detoxification genes induced by the insecticide permethrin. Recently, we used *Ae. aegypti* larvae to study the interactions between three environmental pollutants and three chemical insecticides (Poupardin et al., 2008). This study revealed that exposing mosquito larvae to sub-lethal concentrations of the herbicide atrazine, copper sulfate and fluoranthene increased their tolerance to the pyrethroid insecticide permethrin and the organophosphate insecticide temephos. In these experiments, increased tolerance was correlated to an elevation of detoxification enzyme activities and, by using a DNA microarray approach, specific detoxification genes induced by these xenobiotics were identified (Poupardin et al., 2008).

The objective of the current study was to determine whether other environmental xenobiotics found in polluted mosquito breeding sites also impacted on the mosquitoes' tolerance to chemical insecticides. Glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine, trade name Roundup) is a soluble systemic herbicide. It is used massively on crops genetically engineered to resist its effects (Roy, 2004; Young, 2006). Although glyphosate does not seem to generate a significant toxicity on most arthropods (Haughton et al., 2001; Jackson and Pitre, 2004), its indirect potential effects on insect ability to resist insecticides have not yet been investigated. Concentrations of glyphosate up to 1 mg/L have been recorded in pools or streams near agricultural areas (Wan et al., 2006) suggesting that mosquito larvae near treated areas can be temporarily exposed to high concentrations of this herbicide and its metabolites. The polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) benzo[a]pyrene is a common product of incomplete combustion of fossil fuels such as coal, diesel and gasoline (Bostrom et al., 2002; Pengchai et al., 2003). This hydrophobic pollutant has been found at concentrations up to 5 ppm adsorbed on particles from various ecosystems (Lewis et al., 1999; Lambert and Lane, 2004) and is likely to be in contact with mosquito larvae, commonly feeding on small particles, in breeding sites located in proximity of industrial or urban areas (Hassanien and Abdel-Latif, 2008). In vertebrates, planar aromatic hydrocarbons can trigger the induction of CYP genes via the intracellular aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Goksoy and Husoy, 1998). As these genes have been frequently involved in metabolic resistance to chemical insecticides in insects, it can be hypothesized that benzo[a]pyrene

has an impact on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides.

In the present study, we investigate the capacity of glyphosate and benzo[a]pyrene to modify the tolerance of *Ae. aegypti* larvae to three different chemical insecticides used worldwide for controlling mosquito populations (permethrin, imidacloprid and propoxur). We exposed mosquito larvae for 72 h to sub-lethal concentrations of each chemical before comparing their larval tolerance to each insecticide and their detoxification enzyme activities. Transcription pattern of 290 detoxification genes following exposure to xenobiotics and insecticides were compared by using the microarray 'Aedes Detox Chip' (Strode et al., 2008) and validated by real-time quantitative RT-PCR. Overall, our work suggests that the induction of detoxification enzymes involved in insecticide metabolism by benzo[a]pyrene and glyphosate may enhance the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides.

2. Materials and methods

2.1. Mosquitoes and xenobiotics

A laboratory strain of *Ae. aegypti* (Bora–Bora strain, susceptible to insecticides) was reared in standard insectary conditions (26 °C, 8 h/12 h light/dark period, tap water) and used for all experiments. This mosquito species is an important vector of human pathogens such as dengue hemorrhagic fever and is often found in close proximity to urban, sub-urban and industrial areas (Dutta et al., 1999). Larvae were reared in insectary conditions with controlled amount of larval food (hay pellets) for 3 days before exposure for 72 h to two different xenobiotics likely to be found in highly polluted mosquito larvae habitats: the herbicide glyphosate (trade name Roundup, Monsanto, Belgium) and the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) benzo[a]pyrene (Fluka, USA).

2.2. Pre-exposure of mosquito larvae to xenobiotics

Pre-exposures to xenobiotics were performed in triplicate with 100 homogenous 2nd stage larvae in 200 mL of tap water containing 50 mg of ground larval food (hay pellets). Concentrations of xenobiotics used for larval pre-exposure were chosen according to the concentrations likely to be found in highly polluted mosquito breeding sites (INERIS, <http://www.ineris.fr/rsde/>). Prior to bioassays with insecticides, larvae were exposed for 72 h to 0.1 or 1 μ M benzo[a]pyrene and glyphosate separately. After 72 h, 4th stage larvae were collected, rinsed twice in tap water and immediately used for bioassays. Biochemical and molecular analysis were performed on the mosquitoes pre-exposed in the same manner but in addition to benzo[a]pyrene and glyphosate, the effect of pre-exposure to three chemical insecticides on enzyme activity and gene transcription was also investigated. Three insecticides massively employed worldwide for mosquito control, belonging to different chemical classes and having different modes of action were used: the neonicotinoid imidacloprid (Sigma–Aldrich, Germany), the pyrethroid permethrin (Chem Service, USA) and the carbamate propoxur (Sigma–Aldrich, Germany). For insecticide pre-exposures, a concentration resulting in 10–15% larval mortality after 72 h exposure was selected. This low mortality threshold was chosen in order to minimize the effect of the artificial selection of particular phenotypes more resistant to the insecticide during pre-exposure. Concentrations of xenobiotics used for pre-exposure were: 1 μ M (169.1 μ g/L) glyphosate, 1 μ M (252.3 μ g/L) benzo[a]pyrene, 25 μ g/L imidacloprid, 1 μ g/L permethrin and 200 μ g/L propoxur. For benzo[a]pyrene, the water solubility limit (\sim 10 μ g/L) was exceeded in order to mimic an aquatic environment highly contaminated with benzo[a]pyrene where mosquito larvae can ingest high dose of this pollutant

together with food particles or as micro-crystals. After 72 h, 4th stage larvae were collected, rinsed twice in tap water and immediately used for the determination of detoxification enzyme activities and RNA extractions. All larval pre-exposures were repeated three times with egg batches from different generations.

2.3. Bioassays with insecticides

Larval bioassays were conducted comparatively on larvae exposed to glyphosate or benzo[a]pyrene and unexposed larvae (controls) with the 3 chemical insecticides imidacloprid, permethrin and propoxur. Bioassays were performed in triplicate with 25 larvae in 50 mL insecticide solution and repeated 3 times with larvae from different xenobiotic exposure experiments (see above). Four different insecticide concentrations leading to larval mortality ranging from 5% to 95% were used. Imidacloprid, permethrin and propoxur were used at 300–2750, 2.5–10 and 400–1000 $\mu\text{g/L}$, respectively. Larval mortality was monitored after 24 h contact with insecticide and further analyzed using the Log-Probit software developed by Raymond (1993). For each insecticide, the mean LC_{50} was determined and tolerance ratios for larvae exposed to each xenobiotic comparatively with unexposed larvae were calculated and expressed as fold increased tolerance. Because comparison of LC_{50} values may not well represent differential tolerance across all concentrations of insecticide used for bioassays, differential insecticide tolerance between larvae exposed to each xenobiotics and controls was further analyzed as described in Poupardin et al. (2008) by generating a Generalized Linear Model (GLM) from mortality data followed by a likelihood ratio test using R software (R Development Core Team, 2007).

2.4. Glutathione S-transferase activities

Glutathione S-transferase (GST) activities were measured on cytosolic fractions using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB; Sigma–Aldrich, Germany) as substrate (Habig et al., 1974). One gram of fresh larvae were homogenised 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 centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4°C and the resulting supernatant was ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4°C . Protein content of the cytosolic fraction (100,000 g supernatant) was determined by the Bradford method before measuring GST activities. The reaction mixture contained 200 μg protein, 2.5 mL of 0.1 M phosphate buffer 1.5 mM reduced glutathione (Sigma) and 1.5 mM CDNB. The absorbance of the reaction was measured after 1 min at 340 nm with a UVIKON 930 spectrophotometer. Results were expressed as median nanomoles of conjugated CDNB per mg of protein per minute \pm interquartile ranges (IQR). Three biological replicates per treatment were made and each measurement was repeated 6 times. Statistical comparison of GST activities between controls and pre-exposed larvae was performed by using a Mann and Whitney test ($N=3$).

2.5. Cytochrome P450 monooxygenase activities

P450 monooxygenase activities were comparatively evaluated by measuring ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) activities on microsomal fractions based on the microfluorimetric method of De Sousa et al. (1995). For each sample, the microsomal fraction was obtained from 100,000 g pellet (see above) and resuspended in 0.05 M phosphate buffer before measuring microsomal protein content by the Bradford method. Twenty micrograms microsomal proteins were then added to 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.4 mM 7-ethoxycoumarin (7-Ec, Fluka) and 0.1 mM NADPH for a total reaction volume of 100 μl and incubated at 30°C . After 15 min, the reaction was stopped and the production

of 7-hydroxycoumarin (7-OH) was evaluated by measuring the fluorescence of each well (380 nm excitation, 460 nm emission) with a Fluoroskan Ascent spectrofluorimeter (Labsystems, Helsinki, Finland) in comparison with a scale of 7-OH (Sigma). P450 activities were expressed as median picomoles of 7-OH per mg of microsomal protein per minute \pm IQR. Three biological replicates per treatment were made and each measure was repeated 8 times. Statistical comparison of P450 activities between controls and pre-exposed larvae was performed by using a Mann and Whitney test ($N=3$).

2.6. Esterase activities

Esterases activities were comparatively measured on cytosolic fractions from the 100,000 g supernatant (see above) according to the method described by Van Asperen (1962) with α -naphthylacetate and β -naphthylacetate used as substrates (α -NA and β -NA, Sigma–Aldrich, Germany). Thirty micrograms cytosolic proteins were added to 0.025 mM phosphate buffer (pH 6.5) with 0.5 mM of α -NA or β -NA for a total volume reaction of 180 μl and incubated at 30°C . After 15 min, the reaction was stopped by the addition of 20 μl 10 mM Fast Garnett (Sigma) and 0.1 M sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma–Aldrich, Germany). The production of α - or β -naphthol was measured at 550 nm with a Σ 960 microplate reader (Metertech, Taipei, Taiwan) in comparison with a scale of α -naphthol or β -naphthol and expressed as median μmoles of α - or β -naphthol per mg of cytosolic protein per minute \pm IQR. Three biological replicates per treatment were made and each measure was repeated 8 times. Statistical comparison of esterases activities between controls and pre-exposed larvae was performed by using a Mann and Whitney test ($N=3$).

2.7. Microarray screening of detoxification genes induced after xenobiotic exposure

The 'Aedes detox chip' DNA-microarray developed by Strode et al. (2008) was used to monitor changes in the transcription of multiple detoxification genes in larvae exposed to each xenobiotic compared to unexposed larvae. This microarray contains 318 70-mer probes representing 290 detoxification genes including all cytochrome P450 monooxygenases (P450s), glutathione S-transferases (GSTs), carboxy/cholinesterases (CCEs) and additional enzymes potentially involved in response to oxidative stress from the mosquito *Ae. aegypti*. Each 70-mer probe, plus 6 housekeeping genes and 23 artificial control genes (Universal Lucidea Scorecard, G.E. Health Care, Bucks, UK) were spotted four times on each array.

RNA extractions, cDNA synthesis and labelling reactions were performed independently for each biological replicate. Total RNA was extracted from batches of thirty 4th stage larvae using the PicoPureTM RNA isolation kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed by digesting total RNA samples with DNase I by using the RNase-free DNase Set (Qiagen). Total RNA quantity and quality were assessed by spectrophotometry before further use. Messenger RNAs were amplified using a RiboAmpTM RNA amplification kit (Molecular Devices) according to manufacturer's instructions. Amplified RNAs were checked for quantity and quality by spectrophotometry. For each hybridisation, 8 μg of amplified RNAs were reverse transcribed into labelled cDNA and hybridised to the array as previously described by David et al. (2005). Each comparison was repeated three times with different biological samples. For each biological replicate, 2 hybridisations were performed in which the Cy3 and Cy5 labels were swapped between samples for a total of 6 hybridisations per comparison. All hybridisations were performed against a global reference sample obtained from a pool of amplified RNAs from un-exposed larvae obtained from each biological replicate.

Spot finding, signal quantification and spot superimposition for both dye channels were performed using Genepix 5.1 software (Axon Instruments, Molecular Devices, Union City, CA, USA). For each data set, any spot satisfying one of the following conditions for any channel was removed from the analysis: (i) intensity values less than 300 or more than 65,000, (ii) signal to noise ratio less than 3, (iii) less than 60% of pixel intensity superior to the median of the local background ± 2 . Normalization and statistic analysis were performed on R software (R Development Core Team, 2008) with limma package available on www.bioconductor.org according to Muller et al. (2007). First, background intensities were subtracted to the foreground intensities for both Cy3 (G) and Cy5 (R) intensities. Then, corrected intensities were transformed to intensity log-ratios, $M = \log_2 R/G$, and their corresponding geometrical means, $A = (\log_2 R + \log_2 G)/2$. Data were then normalized using the local intensity-dependent algorithm Lowess (Cleveland and Devlin, 1988). For each comparison, only genes detected in at least 2 of 6 hybridisations were used for further statistical analysis. To assess the data significance, M values were then submitted to a one sample Student's t -test against the baseline value of 1 (equal gene transcription in both samples). Genes showing an transcription ratio >1.5 -fold in either direction and a corrected P -value lower than 0.01 (Benjamini and Hochberg's multiple testing correction) were considered significantly differentially expressed after xenobiotic exposure. In Table 2, M values were transformed into transcription ratios.

2.8. Quantitative real-time RT-PCR

Transcription profiles of 8 particular genes found induced by different xenobiotics in larvae were validated by real-time quantitative RT-PCR using the same RNA samples as used for microarray experiments. Four micrograms of total RNA were treated with DNase I (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with superscript III and oligo-dT₂₀ primer for 60 min at 50 °C according to manufacturer's instructions. Resulting cDNAs were diluted 100 times for real-time quantitative PCR reactions. All primer pairs used for quantitative PCR were tested for generating a unique amplification product by melt curve analysis. Real-time quantitative PCR reactions of 25 μ L were performed in triplicate on an iQ5 system (BioRad) using iQ SYBR Green supermix (BioRad), 0.3 μ M of each primer and 5 μ L of diluted cDNAs according to manufacturer's instructions. For each gene analysed, a cDNA dilution scale from 10 to 100,000 times was performed in order to assess efficiency of PCR. Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method taking into account PCR efficiency (Pfaffl, 2001) and using the two genes encoding the ribosomal protein L8 (*AeRPL8* GenBank accession no. DQ440262) and the ribosomal protein S7 (*AeRPS7* GenBank accession no. EAT38624.1) for normalisation. Results were expressed as mean transcription ratios (\pm SE) between larvae exposed to each xenobiotic or insecticide and unexposed larvae (controls). Only genes showing more than 1.5-fold over-transcription were considered induced.

3. Results

Exposing *Ae. aegypti* larvae to sub-lethal concentrations of the herbicide glyphosate and the PAH benzo[a]pyrene for 72 h affected their subsequent tolerance to insecticides. Overall, exposing larvae to these xenobiotics increased larval tolerance to insecticides with a more pronounced effect observed with higher concentrations of xenobiotics (Table 1). Larval tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid increased after exposure to 1 μ M benzo[a]pyrene and glyphosate (3.51-fold and 1.98-fold increase in LC₅₀, respectively) and also, to a lesser extent, after exposure to 0.1 μ M benzo[a]pyrene and glyphosate (1.83-fold and 1.70-fold, respec-

Table 1
Differential tolerance of *Ae. aegypti* larvae to imidacloprid, permethrin and propoxur after exposure for 72 h to glyphosate and benzo[a]pyrene[†].

Treatment	Imidacloprid			Permethrin			Propoxur		
	LC50 μ g/L (CI _{95%})	Fold increase tolerance	Likelihood ratio test P -value	LC50 μ g/L (CI _{95%})	Fold increase tolerance	Likelihood ratio test P -value	LC50 μ g/L (CI _{95%})	Fold increase tolerance	Likelihood ratio test P -value
Control	819.5 (650.5–1020.9)	–	–	7.6 (5.8–11.3)	–	–	731.4 (646.4–833.9)	–	–
Benzo[a]pyrene 0.1 μ M	1502.9 (1158.9–1987.2)	1.83	***	13.1 (8.7–29.9)	1.72	***	877.9 (797.1–979.3)	1.20	**
Benzo[a]pyrene 1 μ M	2880.4 (2162.0–4065.2)	3.51	***	13.6 (9.0–31.9)	1.78	***	1015.4 (913.3–1155.2)	1.39	***
Glyphosate 0.1 μ M	1394.1 (1133.1–1729.1)	1.70	***	10.6 (8.0–16.2)	1.39	***	825.3 (733.8–941.5)	1.13	*
Glyphosate 1 μ M	1621.3 (1315.4–2025.0)	1.98	***	12.9 (9.4–21.2)	1.70	***	835.7 (742.7–955.5)	1.14	**

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

[†] Larvae were exposed for 72 h to two sub-lethal concentrations of benzo[a]pyrene and glyphosate. For each treatment, increased tolerance of larvae exposed to each insecticide comparatively to unexposed larvae (controls) was calculated by comparing LC₅₀ values. For each comparison, a Generalized Linear Model (GLM) followed by a likelihood ratio test was used for statistical comparisons of larval tolerance to each insecticide (ns, non-significant).

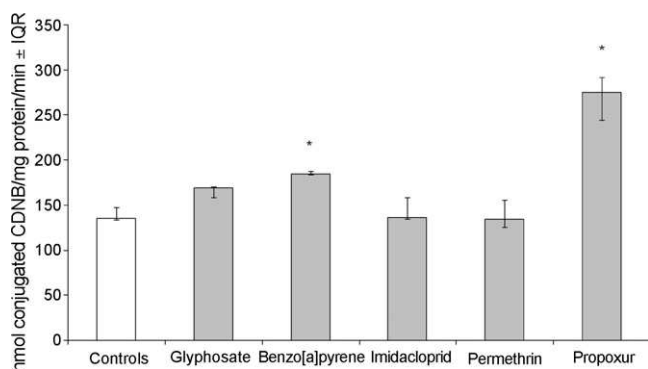


Fig. 1. Differential GST activities of *Ae. aegypti* larvae exposed for 72 h to sub-lethal concentrations of glyphosate, benzo[a]pyrene, imidacloprid, permethrin and propoxur. Larval GST activities were measured with the CDNB method (Habig et al., 1974) on 200 μ g cytosolic proteins during 1 min and expressed as median nmol of conjugated CDNB/mg protein/min \pm interquartile ranges (IQR). For each treatment, statistical comparison of larval GST activities between xenobiotic-exposed larvae and controls were performed with a Mann and Whitney's test ($N=3$, * $P<0.05$).

tively). Larval tolerance to the pyrethroid insecticide permethrin increased after exposure to 1 μ M benzo[a]pyrene or glyphosate (1.78-fold and 1.72-fold, respectively). This increased tolerance to permethrin remains even when using 0.1 μ M benzo[a]pyrene (1.72-fold) but decreased when using 0.1 μ M glyphosate (1.39-fold). Larval tolerance to the carbamate insecticide propoxur was only slightly enhanced after exposure to the highest concentration of benzo[a]pyrene and glyphosate (1.39-fold and 1.14-fold, respectively).

Larval exposure to xenobiotics and insecticides led to significant modifications of their GST, P450 and esterases activities, as measured using model substrates. GST activity with CDNB (Fig. 1) was strongly induced after exposure to propoxur (2.04-fold with $P<0.05$). Exposure of larvae to benzo[a]pyrene also slightly induced GST activity (1.37-fold and $P<0.05$) while exposure to glyphosate, imidacloprid and permethrin did not significantly affect larval GST activities. Microsomal P450 activities (Fig. 2) were significantly induced after exposing larvae to benzo[a]pyrene (2.09-fold with $P<0.05$) while no significant changes were observed after exposure to other xenobiotics. Significant modifications of esterase activities were observed in larvae exposed to xenobiotics and insecticides (Fig. 3). Alpha-esterase activities were highly induced in larvae

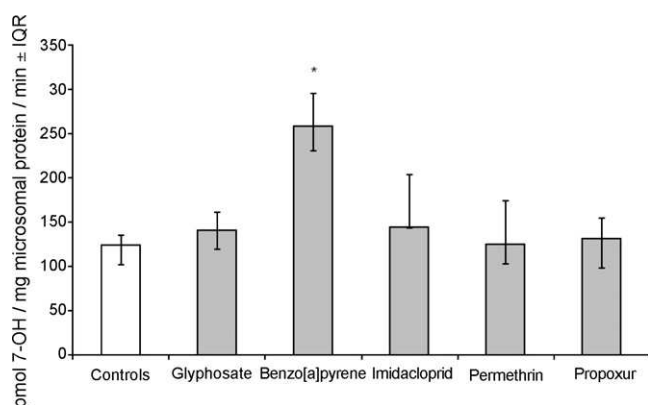


Fig. 2. Differential microsomal P450 activities of *Ae. aegypti* larvae exposed for 72 h to sub-lethal concentrations of glyphosate, benzo[a]pyrene, imidacloprid, permethrin and propoxur. Larval P450 activities were measured with the ECOD method (De Sousa et al., 1995) on 20 μ g microsomal proteins after 15 min and expressed as median pmol of 7-OH/mg microsomal protein/minute \pm interquartile ranges (IQR). For each treatment, statistical comparison of larval P450 activities between xenobiotic-exposed larvae and controls were performed with a Mann and Whitney's test ($N=3$, * $P<0.05$).

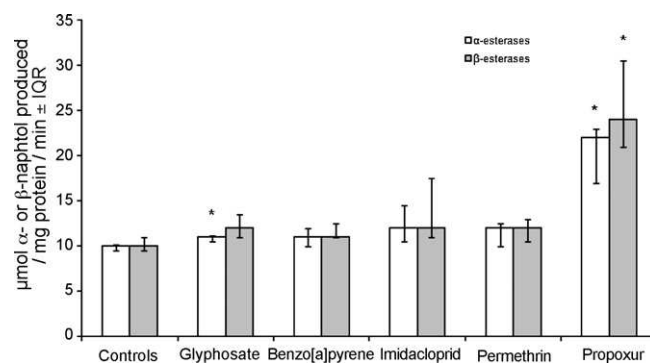


Fig. 3. Differential esterase activities of *Ae. aegypti* larvae exposed for 72 h to sub-lethal concentrations of five different xenobiotics (glyphosate, benzo[a]pyrene, imidacloprid, permethrin and propoxur). Larval α -esterase and β -esterase activities were measured with α -naphthyl-acetate and β -naphthyl-acetate as substrates on 30 μ g cytosolic proteins during 15 min and expressed as median μ mol of α - or β -naphthol/mg protein/min \pm interquartile ranges (IQR). Statistical comparison of larval esterases activities between xenobiotic-exposed larvae and controls were performed with a Mann and Whitney's test ($N=3$, * $P<0.05$).

exposed to propoxur (2.20-fold with $P<0.05$), slightly significantly elevated after exposure to glyphosate (1.10-fold with $P<0.05$) while no significant induction was observed with other xenobiotics. Similarly, β -esterase activities were highly induced in larvae after exposure to propoxur (2.40-fold with $P<0.05$) but no significant induction was observed with other xenobiotics.

By using the microarray 'Aedes Detox Chip' representing 290 *Ae. aegypti* genes encoding detoxification and red/ox enzymes (Strode et al., 2008), 23 detoxification genes significantly induced in 4th stage larvae following a 72 h exposure to a sub-lethal concentration of xenobiotics or insecticides were identified (Table 2 and Suppl. Table 1). Among them, 9 genes encode P450s (CYPs), 4 encode GSTs, 3 encode carboxy/cholineesterases (CCEs) and 7 encode enzymes putatively involved in response to oxidative stress (red/ox enzymes). Larvae exposed to the herbicide glyphosate showed a significant induction of 5 CYPs (CYP6N11, CYP6N12, CYP6Z6, CYP6AG7 and CYP325AA1), 3 GSTs (AaGSTe4, AaGSTe7, AaGSTi1 and AaGSTs1-2) and 1 glutathione peroxidase. Exposing larvae to benzo[a]pyrene significantly induced 3 CYP genes (CYP6Z6, CYP6Z8 and CYP9M5), 2 GSTs (AaGSTi1 and AaGSTs1-2) and 2 red/ox genes (1 superoxide dismutase and 1 reductase). Exposure to imidacloprid significantly induced 2 CYPs (CYP4G36 and CYP6CC1), 1 GST (AaGSTs1-2), 3 CCEs (CCEae1o, CCEae2o and CCEae3o) and 6 red/ox genes including a superoxide dismutase, 4 peroxidases and 1 reductase. Exposure to a sub-lethal concentration of the pyrethroid insecticide permethrin significantly induced only one CCE (CCEae3o). Propoxur exposure revealed a significant over-transcription of 1 GST (AaGSTi1), 1 CCE (CCEae3o) and 1 superoxide dismutase. Finally, microarray screening revealed that different chemicals can significantly induce identical genes such as CYP6Z6 induced by glyphosate and benzo[a]pyrene, AaGSTi1 induced by glyphosate, benzo[a]pyrene and propoxur and CCEae3o induced by the insecticides imidacloprid, permethrin and propoxur.

Real-time quantitative RT-PCR was used to validate the transcription pattern of 8 genes selected from microarray experiments (Fig. 4). Overall, the induction patterns obtained from microarray screening and real-time quantitative RT-PCR were in good agreement (Pearson correlation coefficient $r=0.745$, $P<0.001$). The induction of CYP6Z6, CYP6Z8, CYP9M5 and superoxide dismutase (AAEL006271-RA) by benzo[a]pyrene was confirmed (3.1-fold, 4.4-fold, 3.4-fold and 2.6-fold, respectively). Likewise, the induction of CCEae3o (3.0-fold) and TPx2 (2.0-fold) by imidacloprid was confirmed. High induction ratios were obtained for CYP6Z8 and CYP9M5 (benzo[a]pyrene 4.4-fold and 3.4-fold, respectively). Finally, the

Table 2
Microarray analysis of the induction of detoxification genes in *Ae. aegypti* larvae after 72 h exposure to xenobiotics and insecticides^a.

Gene name/annotation	Transcript ID	Glyphosate		Benzo[a]pyrene		Imidacloprid		Permethrin		Propoxur	
		Ratio	P value	Ratio	P value	Ratio	P value	Ratio	P value	Ratio	P value
Cytochrome P450 monooxygenases											
<i>CYP4G36</i>	AAEL004054-RA	ND	ND	ND	ND	1.77	8.3E-08	1.00	9.8E-01	1.04	6.8E-01
<i>CYP6N11</i>	AAEL009138-RA	1.75	2.1E-14	1.30	1.2E-03	0.88	4.0E-01	0.95	4.4E-01	1.07	4.6E-01
<i>CYP6N12</i>	AAEL009124-RA	1.68	4.2E-13	1.42	3.4E-12	0.86	1.6E-04	0.68	4.0E-12	1.04	2.0E-01
<i>CYP6Z6</i>	AAEL009123-RA	1.52	4.6E-14	1.96	3.9E-19	0.95	5.9E-02	1.06	3.5E-02	1.26	4.3E-09
<i>CYP6Z8</i>	AAEL009131-RA	1.09	8.8E-03	2.08	4.1E-17	0.86	1.9E-04	0.90	9.7E-04	0.81	2.9E-03
<i>CYP6AG7</i>	AAEL006989-RA	1.58	6.1E-09	1.06	2.6E-01	1.10	9.2E-02	0.87	1.6E-01	0.83	1.2E-02
<i>CYP6CC1</i>	AAEL014890-RA	0.47	4.6E-14	0.70	1.5E-05	1.63	1.2E-10	1.10	1.9E-02	1.18	1.4E-01
<i>CYP9M5</i>	AAEL001288-RA	1.49	6.8E-12	3.08	3.0E-13	1.10	6.1E-02	0.94	2.5E-01	1.48	3.4E-05
<i>CYP325AA1</i>	AAEL004012-RA	2.03	2.9E-12	1.46	2.5E-03	1.00	1.0E+00	1.25	1.6E-04	1.85	1.8E-02
Glutathione S-transferases											
<i>AaGSTe4</i>	AAEL007962-RA	1.61	2.0E-20	1.37	4.8E-11	1.42	2.1E-10	1.03	3.5E-01	1.10	1.9E-01
<i>AaGSTe7</i>	AAEL007948-RA	1.56	3.2E-15	1.18	7.2E-08	0.93	5.4E-02	0.85	8.5E-06	1.02	5.6E-01
<i>AaGSTi1</i>	AAEL011752-RA	2.74	1.0E-23	2.33	2.9E-13	0.76	4.0E-02	0.87	2.1E-01	3.10	4.8E-10
<i>AaGSTs1-2</i>	AAEL011741-RB	ND	ND	1.60	5.1E-04	3.98	6.3E-09	ND	ND	ND	ND
Carboxylesterases											
<i>CCEae1o</i>	AAEL004341-RA	ND	ND	1.06	4.6E-01	2.59	2.2E-06	1.49	1.8E-01	1.49	1.2E-04
<i>CCEae2o</i>	AAEL007486-RA	0.72	2.5E-11	0.96	2.2E-01	1.56	1.3E-09	1.16	3.2E-04	1.13	9.9E-03
<i>CCEae3o</i>	AAEL011944-RA	0.27	4.8E-11	0.88	1.6E-03	4.34	1.4E-16	1.67	8.4E-10	1.75	2.6E-08
Red/ox enzymes											
<i>Superoxide dismutase</i>	AAEL006271-RA	1.19	1.5E-06	1.89	9.8E-18	2.51	7.8E-10	1.39	2.4E-07	1.50	2.3E-09
<i>Peroxidasin</i>	AAEL000376-RA	ND	ND	1.21	6.5E-01	1.77	6.3E-04	ND	ND	ND	ND
<i>Peroxidase</i>	AAEL013171-RA	0.77	8.0E-07	0.94	5.3E-02	1.67	5.8E-14	1.29	1.8E-07	1.29	7.5E-07
<i>Glutathione peroxidase</i>	AAEL000495-RA	1.76	4.2E-06	1.45	9.4E-04	2.05	1.2E-05	0.76	2.5E-01	1.22	3.3E-02
<i>Thioredoxin peroxidase Tpx2</i>	AAEL004112-RA	ND	ND	1.27	2.3E-01	2.19	4.3E-04	ND	ND	1.22	4.2E-01
<i>Aldo-keto reductase</i>	AAEL007275-RA	ND	ND	0.76	3.2E-02	1.88	1.3E-05	0.93	8.1E-01	1.09	3.9E-02
<i>Aldo-keto reductase</i>	AAEL015002-RA	1.03	8.4E-01	1.94	4.3E-04	1.35	3.6E-01	1.50	3.8E-03	1.59	2.4E-03

^a Larvae were exposed for 72 h to sub-lethal concentrations of five different insecticides and xenobiotics (permethrin, imidacloprid, propoxur, benzo[a]pyrene and glyphosate) before microarray analysis of the transcription of detoxification genes. Only genes showing a significant over-transcription (ratio > 1.5 and P value < 1.0E-03) after a minimum of one treatment are shown. Transcription ratios between treated larvae and controls are indicated for each treatment. Transcription ratios and P values of genes significantly induced are shown in bold. ND: Gene not detected in at least 3 hybridisations out of 6.

slight induction of *CYP6Z6*, *AaGSTe4* and *AaGSTe7* by glyphosate, *CCEae3o* by permethrin and propoxur and superoxide dismutase (*AAEL006271-RA*) by imidacloprid and propoxur were confirmed by real-time quantitative RT-PCR. The most important discrepancies between the two techniques were obtained for *CYP6Z8* with benzo[a]pyrene (4.4-fold in qRT-PCR and only 2.0-fold in microarray) and *CCEae3o* with imidacloprid (3.0-fold in qRT-PCR and 4.34-fold in microarray).

Comparison of the transcription levels of those 8 detoxification genes in 4th stage larvae revealed differences in their basal transcription level (Fig. 5). As expected, transcription of detoxification genes was considerably lower than the transcription of the house-

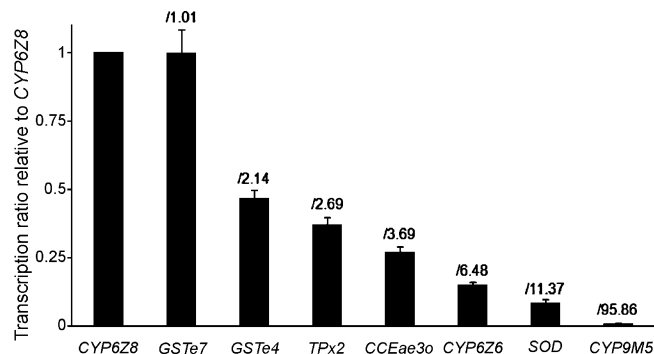


Fig. 5. Constitutive transcription levels of 8 selected genes in *Ae. aegypti* larvae. Gene transcription was measured by real-time quantitative RT-PCR in 4th-stage larvae in absence of xenobiotics. transcription levels were normalized with the housekeeping gene *AeRPL8* and are shown as transcription ratios relative to *CYP6Z8*, the detoxification gene showing the highest transcription level (mean \pm SE). Fold transcription is indicated above each bar.

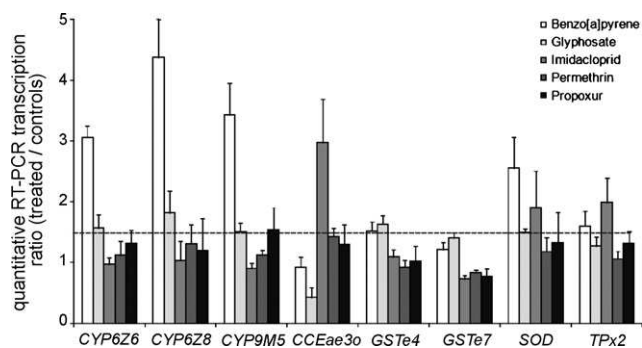


Fig. 4. Comparative real-time quantitative RT-PCR analysis of the differential transcription of 8 selected genes in *Ae. aegypti* larvae exposed for 72 h to sub-lethal concentrations of glyphosate, benzo[a]pyrene, imidacloprid, permethrin and propoxur. Gene transcription values are indicated as transcription ratios (\pm SE) in larvae exposed to each xenobiotic comparatively to unexposed larvae (controls). The housekeeping genes *AeRPL8* and *AeRPS7* were used as internal controls for normalization. Horizontal broken line indicates a 1.5-fold over-transcription in treated larvae as compared to controls.

keeping gene *AeRPL8* (from 33 to >3200-fold reduction). Among detoxification genes, larval basal transcription levels vary greatly, with *CYP6Z8* and *GSTe7* showing the highest transcription levels, *GSTe4*, *TPx2*, *CCEae3o*, *CYP6Z6* and *SOD* being moderately transcribed (2–11-fold reduction comparatively to *CYP6Z8*) and *CYP9M5* being transcribed at very low level in 4th-stage larvae (95-fold reduction comparatively to *CYP6Z8*).

4. Discussion

Lasting recent decades, the amount of anthropogenic xenobiotics released into natural ecosystems has dramatically increased. Although the effect of these chemicals on human health is inten-

sively studied, their impact on insect metabolism and insecticide resistance mechanisms remains poorly understood. Here we investigated the potential of the herbicide glyphosate and the PAH benzo[a]pyrene, likely to be found in polluted mosquito breeding sites, to modify the tolerance of mosquito larvae to 3 chemical insecticides through the induction of detoxification enzymes.

We showed that the presence of these xenobiotics in the water where mosquito larvae develop can significantly increase their tolerance to insecticides, particularly the pyrethroid permethrin and the neonicotinoid imidacloprid. Although the increases in insecticide tolerance reported here are lower than inherited resistance levels obtained after many generations of selection with insecticides, our results show that the presence of these xenobiotics may contribute to insecticide tolerance in mosquito larvae. This phenomenon might be more pronounced in highly polluted mosquito breeding sites or following a temporary dramatic pollution event. Recently, we also showed that exposing *Ae. aegypti* larvae for 24 h to low concentrations of the herbicide atrazine and the PAH fluoranthene increase their tolerance to the insecticide permethrin and temephos (Poupardin et al., 2008). Suwanachinda and Brattsten (2001) exposed *Ae. albopictus* larvae for 48 h to various herbicides and fungicides before measuring their tolerance to the insecticide carbaryl. Interestingly, no significant effect was observed with atrazine, simazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) while a 70% reduced mortality to carbaryl and a significant increase of P450 activities were observed after exposing larvae to pentachlorophenol.

Many studies have revealed the capacity of insect detoxification enzymes to be induced by xenobiotics and the relationship between elevated detoxifying enzyme levels and tolerance to chemical insecticides (Yu, 1996; Hemingway et al., 2004; Enayati et al., 2005; Feyereisen, 2005). Our work demonstrates that larval GST activities were strongly induced by the insecticide propoxur and to a lesser extent by benzo[a]pyrene. Esterase activities were strongly induced by propoxur but very low effect was observed after exposure to glyphosate, suggesting a limited impact of this pollutant on esterase-related insecticide metabolism. P450 activities appeared strongly induced by benzo[a]pyrene. Overall, our work also suggests that insecticides may not always be the most potent inducers of detoxifying enzymes able to metabolize them. This hypothesis is supported by results obtained in *Drosophila* by Willoughby et al. (2006) showing that short exposures to high lethal concentrations of insecticides only induce few detoxification genes comparatively to other inducers. Benzo[a]pyrene exposure led to the highest increase of larvae tolerance to permethrin and imidacloprid and was also the best inducers of P450 activities. This trend supports the central role of P450s in the tolerance of mosquito larvae to these two insecticides. Poupardin et al. (2008) revealed that fluoranthene, another PAH, strongly induced P450s in mosquito larvae together with enhancing their tolerance to permethrin. The capacity of PAHs to induce P450 activities is well known in vertebrates. Many PAHs induce P450s by binding to the AhR (aryl hydrocarbon receptor) in the cytosol. Upon binding, the transformed receptor translocates to the nucleus where it dimerises with the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and then binds to DNA sequences such as xenobiotic response elements (XREs) located upstream of certain genes. This process increases transcription of certain genes, followed by increased protein production. Recently, XRE-like sequences have been found upstream insect CYP genes involved in xenobiotic metabolism (McDonnell et al., 2004; Brown et al., 2005). Putative XRE-like elements have also been found upstream *An. gambiae* CYP genes induced by the insecticide permethrin (David J.P., unpublished data). Recently, we showed that XRE-like elements are also found upstream *Ae. aegypti* CYP genes induced by fluoranthene (Poupardin et al., 2008). The fact that exposure to different PAHs induce mosquito

larvae P450 activities together with increasing their tolerance to permethrin and imidacloprid might indicate that PAHs have the ability, through an AhR-like nuclear receptor, to induce P450s involved in the degradation of these insecticides in mosquitoes.

We used the microarray *Aedes Detox Chip* (Strode et al., 2008) to identify 23 genes encoding detoxification and red/ox enzymes induced in 4th stage larvae after exposure to benzo[a]pyrene, glyphosate, imidacloprid, permethrin and propoxur. Benzo[a]pyrene induced a significant over-transcription of CYP6Z8, CYP6Z6 and CYP9M5 (Fig. 4). Poupardin et al. (2008) also found CYP6Z8 induced by fluoranthene, copper sulfate and the two insecticides permethrin and temephos. In the malaria vector *An. gambiae*, CYP6Z genes have been frequently found constitutively over-transcribed in insecticide-resistant strains (Nikou et al., 2003; David et al., 2005; Muller et al., 2007). Recent studies demonstrated that the enzyme encoded by *An. gambiae* CYP6Z1 can metabolize the insecticides carbaryl and DDT while CYP6Z2, with a narrower active site, only metabolizes carbaryl (Chiu et al., 2008; McLaughlin et al., 2008). The high transcription level of CYP6Z8 in larvae (Fig. 5) may indicate that this particular P450 play a major role in xenobiotic response during the aquatic larval stage. Although transcription ratios were lower, glyphosate also induced several CYP6s and epsilon GSTs, indicating that this chemical may have an impact on insecticide tolerance through P450 or GST induction.

Epsilon GSTs have been widely implicated in resistance to DDT and pyrethroid insecticides (Ding et al., 2003; Orтели et al., 2003; Lumjuan et al., 2005; Strode et al., 2008). Therefore, the slight induction of GST activities by glyphosate including the specific induction of two epsilon-class GST genes (*GSTe4* and *GSTe7*) might contribute to the improved insecticide tolerance of mosquito larvae exposed to this herbicide.

Two P450s, 1 GST, 3 carboxy/cholinesterases and several genes encoding for enzymes potentially involved in response to oxidative stress were found induced in larvae exposed to imidacloprid. Although esterases have been reported to be potentially involved in cross-resistance between the pyrethroid fenvalerate and imidacloprid in the cotton aphid *Aphis gossypii* (Wang et al., 2002), the direct involvement of esterases in resistance to neonicotinoids remains unclear. In human pulmonary and neuronal cultivated cells, imidacloprid was showed to induce cell toxicity leading to apoptosis (Skandrani et al., 2006). It is known that P450 functioning can generate excess reactive oxygen species, leading to oxidative stress (Zangar et al., 2004) and that P450s are likely to be involved in metabolic resistance to imidacloprid in insects (Le Goff et al., 2003). Therefore, the induction of several genes encoding red/ox enzymes observed after exposing larvae to imidacloprid might result from the generation of excess reactive oxygen species from P450-mediated imidacloprid metabolism.

Overall, our study demonstrated that the herbicide glyphosate and the PAH benzo[a]pyrene likely to be found in polluted mosquito breeding sites were able to increase tolerance of mosquito larvae to different classes of insecticides and suggested that this is the consequence of an induction of particular detoxification enzymes. Considering that only genes belonging to main detoxification and red/ox enzyme families are represented on the '*Aedes detox Chip*', a whole transcriptome analysis will allow identifying additional genes and molecular mechanisms potentially involved in mosquitoes' response to pollutants and insecticides. Our study was focused on the short-term effect of xenobiotics on the phenotypic plasticity associated with the tolerance of mosquito larvae to insecticides. Finally, considering the persistent contamination of wetlands by anthropogenic chemicals and the potential effect of phenotypic plasticity on the selection of particular genes (Ghalambor et al., 2007), the question of the long-term impact of environmental xenobiotics on inherited insecticide resistance also represents an important future research direction.

Acknowledgments

The present research project was co-funded by the French National Research Agency (ANR 'Santé-Environnement Santé-travail' (SEST), grant MOSQUITO-ENV 07SEST014), and the mosquito control unit 'Démoustication Rhône-Alpes'. M.A. Riaz was funded by the higher education commission (HEC) of Pakistan. We are grateful to J. Patouraux and T. Gaudé for technical help. We thank Prof. A. Cossins, Dr. M. Hughes and the Liverpool Microarray User Community for microarray printing. We thank Dr. P. Muller for useful help with microarray analysis and Dr. B. Maccallum for help with microarray data deposition. We are grateful to Prof. P. Ravanel for useful comments on the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.005.

References

- Bostrom, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernstrom, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Ran-nug, A., Tornqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 110, 451–488.
- Brown, R.P., McDonnell, C.M., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2005. Regulation of an insect cytochrome P450 monooxygenase gene (*CYP6B1*) by aryl hydrocarbon and xanthotoxin response cascades. *Gene* 358, 39–52.
- Chiu, T.L., Wen, Z.M., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8855–8860.
- Cleveland, W.S., Devlin, S.J., 1988. Locally weighted regression—an approach to regression-analysis by local fitting. *J. Am. Stat. Assoc.* 83, 596–610.
- David, J.P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P.M., Louis, C., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4080–4084.
- De Sousa, G., Cuany, A., Brun, A., Amichot, M., Rhamani, R., Bergé, J.B., 1995. A microfluorimetric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individuals *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Anal. Biochem.* 229, 86–91.
- Ding, Y.C., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4, 16.
- Dutta, P., Khan, S.A., Khan, A.M., Sharma, C.K., Doloi, P.K., Mahanta, J., 1999. Solid waste pollution and breeding potential of dengue vectors in an urban and industrial environment of Assam. *J. Environ. Biol.* 20, 343–345.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14, 3–8.
- Feyereisen, R., 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, pp. 1–77.
- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P., Reznick, D.N., 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21, 394–407.
- Goksoy, A., Husoy, A.M., 1998. Immunochemical approaches to studies of *CYP1A* localization and induction by xenobiotics in fish. *EXS* 86, 165–202.
- Habig, H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Houghton, A.J., Bell, J.R., Wilcox, A., Boatman, N.D., 2001. The effect of the herbicide glyphosate on non-target spiders: part I. Direct effects on *Lepthyphantes tenuis* under laboratory conditions. *Pest Manage. Sci.* 57, 1033–1036.
- Hassanien, M.A., Abdel-Latif, N.M., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in road dust over Greater Cairo, Egypt. *J. Hazard. Mater.* 151, 247–254.
- Hemingway, J., Field, L., Vontas, J., 2002. An overview of insecticide resistance. *Science* 298, 96–97.
- 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.
- Jackson, R.E., Pitre, H.N., 2004. Influence of roundup ready soybean and roundup ultra herbicide on *Geocoris punctipes* (Say) (Heteroptera: Lygaeidae) in the laboratory. *J. Entomol. Sci.* 39, 56–61.
- Lambert, T.W., Lane, S., 2004. Lead, arsenic, and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and house dust in the communities surrounding the Sydney, Nova Scotia, tar ponds. *Environ. Health Perspect.* 112, 35–41.
- Le Goff, G., Boundy, S., Daborn, P.J., Yen, J.L., Sofer, L., Lind, R., Sabourault, C., Madi-Ravazzi, L., Ffrench-Constant, R.H., 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 701–708.
- Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., Ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R., 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 674–682.
- Lewis, R.G., Fortune, C.R., Willis, R.D., Camann, D.E., Antley, J.T., 1999. Distribution of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in house dust as a function of particle size. *Environ. Health Perspect.* 107, 721–726.
- 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 Biochem. Mol. Biol.* 35, 861–871.
- Luo, G., Guenther, T., Gan, L.S., Humphreys, W.G., 2004. CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr. Drug Metab.* 5, 483–505.
- McDonnell, C.M., Brown, R.P., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2004. Conserved regulatory elements in the promoters of two allelochemical-inducible cytochrome P450 genes differentially regulate transcription. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1129–1139.
- McLaughlin, L.A., Niazi, U., Bibby, J., David, J.P., Vontas, J., Hemingway, J., Ranson, H., Sutcliffe, M.J., Paine, M.J.L., 2008. Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2. *Insect Mol. Biol.* 17, 125–135.
- Muller, P., Donnelly, M.J., Ranson, H., 2007. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics* 8, 36.
- Nikou, D., Ranson, H., Hemingway, J., 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318, 91–102.
- Ortelli, F., Rossiter, L.C., Vontas, J., Ranson, H., Hemingway, J., 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 373, 957–963.
- Pengchai, P., Nakajima, F., Furumai, H., 2003. Estimation of origins of polycyclic aromatic hydrocarbons in size-fractionated road dust in Tokyo with multivariate analysis. In: 7th IWA International Specialised Conference on Diffuse Pollution and Basin Management. IWA Publishing, Dublin, Ireland, pp. 169–175.
- Petersen, R.A., Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2001. Expression of *CYP6B1* and *CYP6B3* cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 679–690.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 6.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 540–551.
- R Development Core Team, 2007. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>.
- Raymond, M., 1993. PROBIT software. CNRS UMII, Licence L93019, Avenix, France.
- Roy, B.A., 2004. Rounding up the costs and benefits of herbicide use. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13974–13975.
- Skandrani, D., Gaubin, Y., Beau, B., Murat, J.C., Vincent, C., Croute, F., 2006. Effect of selected insecticides on growth rate and stress protein expression in cultured human A549 and SH-SY5Y cells. *Toxicol. In Vitro* 20, 1378–1386.
- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R., Drane, D.R., Karunaratne, S., Hemingway, J., Black, W.C., Ranson, H., 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 113–123.
- Suwanchaichinda, C., Brattsten, L.B., 2001. Effects of exposure to pesticides on carbaryl toxicity and cytochrome P450 activities in *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 70, 63–73.
- Suwanchaichinda, C., Brattsten, L.B., 2002. Induction of microsomal cytochrome P450s by tire-leachate compounds, habitat components of *Aedes albopictus* mosquito larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 49, 71–79.
- Van Asperen, K., 1962. A study of housefly esterases by means of sensitive colorimetric methods. *J. Insect Physiol.* 8, 401–408.
- Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A.C., David, J.P., Kafatos, F.C., Louis, C., Hemingway, J., Christophides, G.K., Ranson, H., 2005. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol. Biol.* 14, 509–521.
- Wan, M.T., Kuo, J.N., McPherson, B., Pasternak, J., 2006. Agricultural pesticide residues in farm ditches of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *J. Environ. Sci. Health, Part B: Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 41, 647–669.
- Wang, K.Y., Liu, T.X., Yu, C.H., Jiang, X.Y., Yi, M.Q., 2002. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxification enzymes on cotton and cucumber. *J. Econ. Entomol.* 95, 407–413.
- Waxman, D.J., 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenobiotics: Central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 11–23.
- Wen, Z.M., Pan, L.P., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2003. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 937–947.

- Willoughby, L., Batterham, P., Daborn, P.J., 2007. Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. *Pest Manage. Sci.* 63, 803–808.
- Willoughby, L., Chung, H., Lumb, C., Robin, C., Batterham, P., Daborn, P.J., 2006. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 934–942.
- Young, B.G., 2006. Changes in herbicide use patterns and production practices resulting from glyphosate-resistant crops. *Weed Technol.* 20, 301–307.
- Yu, S.J., 1996. Insect glutathione S-transferases. *Zool. Stud.* 35, 9–19.
- Zangar, R.C., Fan, Y.Y., Chapkin, R.S., 2004. Interactions of phospholipase D and cytochrome P450 protein stability. *Biochem. Pharmacol.* 68, 503–512.

Publication III

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology

Jean-Philippe David*, Eric Coissac, Christelle Melodelima, Rodolphe Poupardin, Muhammad Asam Riaz, Alexia Chandor-Proust and Stéphane Reynaud

Abstract

Background: The control of mosquitoes transmitting infectious diseases relies mainly on the use of chemical insecticides. However, mosquito control programs are now threatened by the emergence of insecticide resistance. Hitherto, most research efforts have been focused on elucidating the molecular basis of inherited resistance. Less attention has been paid to the short-term response of mosquitoes to insecticides and pollutants which could have a significant impact on insecticide efficacy. Here, a combination of LongSAGE and Solexa sequencing was used to perform a deep transcriptome analysis of larvae of the dengue vector *Aedes aegypti* exposed for 48 h to sub-lethal doses of three chemical insecticides and three anthropogenic pollutants.

Results: Thirty millions 20 bp cDNA tags were sequenced, mapped to the mosquito genome and clustered, representing 6850 known genes and 4868 additional clusters not located within predicted genes. Mosquitoes exposed to insecticides or anthropogenic pollutants showed considerable modifications of their transcriptome. Genes encoding cuticular proteins, transporters, and enzymes involved in the mitochondrial respiratory chain and detoxification processes were particularly affected. Genes and molecular mechanisms potentially involved in xenobiotic response and insecticide tolerance were identified.

Conclusions: The method used in the present study appears as a powerful approach for investigating fine transcriptome variations in genome-sequenced organisms and can provide useful informations for the detection of novel transcripts. At the biological level, despite low concentrations and no apparent phenotypic effects, the significant impact of these xenobiotics on mosquito transcriptomes raise important questions about the 'hidden impact' of anthropogenic pollutants on ecosystems and consequences on vector control.

Background

During the past 60 years, the amount of anthropogenic xenobiotics released into natural ecosystems has dramatically increased. Although the effect of these chemicals on human health is intensively studied, their impact on other organisms remains poorly understood. Because pollutants often accumulate in fresh-water bodies and sediments [1], their impact on wetland fauna is of importance for these ecosystems. Among aquatic arthropods found in wetlands, mosquitoes are distributed worldwide and are often exposed to anthropogenic pollutants and insecticides during their aquatic larval stage.

Indeed insecticides are often deliberately introduced into the mosquito habitat in the fight against the many human diseases they transmit (e.g. malaria, dengue fever, yellow fever and filariasis) [2]. As a consequence mosquito control programs are now threatened by the selection of mosquito populations resistant to these chemical insecticides [3]. Differential gene transcription in insecticide-resistant mosquitoes has been frequently used to identify genes putatively involved in inherited metabolic resistance mechanisms [4-7]. For that purpose most approaches used cDNA microarrays and were often focused on genes encoding enzymes potentially involved in the bio-transformation of insecticides molecules [8,9], although recent findings suggest that the differential expression of other

* Correspondence: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

¹ Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, UMR 5553 CNRS - Université Grenoble), France

Full list of author information is available at the end of the article

transcripts may also contribute to insecticide tolerance [4,10]. Less attention has been paid to the short term transcriptome response of insects to xenobiotics, though this may lead to the discovery of novel molecular mechanisms contributing to insecticide tolerance [11-13]. We recently demonstrated that exposing mosquito larvae to low concentrations of pollutants for a few hours can increase their tolerance to chemical insecticides, possibly due to an alteration of the expression of detoxification enzymes [11,12]. In this context, understanding cross responses of mosquitoes to insecticides and pollutants at the whole transcriptome level may ultimately lead to improvements in vector control strategies by optimizing insecticide treatments in polluted areas [7]. Moreover, deciphering transcriptome response of mosquitoes to anthropogenic xenobiotics may identify genes involved in chemical stress response that were not detected by standard toxicological studies.

Today, quantitative transcriptomic methods are diversified and divided into two kind of technology: 'closed' and 'open' techniques depending on genome annotation constraints [14,15]. In 'closed' technologies, gene expression microarrays are the standard method used for transcriptome analysis. However, this type of technology does not allow the characterization and analysis of new transcripts and suffers from various technical biases such as non-specific hybridization and insufficient signal for low expressed genes. In contrast, 'open' transcriptome analyses based on the sequencing of either ESTs or short cDNA tags, like Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) [16], LongSAGE [17] and Massive Parallel Signature Sequencing (MPSS) [18] can measure the transcript level of both known and unknown genes [19]. The short cDNA tags obtained by LongSAGE or MPSS can directly be mapped to the genome sequence, allowing the identification of new transcripts [15]. Because these sequencing techniques do not target a defined portion of cDNAs, these approaches are not optimized for the deep analysis of transcriptome variations [20]. Recently, a combination of LongSAGE and Solexa sequencing technology, leading to the production and sequencing of millions of tags on a defined region of cDNAs, has been used to characterize mouse hypothalamus transcriptome [15]. To our knowledge, this new method, called Digital Gene Expression Tag Profiling (DGETP) has never been used to compare whole transcriptome variations of a non-mammalian organism in different environmental conditions.

Here, we used the DGETP approach to perform a deep transcriptome analysis of larvae of the mosquito *Aedes aegypti* exposed to different anthropogenic xenobiotics. We examined the effect of sublethal doses of three pollutants likely to be found in wetlands (the herbicide atrazine, the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene and the heavy metal copper) and three chemical insecticides

used for mosquito control (the pyrethroid permethrin, the neonicotinoid imidacloprid and the carbamate propoxur). This approach was suitable for investigating deep transcriptome variations in mosquitoes and identified several loci with high transcription signal not previously identified in mosquito genome. At the biological level, the transcript levels of many genes were affected by xenobiotic exposure. Several genes and protein families responding to individual or multiple xenobiotics were identified, unraveling the complexity of xenobiotic-response in mosquitoes and identifying genes potentially involved in insecticide tolerance or biological interactions between insecticides and pollutants.

Results

Sequencing, mapping and clustering of cDNA tags

By sequencing 7 cDNA tag libraries from mosquito larvae exposed to different xenobiotics, a total of 29.45 million reads (100% of total reads) corresponding to 726,269 distinct 20-mer tags were obtained (Table 1). By removing any tag represented by less than 20 reads across all libraries, background filtering slightly reduced the total number of reads to 28.12 million (95.5%) but greatly reduced the number of distinct tags to 33,037. Among them, 15,253 distinct tags were successfully mapped onto the *Ae. aegypti* genome at a unique genomic location without mismatch, representing 15.2 million reads (51.6%). Among successfully mapped tags, 9,812 distinct tags (12.59 million reads, 42.7%) were mapped to 6,850 predicted genes while the remaining reads (8.9%) were mapped outside gene boundaries (see methods).

Clustering analysis of 20-mer cDNA tags successfully mapped to mosquito genome allowed us to identify a total of 13,118 distinct clusters including 8,250 clusters associated to predicted genes. Distribution of the total number of reads across genes, clusters and tags (Additional file 1: Suppl. Figure 1) spanned more than 4 orders of magnitude with most genes/clusters being represented by 25 to 5000 reads. Median total number of reads per gene, cluster, tag and cluster not mapped within predicted gene were 217, 124, 101 and 79 respectively.

Quantitative transcription data obtained from cDNA tags

Analysis of transcription levels in mosquito larvae exposed to each xenobiotic was performed at the gene level for tags mapped within predicted genes (i.e. gathering all tags mapped within each gene) and at the cluster level for tags not mapped within predicted genes (i.e. gathering all tags mapped within each cluster). This analysis identified 453 genes and 225 additional clusters with a mean transcript ratio (TR) significantly > 2-fold in either direction in at least 1 condition (Fisher's test $P_{\text{value}} < 10^{-3}$ after multiple testing correction). Overall distribution of TRs and their associated P_{values} revealed a well-bal-

Table 1: Sequencing statistics

Reads	Ctrl (×106)	Copper (×106)	Fluo (×106)	Atraz (×106)	Propo (×106)	Perm (×106)	Imida (×106)	Mean (×106)	Total (×106)	% Total	Distinct tags
Sequenced	4.35	4.30	4.41	2.75	3.88	4.90	4.85	4.21	29.45	100	726 269
Filtered from background	4.16	4.10	4.21	2.63	3.72	4.68	4.62	4.02	28.12	95.5	33 037
Mapped to genome	2.27	2.31	2.29	1.42	1.80	2.63	2.48	2.17	15.20	51.6	15 253
Mapped to genes	1.89	1.93	1.87	1.19	1.49	2.19	2.03	1.80	12.59	42.7	9 812

Reads filtered from background represent tags showing > 20 reads across all conditions. Reads mapped to genome represent tags mapped to a unique genomic location without mismatch. Reads mapped to genes represent tags filtered from background and mapped to predicted genes. Ctrl: controls; Copper: exposed to copper sulfate; Fluo: exposed to fluoranthene; Atraz: exposed to atrazine; Propo: exposed to propoxur; Perm: exposed to permethrin; Imida: exposed to imidacloprid.

anced distribution between over- and under transcription with TRs ranging from 600-fold under transcription to more than 2000-fold over transcription compared with controls (Figure 1 and Additional file 2: Suppl. Table 1). Cross-validation of TRs with real-time quantitative RT-PCR on 14 genes (Additional file 3: Suppl. Figure 2) revealed a good correlation of TRs obtained from the two techniques ($r = 0.71$ and $P = 4.16 \text{ E-}05$), although the DGETP method often produced higher TRs (in either direction) than real-time quantitative RT-PCR.

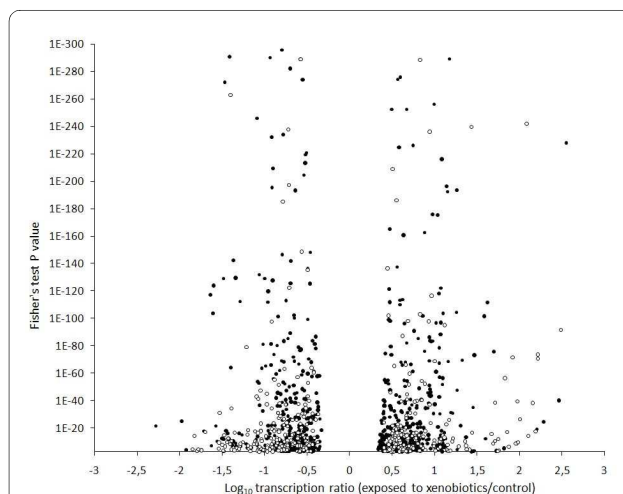


Figure 1 Distribution and significance of transcription variations in mosquito larvae exposed to xenobiotics. Transcription ratios of genes are shown as black dots while genomic clusters not mapped within genes are shown as white dots. Differential transcription is indicated as a function of both \log_{10} transcription ratios (exposed to xenobiotics/controls) and Fisher's test P_{value} s. Only the transcription ratios of 453 genes and 250 clusters showing a Fisher's test $P_{\text{value}} < 0.001$ in at least one condition are shown.

Overall transcriptome variations across treatments

Global analysis of transcriptome variations between mosquito larvae exposed to each xenobiotic revealed that the proportion of genes/clusters differently transcribed varied greatly between treatments (Table 2). This proportion ranged from 0.26% to 3.94% of all detected genes/clusters for permethrin and propoxur respectively. No correlation was found between the number of genes/clusters differentially transcribed in each treatment and the number of reads sequenced or the number of cDNA tags successfully mapped to genome, suggesting an accurate normalization across all libraries. When considering organic xenobiotics (all but copper), the number of genes/clusters differentially transcribed for each treatment was significantly positively correlated with the molarity of the xenobiotic used for larval exposure, ($r = 0.89$ and $P < 0.05$). This overall positive correlation revealed that despite the different nature of xenobiotics, increasing the number of organic molecules lead to an increase in the number of genes/cluster differentially transcribed. Principal component analysis (PCA) based on TRs of genes/clusters differentially transcribed revealed similar transcriptome variations of mosquito larvae exposed to the two chemical insecticides propoxur and imidacloprid and the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene (Additional file 4: Suppl. Figure 3). Conversely, transcriptome variations of larvae exposed to the insecticide permethrin, the herbicide atrazine and copper were more specific.

Genes differentially transcribed across treatments

Functional analysis of the 453 genes differentially transcribed in mosquito larvae exposed to xenobiotics revealed that genes responding to xenobiotics encode proteins with diverse functions, including a large proportion (up to 50%) of proteins of unknown function (Figure 2 and Additional file 1: Suppl Table 1). Among them, 108

genes were affected by both pollutants and insecticides. Several genes affected by xenobiotics encoded enzymes, cuticular proteins and proteins involved in transport or DNA interactions. As previously shown by PCA, the two chemical insecticides propoxur and imidacloprid, and to a lesser extent the polycyclic hydrocarbon fluoranthene, induce similar functional responses. Response induced by copper appeared distinct compared to organic xenobiotics, with a high proportion of enzymes being over transcribed. Conversely, response to organic xenobiotics was characterized by the overproduction of a large proportion of transcripts encoding cuticular proteins. For these compounds, a positive correlation was found between their lipophilicity (Log Kow) and the proportion of transcripts encoding cuticular proteins being significantly over-produced ($r = 0.91$; $P < 0.01$; Log Kow from 0.57 for imidacloprid to 6.1 for permethrin.). Genes encoding cytoskeleton and ribosomal proteins were also affected by various xenobiotics with cytoskeleton proteins showing a marked repression in larvae exposed to the herbicide atrazine. Finally, genes encoding proteins involved in transport were also differentially affected by xenobiotics. A negative correlation was found between the lipophilicity (Log Kow) of organic xenobiotics and the number of transcripts involved in transport being over-produced ($r = 0.95$, $P < 0.01$).

Impact of xenobiotics on transcripts encoding enzymes

Clustering analysis of genes encoding enzymes significantly differentially transcribed in larvae exposed to xenobiotics revealed that the transcript level of 115 enzymes was affected by one or more xenobiotic (Figure 3). The transcript level of these enzymes was strongly affected in larvae exposed to the insecticides propoxur and imidacloprid and the aromatic hydrocarbon fluoranthene. A gene tree based on transcript levels across all treatments revealed a distribution in 6 main different enzyme clusters mainly influenced by these 3 xenobiotics. Twelve genes encoding enzymes potentially involved in xenobiotic detoxification were found differentially transcribed, including 5 cytochrome P450s monooxygenases (P450s), 4 glutathione S-transferases (GSTs) and 3 carboxy/cholinesterases (CCEs). Among them, the three P450s *CYP9M9* (AAEL001807), *CYP325X2* (AAEL005696) and *CYP6M11* (AAEL009127) were induced by multiple xenobiotics. Interestingly, the *cytochrome b5* (AAEL012636), a co-factor associated with P450 detoxification systems, was also strongly induced in mosquito larvae exposed to insecticides and copper. Among GSTs, *GSTX2* (AAEL010500) was strongly and specifically induced by the insecticide propoxur while the induction of *GSTD4* (AAEL001054) appeared less specific. Transcripts encoding esterases were mostly found under produced following xenobiotic exposure. Finally, several transcripts

encoding enzymes involved in the production of energy within the respiratory chain such as NADH dehydrogenase and ATP synthase were over-produced in mosquito larvae exposed to xenobiotics while multiple serine proteases, amylases and peptidases were down-regulated.

Discussion

Analyzing transcriptome variations using digital gene expression tag profiling

Following the genome sequencing of the dengue vector *Ae. aegypti*, 15,419 putative genes were identified and transcripts were detected for 12,350 genes by combining cDNA microarray, massive parallel signature sequencing (MPSS) or EST sequencing on several mosquito life stages [21]. By using the DGETP method, we sequenced 29.4 millions 20-mer tags across 7 distinct cDNA libraries obtained from 4th-stage larvae. This approach allowed us to detect significant transcription signals for 6,850 predicted genes. Considering that several genes may not be transcribed in 4th-stage larvae and that transcripts assayed by the DGETP method require the presence of a DpnII restriction site, such transcriptome coverage appears satisfactory. Besides, sequence variations between the *Ae. aegypti* strain used in our study (Bora-Bora strain) and the one used for genome sequencing (Liverpool strain), led to the rejection of numerous reads. Within our mosquito strain, allelic variations were detected for numerous loci and also led to the rejection of a considerable proportion of reads as only alleles exactly matching to the reference genome sequence were considered in the analysis (see methods). However, we believe that such high mapping stringency is critical for generating accurate gene transcription data with short cDNA tags. Improving the number of reads by replicating sequencing libraries for each sample will allow a better assessment of biological and technical variations together with increasing transcriptome coverage. By sequencing 10 million random 36 bp cDNA fragments from two cDNA libraries of females *Drosophila melanogaster*, Sackton et al. detected 2,540 annotated genes [22]. By targeting a defined region of cDNAs, the DGETP method can generate wider transcriptome coverage together with a higher number of cDNA tags per gene, leading to more precise gene transcription data. Provided a reference genome is available and the aim is to quantify transcript levels between different biological samples, we confirm that methods based on the combination of LongSAGE and next-generation sequencing technologies are perfectly suited for deep transcriptome analysis [15]. Recent improvements in sequencing technologies (~30 million reads/lane on the illumina Genome Analyzer system) are now making sequencing-based approaches the methods of choice for whole transcriptome analyses.

Table 2: Genes and clusters differentially transcribed after xenobiotic exposure

Genes/ clusters differentially transcribed	Copper		Fluo		Atraz		Propo		Perm		Imida	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Total genes and additional clusters	71	0.61	141	1.20	98	0.84	462	3.94	31	0.26	361	3.08
Total genes	49	0.72	86	1.26	60	0.88	318	4.64	20	0.29	239	3.49
Over-transcribed	46	0.67	50	0.73	25	0.36	130	1.90	16	0.23	113	1.65
Under-transcribed	3	0.04	36	0.53	35	0.51	188	2.74	4	0.06	126	1.84
Total additional clusters not within genes	22	0.45	55	1.13	38	0.78	144	2.96	11	0.23	122	2.51
Over-transcribed	18	0.37	36	0.74	21	0.43	53	1.09	9	0.18	51	1.05
Under-transcribed	4	0.08	19	0.39	17	0.35	91	1.87	2	0.04	71	1.46

For each treatment, the number (N) of genes and additional clusters not mapped within predicted genes found significantly differentially transcribed are indicated. For each value, the associated percentage regarding the total number of genes (6850), the total number of clusters not mapped within predicted genes (4868), or the total of genes and additional clusters (11718) is indicated. Genes or clusters were considered significantly differentially transcribed comparatively to controls if their associated P value (Fisher's test) was < 0.001 after multiple testing corrections. Copper: exposed to copper sulfate; Fluo: exposed to fluoranthene; Atraz: exposed to atrazine; Propo: exposed to propoxur; Perm: exposed to permethrin; Imida: exposed to imidacloprid.

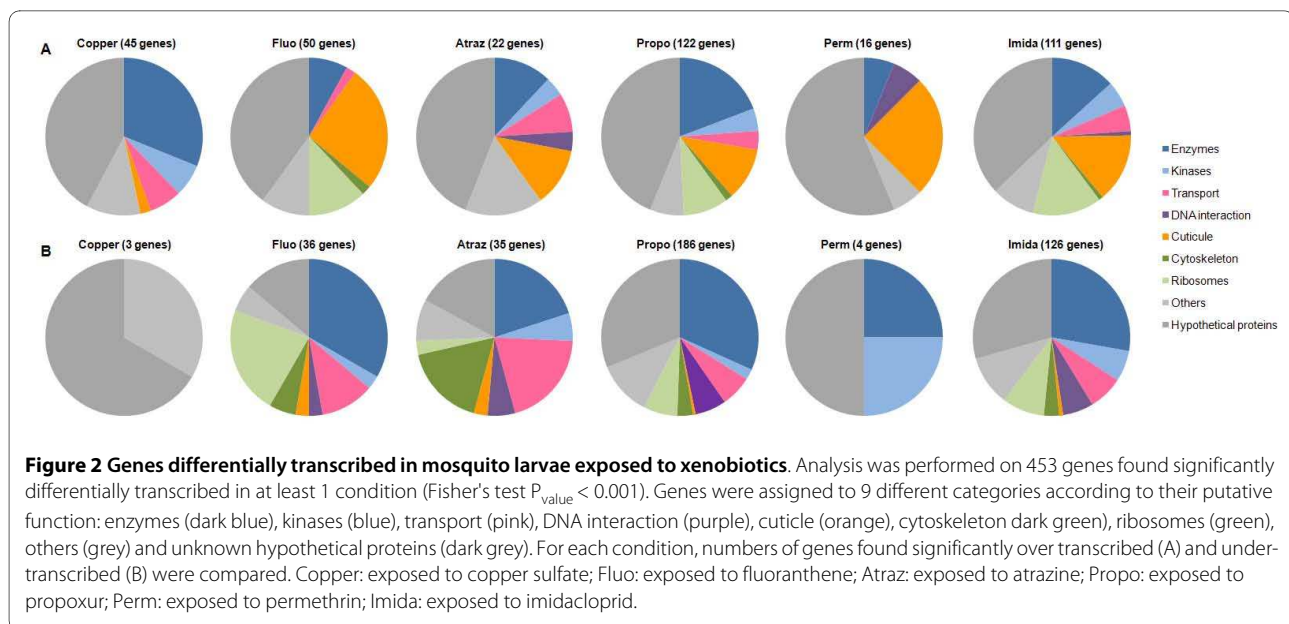
Among the 15,253 20-mer cDNA tags successfully mapped to *Ae. aegypti* genome, 35% were not located within predicted gene boundaries extended by 300 bp at their 3' end (see methods). These tags could be gathered into 4,868 genomic clusters with more than 40% of them showing significant transcription signal (> 100 reads, Additional file 1: Suppl. Figure 1). These clusters may represent genes, exons or UTR extensions not predicted by automated annotation. Recent studies revealed that the genome of complex organisms produce large numbers of regulatory noncoding RNAs (ncRNAs) that can be antisense, intergenic, interleaved or overlapping with protein-coding genes [23,24]. In that concern, it is likely that a significant proportion of transcript signatures detected outside predicted genes represent ncRNAs. The use of next-generation sequencing approaches specifically targeting insect ncRNAs will help decipher their role in mosquito gene regulation and in the capacity of insects to adapt to different environmental conditions.

Impact of xenobiotics on mosquito larvae transcriptome

Global analysis of transcriptome variations associated with a 48 h exposure of mosquito larvae to low doses of insecticides and pollutants revealed their ability to adjust

to modifications of their chemical environment. The number of transcripts affected varies greatly depending on the xenobiotic used for exposure. When considering organic xenobiotics (all but copper), this number increased together with the molarity of the xenobiotics. Our results also revealed that the lipophilicity of the xenobiotics affects the number of differentially transcribed genes encoding cuticular proteins and transporters. It has been demonstrated that lipophilic xenobiotics accumulate in biological membranes or lipid reserves, modifying their distribution across tissues and cells [25,26]. Although our experimental design did not allow segregating between the quantity of xenobiotic and their inherent chemical properties, it is likely that molarity and lipophilicity are key factors affecting the magnitude and the specificity of transcriptome variations observed here.

Our results demonstrated the similar strong transcriptome response of mosquito larvae exposed to the insecticides propoxur and imidacloprid. Despite belonging to two different chemical groups, the carbamate propoxur and the neonicotinoid imidacloprid both potentiate the functioning of nicotinic cholinergic receptors [27]. Although genes encoding the primary targets of these insecticides (acetylcholinesterase or nicotinic receptors)



were not found significantly differentially transcribed, the similar transcriptome responses to these two insecticides may be partly related to similar effects generated by the alteration of cholinergic neurons functioning [28,29].

We previously demonstrated that exposing mosquito larvae to various pollutants for few hours can increase their tolerance to insecticides possibly through an induction of detoxification enzymes [11,12,30]. Among the different pollutants tested, polycyclic aromatic hydrocarbons were often the most potent for increasing insecticide tolerance, possibly due to their ability to induce detoxification enzymes [31]. The present study detected a considerable number of genes encoding detoxification enzymes (89 cytochrome P450s, 22 GSTs and 27 carboxylesterases) including several genes showing transcription level variations. However, only a small proportion of them were found significantly affected by xenobiotic exposure, probably due to insufficient number of reads regarding our Fisher's t test P_{value} threshold. Among them, members of cytochrome P450 families frequently involved in resistance to insecticides and plant toxins [7-9,32-34] were over transcribed following exposure to fluoranthene, propoxur or imidacloprid. By revealing that several other genes with a broad range of biological functions are similarly affected by insecticides and pollutants, our results suggest that the impact of pollutants on the ability of mosquitoes to better tolerate chemical insecticides might also be the consequence of the induction/repression of other proteins involved in a wide range of functions. In this concern, several cuticular proteins were found over transcribed in mosquito larvae exposed to insecticides or organic xenobiotics. It has been suggested that mosquito may protect themselves

from insecticides by cuticular protein thickening leading to a reduction of insecticide penetration [4,35]. Other studies demonstrated that cuticular component deposition is stimulated by environmental stress [36].

Our results also suggest that mosquito larvae exposed to xenobiotics undertake a metabolic stress associated with changes of their chemical environment. Global cellular stress response has been defined as all proteins over-produced due to environmental stress. This response initially named 'general adaptation syndrome' occurs together with increased mobilization of energy from storage tissues [37]. Such stress response has been described for numerous stress factors including exposure to pollutants [38]. In insect cells, response to environmental aggressions can involve various proteins including heat shock proteins [39], metallothioneins [40] or p-glycoprotein synthesis [41]. Although differentiating between xenobiotic-specific and general stress responses is difficult, we also highlighted such protein families including chaperonins, heat shock proteins and ATP-binding cassette transporters (p-glycoprotein family). Moreover, numerous genes encoding enzymes involved in the production of energy or in cellular catabolism such as NADH dehydrogenase, ATP synthase, trypsin and lipases were found over transcribed in mosquito larvae exposed to xenobiotics, confirming a global stress response [37,42].

Significant transcript level variations were observed in response to anthropogenic pollutants though those compounds were not toxic for mosquito larvae (see methods). Although we predicted the relatively important effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene on mosquito larvae due to known cellular effects on animals [11,12,31,43], responses to atrazine and copper were

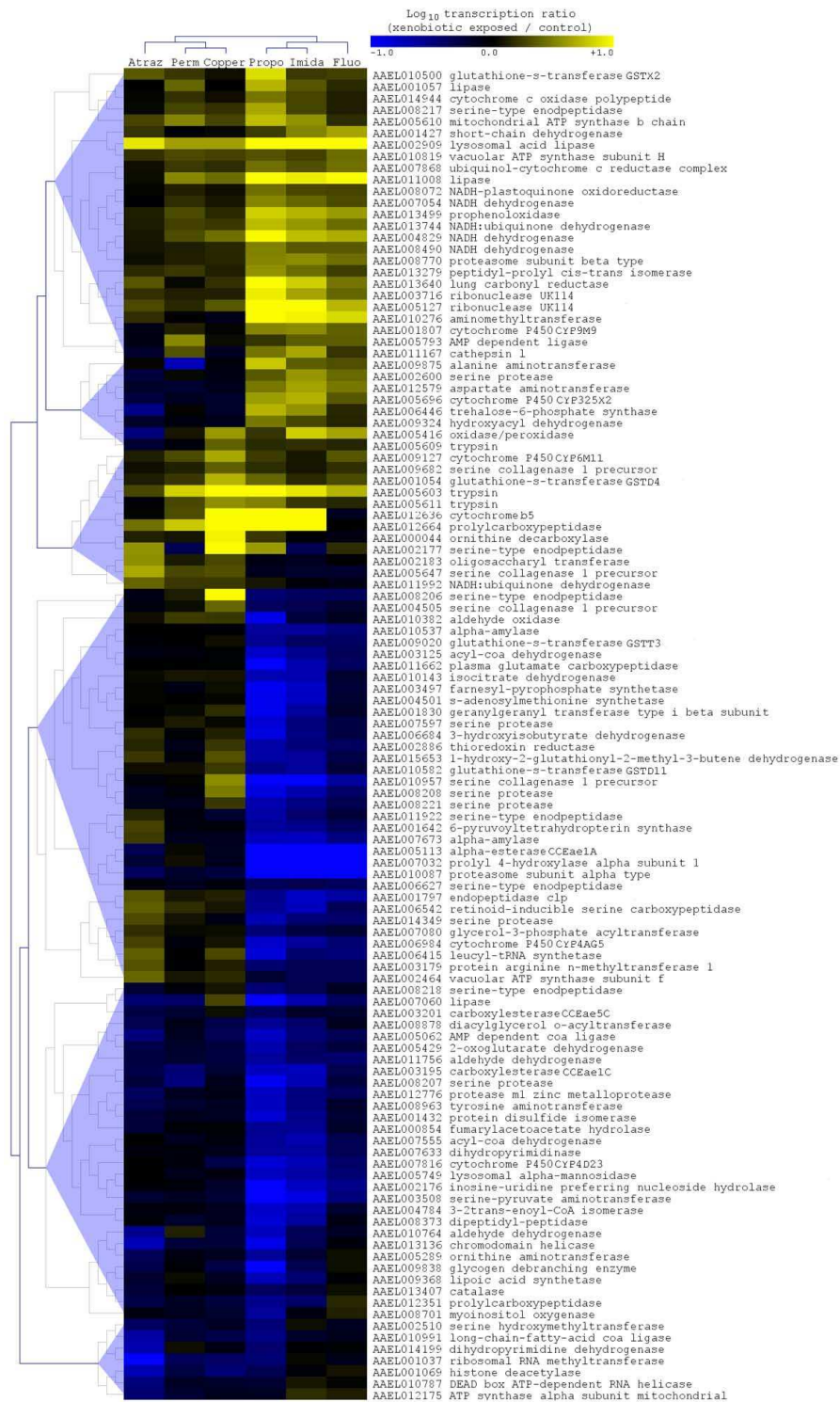


Figure 3 Enzymes differentially transcribed in mosquito larvae exposed to xenobiotics. Hierarchical clustering analysis based transcription levels was performed on 115 enzyme-encoding genes showing significant differential transcription (Fisher's test $P_{\text{value}} < 0.001$) in larvae exposed to any xenobiotic. Gene tree (left) and condition tree (top) were obtained using Pearson's uncentered distance metric calculated from all Log₁₀ transcription ratios (xenobiotic exposed/controls). Color scale from blue to yellow indicates Log₁₀ transcription ratios from -1 (10-fold under transcription) to +1 (10-fold over transcription). For each gene, accession number and annotation are indicated. Copper: exposed to copper sulfate; Fluo: exposed to fluoranthene; Atraz: exposed to atrazine; Propo: exposed to propoxur; Perm: exposed to permethrin; Imida: exposed to imidacloprid.

unanticipated. In animals, the cellular impact of PAHs has been associated with the uncoupling of mitochondrial respiration, direct genotoxic damages and the formation of reactive oxygen species [31,44-46]. The over transcription of NADH dehydrogenase and ATP synthase observed after exposing larvae to fluoranthene confirm that similar effects occur in mosquitoes. Although mosquitoes do not possess the protein targeted by the triazine herbicide atrazine (plastoquinone-binding protein in photosystem II) [47] and a very low concentration was used (10 µg/L), this chemical affected the transcription of several mosquito genes. In plants, atrazine disrupts the electron transport in chloroplasts [48]. In mosquito larvae, several members of the oxidative phosphorylation pathway including NADH dehydrogenase and ATP synthase were induced by atrazine, suggesting a compensation for partial uncoupling of oxidative phosphorylation [44]. Larvae exposed to copper sulfate exhibited a significant over transcription of 45 genes including a large proportion of enzymes while only 3 genes were under-transcribed. The induction of enzymes by copper might be the consequence of chemical interactions between Cu²⁺ ions and metalloenzymes together with other metalloproteins involved in electron transfers, hydrolysis and oxido-reductions [49-51]. The strong induction of the hemo-protein cytochrome b5 (co-factor of P450s for electron transfer) together with several serine proteases and oxidase/peroxidases support this hypothesis.

Conclusions

Overall, despite low concentrations, short exposure time and no apparent phenotypic modification, the significant effect of pollutants and insecticides on mosquito larvae transcriptome raise important questions about the 'hidden impact' of anthropogenic pollutants on ecosystems, including mammals. This concern may even be underestimated considering the complex and unknown cross-effects generated by pollutant mixtures often encountered in polluted ecosystems [52]. In nematodes, it has been shown that by applying a realistic heat stress to both uncontaminated and polluted systems, the specimen from polluted environment showed a stronger response [53]. Such effects are likely to occur in polluted mosquito breeding sites and are likely to affect the efficacy of chemical insecticides used for mosquito control [4,5,7,11,12,53]. Although further experiments are required to fully characterize the molecular mechanisms by which pollutants affect insecticide tolerance in mosquitoes, the present study clearly demonstrate that similar response mechanisms are activated by pollutants and insecticides. Finally, the persistent contamination of wetlands by anthropogenic chemicals and the role of phenotypic plasticity in driving selection mechanisms [54] raise the question of the long-term impact of pollutants on the

selection of insecticide resistance mechanisms. Additional experiments combining exposure of mosquitoes to pollutants and their subsequent selection with insecticides will provide valuable biological material to answer this question and may later allow improving mosquito control strategies.

Methods

Mosquitoes and xenobiotics

A laboratory strain of the dengue vector *Ae. aegypti* (Bora-Bora strain), susceptible to insecticides was reared in standard insectary conditions (26°C, 8 h/16 h light/dark period) and used for all experiments. Larvae were reared in tap water with controlled amount of larval food (ground hay pellets) for 4 days (3rd instar) before exposure for 48 h to 3 chemical insecticides and 3 pollutants belonging to various chemical classes: the pyrethroid insecticide permethrin (Chem Service, USA), the neonicotinoid insecticide imidacloprid (Sigma Aldrich, USA), the carbamate insecticide propoxur (Sigma Aldrich, USA), the herbicide atrazine (Cluzeau, France), the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene (Aldrich, France) and the heavy metal copper (obtained from CuSO₄, Prolabo, France). Atrazine is an herbicide heavily used worldwide and is likely to be found in mosquito breeding sites near cultivated areas (e.g. field drainpipes) [30,55]. Similarly, copper is the major component of Bordeaux mixture and is widely used to control fungus on grapes and other berries [56]. Finally, fluoranthene is one of the most ubiquitous PAH and is found at high concentrations in road sediments [57]. Elevated doses of fluoranthene are likely to be found in urban mosquito breeding sites such as road trenches [58] or in oil spillage areas [4].

Samples preparation

Exposures to all xenobiotics were performed in triplicate with larvae from different egg batches (3 biological replicates per treatment). One hundred larvae were exposed to each xenobiotic in 200 ml tap water containing 50 mg of larval food. Control larvae were obtained simultaneously in similar conditions without xenobiotics. Doses of xenobiotics used for larval exposure were chosen according to the doses likely to be found in highly polluted mosquito breeding sites (INERIS, <http://www.ineris.fr>). Preliminary experiments revealed that fluoranthene, atrazine or copper did not show any toxicity on mosquito larvae even at higher concentrations than those used in the present study. For insecticides, we chose a concentration resulting in less than 15% larval mortality after 48 h exposure. This low mortality threshold was chosen in order to minimize the effect of the artificial selection of particular genotypes more tolerant to the insecticide during exposure. Doses of xenobiotics used for exposures

were 1.5 µg/L permethrin, 40 µg/L imidacloprid, 500 µg/L propoxur, 25 µg/L fluoranthene, 10 µg/L atrazine and 2 mg/L CuSO₄. After 48 h, larvae were collected, rinsed twice in tap water and immediately used for RNA extractions.

Preparation of double stranded cDNA tag libraries

For each biological replicate, total RNA was extracted from 30 fresh larvae using the PicoPure™ RNA isolation kit (Arcturus Bioscience, Mountain View, USA) according to manufacturer's instructions. Total RNA quality and quantity were controlled on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA). Total RNAs were then diluted to 750 ng/µL in nuclease-free water. For each treatment, total RNAs from the 3 biological replicates were then pooled together in equal proportions. Double-stranded cDNA tag libraries (Additional file 5: Suppl. Figure 4) were prepared by Illumina Corporation. Two µg total RNA were used to isolate mRNAs by using magnetic oligo(dT) beads before cDNA synthesis using superscript II (Invitrogen) at 42°C for 1 h. Second strand cDNAs were then synthesized and mRNAs were removed. Double stranded cDNAs were cleaved at DpnII restriction sites (5'-GATC-3') and fragments attached to the oligo(dT) beads on their 3' end were purified. Gene expression (GEX) adapters 1 were ligated to the DpnII cleavage sites using T4 DNA ligase (Invitrogen). Double stranded cDNAs containing both GEX adapters 1 and oligo(dT) beads were then digested with MmeI for 1.5 h at 37°C to generate 20 bp double stranded cDNA tags. These tags were purified before ligating GEX adapters 2 at the MmeI cleavage site using T4 DNA ligase. The adapter-ligated cDNA tag library was then enriched by PCR with two primers annealing to the end of GEX adapters and Phusion DNA polymerase (Finnzymes Oy). PCR cycles were 30 s at 98°C followed by 15 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 60°C, 15 s at 72°C and a final elongation step of 10 min at 72°C. Sequences of primers used for library preparation are available at <http://illumina.com>. Enriched cDNA tag library was then gel-purified before quality control analysis on an Agilent 2100 Bioanalyzer.

Sequencing and mapping of cDNA tags to mosquito genome

Each cDNA tag library was sequenced as 20-mers on a genome analyzer I (illumina Corporation). Each cDNA tag library was sequenced on a separated flow cell lane. Sequenced cDNA tags were then filtered from background noise according to their total number of reads across all conditions. Only cDNA tags represented by more than 20 reads were kept for further analysis. Background-filtered cDNA tags were then mapped to the *Ae. aegypti* genome assembly (AaegL 1.1 annotation) using TagMatcher, a software developed in our laboratory and

based on the short sequence mapping algorithm 'agrep' [59]. TagMatcher allows matching tags to a reference genome with errors and multiple matching loci (available on request to

eric.coissac@inrialpes.fr

). After mapping to *Ae. aegypti* genome, only tags without ambiguous nucleotides and mapped without mismatch at a unique genomic location were kept for clustering and differential transcription analysis. To avoid possible bias due to incomplete 3' UTR annotation and because most cDNA tags were expected on the 3' side of genes (see Additional file 5: Suppl. Figure 4), cDNA tags were considered to be 'within' a gene if located between the 5' boundary of a gene and its 3' boundary extended by 300 bp.

Clustering and differential transcription analysis

In order to collect transcription data from distinct tags matching to a unique transcript or a unique genomic loci without *a priori* knowledge of genome annotation, we clustered tags previously mapped to *Ae. aegypti* genome. Two distinct tags were assigned to a single cluster if *i*) tags were found on the same DNA strand and genomic supercontig, *ii*) tags were separated by less than 500 bp and *iii*) the total number of reads across all conditions was higher for the tag located downstream (3' side) than for the tag located upstream (5' side). The later condition was adopted in order to take in account the effect of partial DpnII digestion of cDNAs during cDNA library preparation, leading to multiple tags located on a single transcript with decreasing number of reads toward the 5' direction (see Additional file 5: Suppl. Figure 4).

Differential analysis of transcription levels in mosquito larvae exposed to each xenobiotic was performed at the gene level for cDNA tags mapped within predicted genes (i.e. gathering all tags mapped within each gene) and at the cluster level for cDNA tags not mapped within predicted genes (i.e. gathering all tags mapped within each cluster). Transcription ratios (TR) were calculated by dividing the number of reads per million (RPM) in xenobiotic-exposed larvae by the number of RPM in control larvae following the formula: $TR = [(RPM_{treated} + x) / (RPM_{controls} + x)]$, where *x* is a pseudocount equal to 0.2 (approximately 1 read per million per condition). Then, the probability of each gene to be differentially transcribed more than 2-fold in either direction between treated and controls was computed for each condition from raw read counts, taking into account library size. This computation was performed using Fisher's noncentral hypergeometric distribution, which has the advantage over standard hypergeometric law to allow computation of P_{value} for a ratio different of one [60]. Holm correction was then applied to multiple test procedure. Genes/clusters were considered differentially tran-

scribed between xenobiotic-exposed larvae and controls if $P_{\text{value}} < 10^{-3}$.

Differential effect of xenobiotics on mosquito larvae transcriptome

To compare the global effect of each xenobiotic on *Ae. aegypti* larvae transcriptome, a principal component analysis (PCA) based on Log_{10} TRs was performed on the 453 genes and 225 clusters not mapped within genes showing significant differential transcription following exposure to at least one xenobiotic. Representation of observations (genes and clusters) and conditions (xenobiotics used for exposure) on PCA axis was optimized by applying a Varimax rotation on the 5 axis best representing the variance [61]. A comparative analysis of gene functions differentially transcribed was performed on the 453 genes showing significant differential transcription following exposure to at least one xenobiotic. Genes were classified in 9 different categories: enzymes, kinases, transport, DNA interaction, cuticle, cytoskeleton, ribosomes, others and hypothetical proteins. For each treatment, percentages of genes significantly over- and under-transcribed were compared. To investigate the role of enzymes in the response of mosquito larvae to xenobiotics, a hierarchical clustering analysis based on TRs was performed on the 115 enzymes showing a significant differential transcription. Clustering analysis was performed by loading Log_{10} transcription ratios into TM4 Multi experiment Viewer (MeV) software [62]. Gene and condition trees were calculated using Pearson's uncentered distance metric and complete linkage method with optimization of genes order [63,64].

Real-time quantitative RT-PCR validation

Transcription profiles of 14 genes were validated by reverse transcription followed by real-time quantitative PCR on same RNA samples used for cDNA library preparation. Four μg total RNAs were treated with DNase I (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with superscript III (Invitrogen) and oligo-dT₂₀ primer according to manufacturer's instructions. Resulting cDNAs were diluted 100 times for PCR reactions. Real-time quantitative PCR reactions of 25 μL were performed in triplicate on an iQ5 system (BioRad) using iQ SYBR Green supermix (BioRad), 0.3 μM of each primer and 5 μL of diluted cDNAs according to manufacturer's instructions. Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method taking into account PCR efficiency [65] and using the two genes encoding the ribosomal protein L8 (GenBank accession no. [DQ440262](#)) and the ribosomal protein S7 (Genbank accession no. [EAT38624.1](#)) for normalisation. For each treatment, results were expressed as mean transcription ratios (\pm SE) between xenobiotic-exposed larvae and control larvae.

Data deposition

Detailed transcription data for the 6850 genes detected in the present study are presented in the Additional file 6 (supplementary Table 2).

All next-generation sequencing data and cDNA library informations associated to the present study have been deposited at the EMBL-EBI European Read Archive (ERA) under accession number ERA000115. Experiment metadata are freely accessible at <ftp://ftp.era-xml.ebi.ac.uk/meta/xml/> and sequence data are freely accessible at <ftp://ftp.era-xml.ebi.ac.uk/vol1/ERA000/ERA000115/>. Expression data from the 453 genes found differentially transcribed after xenobiotic exposure are also accessible at <http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/>.

All gene accession numbers mentioned in the present manuscript are compatible with Ensembl, NCBI-GenBank and Vectorbase <http://aegypti.vectorbase.org> genome databases.

Additional material

Additional file 1 Supplementary figure 1. This figure represents the distribution of the number of reads across distinct genes (6850 genes), clusters not mapped within predicted genes (4868 clusters), all mapped clusters (13118 clusters) and all mapped tags (15253 tags). Genes, clusters and tags are ranked in ascending order according to their total number of reads across all conditions.

Additional file 2 Supplementary table 1. This table contains all transcription data for the 453 genes found differentially transcribed in *Aedes aegypti* larvae exposed to xenobiotics. Genes are arranged in nine different functional categories: enzymes; kinases; transport; DNA interaction; cuticle; cytoskeleton; ribosomes; others and unknown hypothetical proteins. For each gene, accession number and gene name or annotation are indicated. The number of reads per million (RPM) across all conditions is indicated as an average transcription level. Log_{10} transcription ratios (exposed to xenobiotic/control) are indicated for each xenobiotic relative to control. Transcription ratios with a significant Fisher's test $P_{\text{value}} < 0.001$ are shown in bold.

Additional file 3 Supplementary figure 2. This figure shows the validation of transcription ratios obtained from Digital Gene Expression Tag Profiling (DGETP) by real-time quantitative RT-PCR. Validation was performed on 14 genes found significantly over-transcribed by DGETP in at least one condition. For each gene, transcription ratios from both techniques across all conditions are represented. Black dots represent conditions showing a significant over-transcription in DGETP. Accession numbers and annotations of gene analyzed were: AAEL001626 (zinc/iron transporter); AAEL001981 (serine/threonine kinase); AAEL002110 (cuticular protein); AAEL004748 (pupal cuticular protein); AAEL004829 (NADH dehydrogenase); AAEL005416 (oxidase/peroxidase); AAEL005696 (cytochrome P450 CYP325X2); AAEL005929 (ATP-binding cassette transporter); AAEL010500 (glutathione S-transferase GSTX2); AAEL011008 (lipase); AAEL012636 (cytochrome b5); AAEL013514 (pupale cuticle protein); AAEL009127 (cytochrome P450 CYP6M11); AAEL001807 (cytochrome P450 CYP9M9).

Additional file 4 Supplementary figure 3. This figure represents the results of the principal component analysis of the effect of xenobiotics on mosquito larvae transcriptome. Analysis was based on log_{10} transcription ratios of all genes and clusters not mapped within genes showing a significant differential transcription in at least one treatment. Both xenobiotic treatments (black dots) and genes or clusters (grey crosses) are represented using the 3 axis best representing the variance. Biplot A: axis 1 and 2 (81.5% of variance). Biplot B: axis 1 and 3 (69.7% of variance).

Additional file 5 Supplementary figure 4. This figure illustrates the preparation of the double stranded cDNA tag library. Messenger RNAs are isolated by using magnetic oligo(dT) beads before cDNA synthesis. Double stranded cDNAs are synthesized using DNA polymerase I and clived at every DpnII restriction sites. Gene expression (GEX) adapters 1 containing a Mmel recognition site at its 3' side are then ligated to the DpnII clivage sites. Double stranded cDNA fragments containing both GEX adaptor 1 and oligo(dT) beads were then digested with Mmel to generate double stranded cDNA tags. These tags were purified and ligated with GEX adapters 2 at the Mmel cleavage site before enrichment by PCR.

Additional file 6 Supplementary table 2. This table describes transcription data for the 6850 genes detected in the study. For each gene, accession number and annotation are indicated. For each gene and each condition, reads counts, reads per millions (RPM), transcription ratios (Log_{10} TR) and Fisher's test P_{values} are indicated.

Authors' contributions

JPD conceived and coordinated the study, participated in sample preparation and data analysis and wrote the manuscript. EC and CM performed bioinformatics and statistical analysis and help to draft the manuscript. RP and MAR performed qRT-PCR experiments, contributed to sample preparation, data analysis and help to draft the manuscript. ACP contributed to data analysis and helped to draft the manuscript. SR contributed to study design, sample preparation, data analysis and helped writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The present research project was funded by the French National Research Agency (ANR project 07SEST014 MOSQUITO-ENV). We are grateful to J. Patoureaux and S. Veyrenc for technical help. We thank Dr. B. MacCallum from Vectorbase and Dr. C. Hunter and Dr. V. Zalunin from EMBL-EBI for help with sequence data deposition. We are grateful to Dr. J. Vontas, Dr. P. Taberlet, Dr. H. Ranson, Pr. P. Ravanel and anonymous reviewers for useful comments on the manuscript.

Author Details

Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, UMR 5553 CNRS - Université Grenoble), France

Received: 6 January 2010 Accepted: 31 March 2010

Published: 31 March 2010

References

1. Stegeman JJ, Hahn ME: **Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species.** In *Aquatic toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives* Edited by: Malins DC, Ostrander GK. Boca Raton: Lewis Publisher, CRC Press; 1994:87-206.
2. Lounibos LP: **Invasions by insect vectors of human disease.** *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:233-266.
3. Hemingway J, Field L, Vontas J: **An overview of insecticide resistance.** *Science* 2002, **298**(5591):96-97.
4. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.** *BMC Genomics* 2008, **9**:538.
5. Liu NN, Liu HQ, Zhu F, Zhang L: **Differential expression of genes in pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.).** *Gene* 2007, **394**(1-2):61-68.
6. Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yebakima A, Ranson H, Corbel V, et al.: **Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies).** *BMC Genomics* 2009, **10**:494.
7. Muller P, Donnelly MJ, Ranson H: **Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana.** *BMC Genomics* 2007, **8**:36.
8. David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H: **The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**(11):4080-4084.
9. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne S, Hemingway J, Black WC, et al.: **Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**(1):113-123.
10. Vontas J, Blass C, Koutsos AC, David JP, Kafatos FC, Louis C, Hemingway J, Christophides GK, Ranson H: **Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure.** *Insect Mol Biol* 2005, **14**(5):509-521.
11. Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP: **Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**(5):540-551.
12. Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, David JP: **Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics.** *Aquat Toxicol* 2009, **93**(1):61-69.
13. Sasabe M, Wen ZM, Berenbaum MR, Schuler MA: **Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*.** *Gene* 2004, **338**(2):163-175.
14. Green CD, Simons JF, Taillon BE, Lewin DA: **Open systems: panoramic views of gene expression.** *J Immunol Methods* 2001, **250**(1-2):67-79.
15. Hanriot L, Keime C, Gay N, Faure C, Dossat C, Wincker P, Scotte-Blachon C, Peyron C, Gandrillon O: **A combination of LongSAGE with Solexa sequencing is well suited to explore the depth and the complexity of transcriptome.** *BMC Genomics* 2008, **9**:418.
16. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW: **Serial analysis of gene expression.** *Science* 1995, **270**(5235):484-487.
17. Saha S, Sparks AB, Rago C, Akmaev V, Wang CJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE: **Using the transcriptome to annotate the genome.** *Nat Biotechnol* 2002, **20**(5):508-512.
18. Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo SJ, McCurdy S, Foy M, Ewan M, et al.: **Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays.** *Nat Biotechnol* 2000, **18**(6):630-634.
19. Nielsen KL, Hogh AL, Emmersen J: **DeepSAGE - digital transcriptomics with high sensitivity, simple experimental protocol and multiplexing of samples.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(19):e133.
20. Eveland AL, McCarty DR, Koch KE: **Transcript profiling by 3'-untranslated region sequencing resolves expression of gene families.** *Plant Physiol* 2008, **146**(1):32-44.
21. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi ZY, Megy K, Grabherr M, et al.: **Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector.** *Science* 2007, **316**(5832):1718-1723.
22. Sackton TB, Clark AG: **Comparative profiling of the transcriptional response to infection in two species of *Drosophila* by short-read cDNA sequencing.** *BMC Genomics* 2009, **10**:259.
23. Kapranov P, Willingham AT, Gingeras TR: **Genome-wide transcription and the implications for genomic organization.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**(6):413-423.
24. Mattick JS: **The Genetic Signatures of Noncoding RNAs.** *PLoS Genet* 2009, **5**(4):e1000459.
25. Roche H, Buet A, Ramade F: **Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Camargue Biosphere Reserve.** *Ecotoxicology* 2002, **11**(3):155-164.
26. Sandermann H: **Differential lipid affinity of xenobiotics and natural compounds.** *FEBS Lett* 2003, **554**(1-2):165-168.
27. Tomizawa M, Casida JE: **Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005, **45**:247-268.
28. Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, Sattelle DB: **Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides.** *Invert Neurosci* 2005, **5**(3-4):119-133.
29. Sherman JD: **Organophosphates pesticides - Neurological and respiratory toxicity.** *Toxicol Ind Health* 1995, **11**(1):33-39.
30. Boyer S, Serandour J, Lempriere G, Raveton M, Ravanel P: **Do herbicide treatments reduce the sensitivity of mosquito larvae to insecticides?** *Chemosphere* 2006, **65**(4):721-724.

31. Reynaud S, Deschaux P: **The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review.** *Aquat Toxicol* 2006, **77**(2):229-238.
32. Chiu TL, Wen ZM, Rupasinghe SG, Schuler MA: **Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**(26):8855-8860.
33. Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, et al.: **A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*.** *Science* 2002, **297**(5590):2253-2256.
34. Despres L, David JP, Gallet C: **The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals.** *Trends in Ecology & Evolution* 2007, **22**(6):298-307.
35. Vontas J, David JP, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson H: **Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization.** *Insect Mol Biol* 2007, **16**(3):315-324.
36. Zhang J, Goyer C, Pelletier Y: **Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say).** *Insect Mol Biol* 2008, **17**(3):209-216.
37. Selye H: **The stress of life, Revised Edition.** In *Circuits and systems in stress: preclinical studies. Depression and Anxiety Volume 15.* Edited by: Vermetten E, Bremner D. New York: McGraw-Hill; 1976:126-147.
38. Sanders BM, Martin LS: **Stress protein as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental-samples.** *Sci Total Environ* 1993, **140**:459-470.
39. Lee SM, Lee SB, Park CH, Choi J: **Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring.** *Chemosphere* 2006, **65**(6):1074-1081.
40. Balamurugan K, Hua HQ, Georgiev O, Schaffner W: **Mercury and cadmium trigger expression of the copper importer Ctr1B, which enables *Drosophila* to thrive on heavy metal-loaded food.** *Biol Chem* 2009, **390**(2):109-113.
41. Vache C, Camares O, De Graeve F, Dastugue B, Meinie A, Vaury C, Pellier S, Leoz-Garziandia E, Bamdad M: ***Drosophila melanogaster* P-glycoprotein: A membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants.** *Environ Toxicol Chem* 2006, **25**(2):572-580.
42. Palmfeldt J, Vang S, Stenbroen V, Pedersen CB, Christensen JH, Bross P, Gergersen N: **Mitochondrial proteomics on human fibroblasts for identification of metabolic imbalance and cellular stress.** *Proteome Science* 2009, **7**:20.
43. Holth TF, Nourizadeh-Lillabadi R, Blaesbjerg M, Grung M, Holbech H, Petersen GI, Alestrom P, Hylland K: **Differential gene expression and biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to produced water components.** *Aquat Toxicol* 2008, **90**(4):277-291.
44. Owen J, Hedley BA, Svendsen C, Wren J, Jonker MJ, Hankard PK, Lister LJ, Sturzenbaum SR, Morgan AJ, Spurgeon DJ, et al.: **Transcriptome profiling of developmental and xenobiotic responses in a keystone soil animal, the oligochaete annelid *Lumbricus rubellus*.** *BMC Genomics* 2008, **9**:266.
45. Reynaud S, Duchiron C, Deschaux P: **3-Methylcholanthrene induces lymphocyte and phagocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio* L) in vitro.** *Aquat Toxicol* 2004, **66**(3):307-318.
46. Reynaud S, Raveton M, Ravanel P: **Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review.** *Aquat Toxicol* 2008, **87**(3):139-145.
47. Knauer S, Dawo U, Hollender J, Hommen U, Knauer K: **Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms.** *Environ Toxicol Chem* 2009, **28**(4):836-845.
48. Knauer S, Escher B, Singer H, Hollender J, Knauer K: **Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms.** *Environ Sci Technol* 2008, **42**(17):6424-6430.
49. Harris ED: **Cellular copper transport and metabolism.** *Annu Rev Nutr* 2000, **20**:291-310.
50. Krupanidhi S, Sreekumar A, Sanjeevi CB: **Copper & biological health.** *Indian J Med Res* 2008, **128**(4):448-461.
51. Letelier ME, Martinez M, Gonzalez-Lira V, Faundez M, Aracena-Parks P: **Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper.** *Chem Biol Interact* 2006, **164**(1-2):39-48.
52. Posthuma L, Eijsacker HJP, Koelmans AA, Vijver MG: **Ecological effects of diffuse mixed pollution are site-specific and require higher-tier risk assessment to improve site management decisions: A discussion paper.** *Sci Total Environ* 2008, **406**(3):503-517.
53. Wurff AW Van der, Kools SA, Boivin ME, Brink PJ Van den, Van Megen HH, Riksen JA, Doroszuk A, Kammenga JE: **Type of disturbance and ecological history determine structural stability.** *Ecol Appl* 2007, **17**(1):190-202.
54. Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN: **Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments.** *Functional Ecology* 2007, **21**(3):394-407.
55. Gruessner B, Watzin MC: **Response of aquatic communities from a Vermont stream to environmentally realistic atrazine exposure in laboratory microcosms.** *Symposium on Methods for Monitoring Effects of Pesticides, at the 15th Annual Meeting of the Society-of-Environmental-Toxicology-and-Chemistry: Oct 30-Nov 03 1994; Denver, Co 1994*:410-419.
56. Komarek M, Vanek A, Chrastrny V, Szakova J, Kubova K, Drahotova P, Balik J: **Retention of copper originating from different fungicides in contrasting soil types.** *J Hazard Mater* 2009, **166**(2-3):1395-1402.
57. Durand C, Ruban V, Ambles A, Clozel B, Achard L: **Characterisation of road sediments near Bordeaux with emphasis on phosphorus.** *J Environ Monit* 2003, **5**(3):463-467.
58. Zehetner F, Rosenfellner U, Mentler A, Gerzabek MH: **Distribution of Road Salt Residues, Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons across a Highway-Forest Interface.** *Water Air and Soil Pollution* 2009, **198**(1-4):125-132.
59. Wu S, Manber U: **Agrep - a fast approximate pattern-matching tool.** *Proceedings USENIX Winter 1992 Technical Conference: 1992; San Francisco, CA 1992*:153-162.
60. Fisher RA: **The logic of inductive inference.** *Journal of the Royal Statistical Society Series A* 1935, **98**:39-54.
61. Kaiser HF: **The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis.** *Psychometrika* 1958, **23**(3):187-200.
62. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, et al.: **TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis.** *Biotechniques* 2003, **34**(2):374-378.
63. D'haeseleer P: **How does gene expression clustering work?** *Nat Biotechnol* 2005, **23**(12):1499-1501.
64. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:14863-14868.
65. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.

doi: 10.1186/1471-2164-11-216

Cite this article as: David et al., Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology *BMC Genomics* 2010, **11**:216

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



Publication IV

Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*

R. Poupardin*, M. A. Riaz*, J. Vontas†, J. P. David* and S. Reynaud*

*Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, UMR 5553 CNRS-Université) Grenoble, France; and †Department of Biology, Faculty of Biotechnology and Applied Biology, Laboratory Molecular Entomology, University of Crete, Herakleion, Crete, Greece

Abstract

Transcription profiles of 11 *Aedes aegypti* P450 genes from *CYP6* and *CYP9* subfamilies potentially involved in xenobiotic metabolism were investigated. Many genes were preferentially transcribed in tissues classically involved in xenobiotic metabolism including midgut and Malpighian tubules. Life-stage transcription profiling revealed important variations amongst larvae, pupae, and adult males and females. Exposure of mosquito larvae to sub-lethal doses of three xenobiotics induced the transcription of several genes with an induction peak after 48 to 72 h exposure. Several *CYP* genes were also induced by oxidative stress and one gene strongly responded to 20-hydroxyecdysone. Overall, this study revealed that these P450s show different transcription profiles according to xenobiotic exposures, life stages or sex. Their putative chemoprotective functions are discussed.

Keywords: cytochrome P450 monooxygenases, *CYPs*, *Aedes aegypti*, mosquitoes, gene induction, xenobiotics, detoxification, insecticides.

First published online 21 December 2009.

Correspondence: Stéphane Reynaud, Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR CNRS-Université 5553, Equipe Perturbations Environnementales et Xénobiotiques, Domaine Universitaire de Saint-Martin d'Hères, 2233, rue de la piscine Bât D Biologie, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France. Tel.: + 33 0 4 76 51 44 59; fax: + 33 0 4 76 51 44 63; e-mail: stephane.reynaud@ujf-grenoble.fr

Introduction

Cytochrome P450 monooxygenases (P450s or *CYPs* for individual proteins/genes) constitute a large ubiquitous superfamily of heme-containing enzymes (Feyereisen, 2005). Originally identified as monooxygenases, P450s are now known to catalyse an extremely diverse range of reactions playing important roles in development, metabolism and in the detoxification of foreign compounds (Scott *et al.*, 1998). In insects, P450s are involved in the metabolism of endogenous compounds such as steroid hormones and lipids. Amongst insect P450s, the best characterized ones are probably *Drosophila melanogaster* Halloween genes encoding the P450s involved in steroid hormone biosynthesis (Gilbert, 2004). Insect P450s are also involved in the metabolism of exogenous compounds (xenobiotics) from natural or anthropogenic origins. These P450s are highly diversified in insects, probably because of intense coevolution between herbivorous insects and defensive compounds produced by their host plants (Schuler, 1996; Berenbaum, 2002). This important genetic diversity reflects their diverse substrate specificities and the broad range of chemical reactions they catalyse (Scott & Wen, 2001).

Another characteristic of P450s is their frequent capacity to be induced by xenobiotics (Feyereisen, 2005). The relationship between the capacity of insect P450s to degrade xenobiotics and their ability to be induced by drugs and chemicals has sometimes been used for identifying genes responsible for insecticide resistance (Petersen *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2003). Recently, Wen *et al.* (2009) showed that uncommonly encountered phytochemicals, as well as synthetic substances, can enhance *Helicoverpa zea* metabolic activity in an adaptative fashion against both natural and synthetic toxins. Several studies have revealed that exposing mosquitoes to various chemicals, including pollutants and insecticides can increase their tolerance to insecticides through an induction of P450s (Boyer *et al.*, 2006; Poupardin *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2009). However, Willoughby *et al.* (2006) showed that *Drosophila* P450s involved in dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)

resistance were not induced by this insecticide, suggesting that the relationship between the capacity of an enzyme to metabolize an insecticide and its induction by the insecticide is not always correlated. Moreover, little is known about the long term impact of pollutants on the emergence of metabolic resistances. Müller *et al.* (2007) pointed out the fact that the season of intensive use of insecticides to protect cotton crops in Cameroon coincides with an increased tolerance of *Anopheles arabiensis* to pyrethroid insecticides and an increased transcription of various P450s. More recently, Djouaka *et al.* (2008) identified particular P450s specifically over-transcribed in insecticide-resistant *Anopheles gambiae* populations from urban, agricultural and oil-spillage areas.

Many additional factors such as sex, developmental stage, hormone titre, tissue expression and stress response have been involved in insect P450 regulation (Harrison *et al.*, 2001; Vontas *et al.*, 2005; Le Goff *et al.*, 2006). Characterizing the response of genes encoding P450 enzymes to these factors can also be of help for discerning those involved in xenobiotic degradation from those involved in other physiological processes (Chung *et al.*, 2009). In insects, *CYP6* and *CYP9* families are over-represented and have been frequently involved in detoxification of xenobiotics and metabolic resistance to insecticides (Daborn *et al.*, 2002; David *et al.*, 2005; Després *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2008; Strode *et al.*, 2008).

Previously, a microarray screening of all *Aedes aegypti* detoxification genes allowed us to identify several *CYP6s* and *CYP9s* induced by various xenobiotics including insecticides and pollutants (Poupardin *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2009). Some of these P450s, or their orthologues in other mosquito species, were found to be up-regulated in insecticide-resistant strains (David *et al.*, 2005; Strode *et al.*, 2008; Marcombe *et al.*, 2009). In the present study, transcription profiles of 11 *Ae. aegypti* *CYP6* and *CYP9* P450s potentially involved in insecticide resistance or xenobiotic response were investigated by real-time quantitative RT-PCR in order to identify those likely to be involved in xenobiotic metabolism. Differential transcription of these genes was investigated in relation to tissues, life stages and sex. Differential transcription was also investigated in a dynamic way in larvae exposed to sub-lethal doses of two pollutants and one insecticide. Finally, differential transcription in relation to oxidative stress and moulting hormone levels was investigated by exposing larvae to hydrogen peroxide (H₂O₂) and 20-hydroxyecdysone (20E).

Results and discussion

Protein sequence comparison to other insect P450s

As shown in Table 1, the *CYP6Z* subfamily has been frequently associated with resistance to chemical insecti-

cides in *An. gambiae*. Recently, Chiu *et al.* (2008) demonstrated the capacity of *An. gambiae* *CYP6Z1* to metabolize the insecticides DDT and carbaryl and McLaughlin *et al.* (2008) suggested that *An. gambiae* *CYP6Z2* also possesses a probable role in chemoprotection. The *CYP6M* subfamily, represented in our study by *CYP6M6* and *CYP6M11*, appeared interesting as recent studies have pointed out its potential role in insecticide resistance in *An. gambiae* (Müller *et al.*, 2007; Djouaka *et al.*, 2008). Recent results indicated that *An. gambiae* *CYP6M2*, similar to *Ae. aegypti* *CYP6M11* and *CYP6M6* can metabolize the pyrethroid insecticide permethrin (B. Stevenson, pers. comm.). Interestingly, the *Ae. aegypti* *CYP6AL1* did not seem to have a clear orthologue in *An. gambiae* but is rather close to the *Culex pipiens* *CYP6F1* previously found over-transcribed in a pyrethroid-resistant strain (Gong *et al.*, 2005). Finally, *Ae. aegypti* *CYP9s* considered in the present study appeared relatively close to *An. gambiae* *CYP9s*, but none of them or their most similar insect P450s have yet been associated with xenobiotic metabolism.

Transcription profiling according to larval tissues, life-stages and sex

Constitutive transcription profiles of *CYP* genes were first investigated in different larval tissues (Fig. 1, left side and Table S1). Transcription levels of these P450 genes appeared highly dependent on the tissues considered and could vary greatly amongst genes showing high sequence homology. Most analysed P450s were preferentially transcribed in the alimentary canal (anterior midgut, midgut and Malpighian tubules) comparatively to head and abdomen carcass. All analysed *CYP6Zs*, *CYP6Ms* and *CYP6Ns* displayed this transcription pattern except *CYP6Z6* was preferentially transcribed in head and anterior midgut. Despite 68% cDNA sequence homology and contiguous genomic location, *CYP9M8* and *CYP9M9* showed different transcription profiles in larval tissues. Both showed a low transcription level in abdomen carcass, but *CYP9M9* was preferentially transcribed in alimentary canal and under-transcribed in head whereas *CYP9M8* revealed a low transcription level in midgut and Malpighian tubules. Ai *et al.* (2009) have shown that two P450s (*CYP9A19* and *CYP9A21*) from *Bombyx mori* with striking sequence identity have different transcription patterns. *CYP9A19* was detectable in the brain, midgut and testis, whereas *CYP9A21* was found in the brain, fat body, epidermis and ovary, with no expression in the midgut. This phenomenon might be the consequence of their recent duplication followed by modification of their promoter sequence leading to different transcription profiles (Ai *et al.*, 2009). Finally, *CYP9J15* was the only *CYP* being preferentially transcribed in Malpighian tubules whereas

Table 1. Protein sequence comparison of studied P450s with other insect P450s

<i>Aedes aegypti</i> P450	Accession number	Role in xenobiotic response or insecticide resistance	Most similar insect P450	Accession number	Identity (%)	Species	Role in xenobiotic response or insecticide resistance
CYP6Z6	AAEL009123	(1) (3)*	CYP6Z2	AGAP008218	62	<i>Anopheles gambiae</i>	(5) (6) (7)
			CYP6Z3	AGAP008217	61	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6Z1	AGAP008219	58	<i>An. gambiae</i>	(5) (7) (8) (10)
			CYP6Z4	AGAP002894	60	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6D4	AE003740	41	<i>Drosophila melanogaster</i>	(9)
CYP6Z7	AAEL009130		CYP6Z2	AGAP008218	62	<i>An. gambiae</i>	(5) (6) (7)
			CYP6Z3	AGAP008217	61	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6Z1	AGAP008219	58	<i>An. gambiae</i>	(5) (7) (8) (10)
			CYP6Z4	AGAP002894	57	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6D4	AE003740	42	<i>D. melanogaster</i>	(9)
CYP6Z8	AAEL009131	(2)* (3)*	CYP6Z2	AGAP008218	61	<i>An. gambiae</i>	(5) (6) (7)
			CYP6Z3	AGAP008217	61	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6Z1	AGAP008219	59	<i>An. gambiae</i>	(5) (7) (8) (10)
			CYP6Z4	AGAP002894	59	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6D4	AE003740	41	<i>D. melanogaster</i>	(9)
CYP6Z9	AAEL009129	(4)	CYP6Z2	AGAP008218	60	<i>An. gambiae</i>	(5) (6) (7)
			CYP6Z3	AGAP008217	60	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6Z1	AGAP008219	57	<i>An. gambiae</i>	(5) (7) (8) (10)
			CYP6Z4	AGAP002894	57	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6D4	AE003740	40	<i>D. melanogaster</i>	(9)*
CYP6M6	AAEL009128	(1) (2)*	CYP6M3	AGAP008213	61	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6M2	AGAP008212	60	<i>An. gambiae</i>	(7)(12)
			CYP6M4	AGAP008214	58	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6M1	AGAP008209	56	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6N2	AGAP008206	50	<i>An. gambiae</i>	(12)
CYP6M11	AAEL009127	(1) (2)*	CYP6M3	AGAP008213	68	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6M2	AGAP008212	66	<i>An. gambiae</i>	(7)(12)
			CYP6M4	AGAP008214	61	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6M1	AGAP008209	60	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6N2	AGAP008206	51	<i>An. gambiae</i>	
CYP6N12	AAEL009124	(2)* (3)*	CYP6N1	AGAP008210	60	<i>An. gambiae</i>	(12)
			CYP6N2	AGAP008206	58	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6M3	AGAP008213	55	<i>An. gambiae</i>	
			CYP6M2	AGAP008212	54	<i>An. gambiae</i>	(7)(12)
			CYP6M4	AGAP008214	52	<i>An. gambiae</i>	
CYP6AL1	AAEL008889	(2)* (5)*	CYP6F1	AB001324	54	<i>Culex pipiens</i>	(11)
			CYP6BE1	AADG05009058	40	<i>Apis mellifera</i>	
			CYP6AZ1	AY884043	37	<i>Momomorium destructor</i>	
			CYP6N1	AGAP008210	39	<i>An. gambiae</i>	(12)
			CYP6M4	AGAP008214	37	<i>An. gambiae</i>	
CYP9M8	AAEL009591	(2)*	CYP9M1	AGAP009363	50	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9M2	AGAP009375	47	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9K1	AGAP000818	40	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9E1	AY509245	37	<i>Dasiprocta punctata</i>	
			CYP9J4	AGAP012292	35	<i>An. gambiae</i>	
CYP9M9	AAEL001807	(2)*	CYP9M1	AGAP009363	53	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9M2	AGAP009375	53	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9E1	AY509245	39	<i>D. punctata</i>	
			CYP9K1	AGAP000818	39	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9E2	AF275640	37	<i>Blattella germanica</i>	
CYP9J15	AAEL006795	(2)*	CYP9J3	AGAP012291	58	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9J4	AGAP012292	48	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9J5	AGAP012296	51	<i>An. gambiae</i>	
			CYP9E2	AF275640	42	<i>B. germanica</i>	
			CYP9L2	AGAP012294	43	<i>An. gambiae</i>	

Percentages of identities were obtained by comparing protein sequences with known insect P450s from the insect P450 website (<http://p450.sophia.inra.fr>) using the BLASTP function. References describing the possible involvement of each P450 in xenobiotic induction (*) or constitutive insecticide resistance are indicated. Numbers refer to publications. (1) Marcombe *et al.*, 2009, (2) Poupardin *et al.*, 2008, (3) Riaz *et al.*, 2009, (4) Strode *et al.*, 2008, (5) David *et al.*, 2005, (6) McLaughlin *et al.*, 2008, (7) Müller *et al.*, 2007, (8) Chiu *et al.*, 2008 (9), Willoughby *et al.*, 2006, (10) Nikou *et al.*, 2003, (11) Gong *et al.*, 2005, (12) Djouaka *et al.*, 2008.

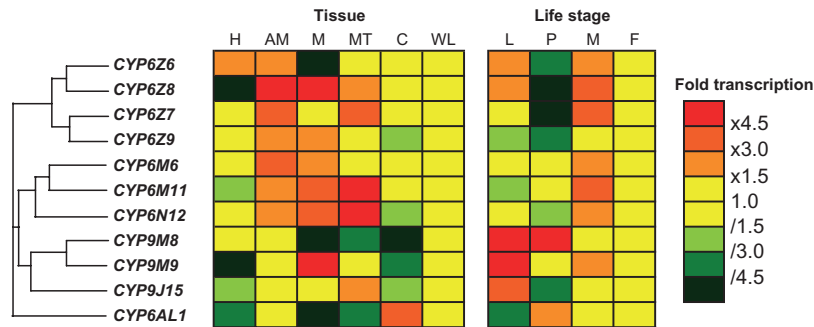


Figure 1. Constitutive transcription profiles of 11 *Aedes aegypti* P450s across different larval tissues (left) and different life stages (right). Tissues analysed were: whole larva (WL), head (H), anterior midgut including gastric caeca (AM), midgut (M), Malpighian tubules (MT) and abdomen carcass (C). Life stages analysed were: fourth-stage larvae (L), pupae (P), 3-day-old adult males (M) and 3-day-old adult females (F). Transcription levels are expressed as mean fold transcription relative to whole larvae (tissues) or adult females (life-stages). Red and green indicate significant over- and under-transcription respectively (ratio >1.5-fold in either direction and Mann–Whitney test P -value < 0.05). Yellow indicates no significant transcription variations. Genes are organized according to their protein sequence homology.

CYP6AL1 was the only gene preferentially transcribed in abdomen carcass. In their breeding sites, *Aedes* larvae are indiscriminate filter feeders continuously exposed to a wide range of xenobiotics dissolved in water or bound to food particles (Aly, 1988). The preferential transcription of these P450s in the larval alimentary canal might be related to their ability to metabolize xenobiotics present in their environment (Li *et al.*, 2008). In *Drosophila*, *CYP6G1* was associated with DDT resistance and was over-transcribed in the Malpighian tubules, midgut and fat bodies (Chung *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007), suggesting that xenobiotic metabolism may be linked to the renal function in this species. More generally, 40% of *D. melanogaster* P450s were found transcribed in the midgut supporting the hypothesis of the alimentary canal being the main xenobiotic defence tissue (Li *et al.*, 2008). Similarly, a recent study revealed that most *An. gambiae* P450s were over-transcribed in the midgut, hindgut and Malpighian tubules, suggesting that these tissues play a major role in xenobiotic detoxification (Neira Oviedo *et al.*, 2008). Yang *et al.* (2007) suggested that the midgut constitutes the first barrier for ingested chemicals, whereas the tubules are more likely to handle topically applied agents that appear in the haemocoel. Our data demonstrated that *Ae. aegypti* *CYP6Z7*, *CYP6Z8*, *CYP6M6*, *CYP6M11* and *CYP6N12* are preferentially transcribed in the larval alimentary canal and Malpighian tubules.

Secondly, we investigated the influence of the development stage on P450 transcription levels by comparing fourth stage larvae, pupae, adult males and adult females (Fig. 1, right side and Table S1). Most of the P450s studied were over-transcribed in adult males compared to adult females. All *CYP6Zs* except *CYP6Z9* followed this pattern. Le Goff *et al.* (2006) identified similar transcription patterns for several *D. melanogaster* *CYP6* genes. The *An. gambiae* *CYP6Z1* was also found to be over-transcribed in adult males compared to adult

females in both pyrethroid resistant and susceptible strains (Nikou *et al.*, 2003). Female mating can regulate P450s expression and the frequent down-regulation of P450s in females could result from a trade-off in resource allocation between reproduction and detoxification (McGraw *et al.*, 2004). Our results revealed that *CYP6Z6*, *CYP6Z8*, *CYP9M9* and *CYP9J15* were all over-transcribed in larvae compared to pupae. During the pupal stage, mosquitoes do not feed and in consequence are less exposed to dietary xenobiotics. Therefore, the under-transcription of P450s involved in dietary xenobiotic detoxification during this stage is not surprising. Strode *et al.* (2006) have described the same transcription pattern for *CYP6Z2* and *CYP6Z3* in *An. gambiae*. Conversely, *CYP9M8* and *CYP6AL1* were both strongly over-transcribed in pupae compared to larvae (18- and ninefold, respectively). The over-transcription of these two P450s at the pupal stage may be linked to metabolic or hormonal changes during pupation. In *Ae. aegypti*, Margam *et al.* (2006) found an increase in ecdysteroid level at the beginning of the pupal stage which may affect the transcription of particular P450s. As for tissue transcription profiles, despite highly similar sequences, *CYP9M9* and *CYP9M8* showed a marked differential transcription in pupae ($\times 621$ -fold vs. $/1.25$ -fold comparatively to adult females) suggesting a different role in pupal development. Despite different transcription profiles in larval tissues and pupae, these two P450s were both highly over-transcribed in larvae compared to the adults ($\times 35$ -fold) suggesting that they may play distinct but significant roles in larvae.

Transcription profiling in larvae exposed to xenobiotics

The induction capacity of the 11 studied P450s by xenobiotics was investigated by exposing larvae to sub-lethal doses of three different xenobiotics: the polycyclic aro-

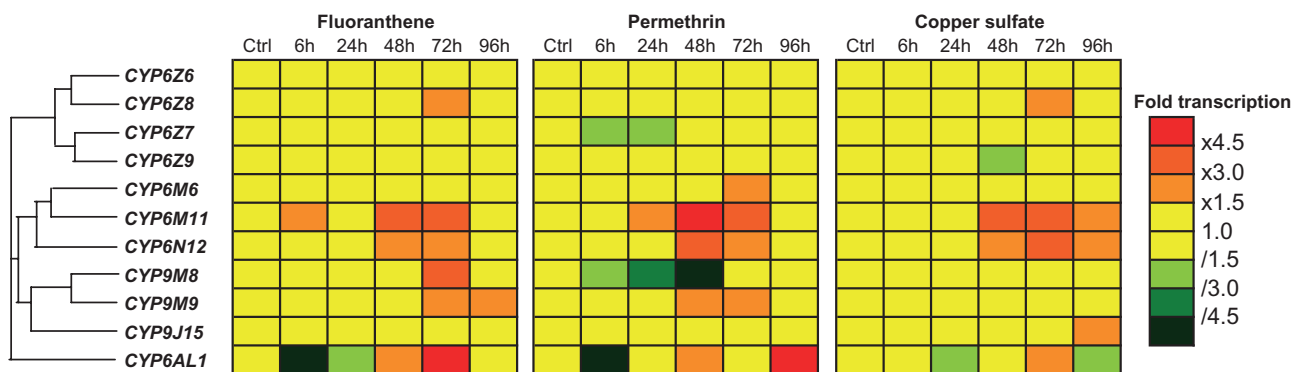


Figure 2. Transcription profiles of 11 P450s in *Aedes aegypti* larvae exposed from 6 to 96 h to sub-lethal concentrations of three different xenobiotics: the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene, the pyrethroid insecticide permethrin and the heavy metal copper. For each time point, transcription levels are expressed as mean fold transcription relative to controls (unexposed larvae). Red and green indicate significant over- and under-transcription respectively (ratio >1.5-fold in either direction and Mann–Whitney test *P*-value < 0.05). Yellow indicates no significant transcription variations. Genes are organized according to their protein sequence homology.

matic hydrocarbon fluoranthene, the pyrethroid insecticide permethrin and the heavy metal copper (Fig. 2 and Table S2). For each gene, transcription levels in larvae exposed to each xenobiotic were measured up to 96 h following xenobiotic exposure and normalized according to controls (unexposed larvae).

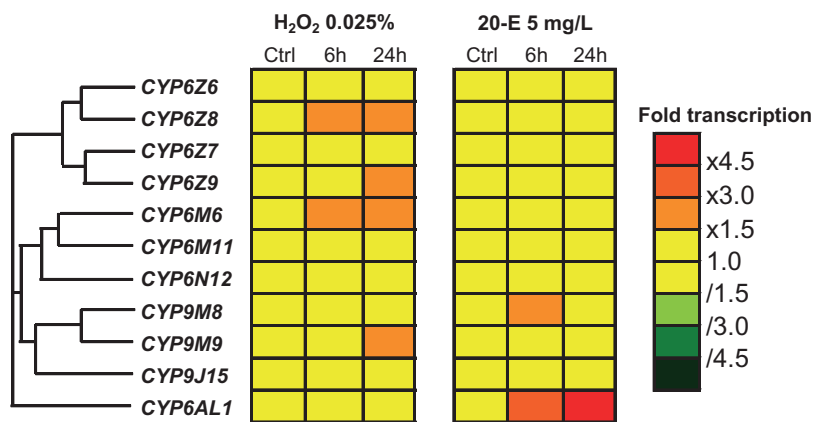
These experiments confirmed the capacity of particular P450s to be induced by sub-lethal doses of xenobiotics. Bearing in mind the low xenobiotic concentrations used, the maximum peak of induction was observed after 48 to 72 h of exposure. Amongst the 11 analysed genes, six were induced by fluoranthrene, five by permethrin and five by copper sulphate. Interestingly, *CYP6M11*, *CYP6N12* and *CYP6AL1* were induced by all xenobiotics. All genes induced by the three xenobiotics, except *CYP6AL1*, were also preferentially transcribed in the alimentary canal (Fig. 1), supporting a significant role of these tissues in xenobiotic response. Finally, *CYP6AL1* displayed a particular transcription profile in larvae exposed to xenobiotics with marked down-regulation a few hours after the beginning of exposure followed by

gradual up-regulation. Considering that this gene does not show tissue and life-stage transcription profiles likely to be associated with xenobiotic metabolism (see above), these variations might be the consequence of the stress generated by xenobiotics and/or the indirect effect of xenobiotics on larval development.

Transcription variations in response to oxidative stress and 20E

To investigate the effect of oxidative stress on the 11 P450s studied, *Ae. aegypti* larvae were exposed to H₂O₂ for 6 and 24 h (Fig. 3 left side and Table S3). Several genes including *CYP6Z8*, *CYP6Z9*, *CYP6M6*, and *CYP9M9* were induced by oxidative stress at one or both time points. Interestingly, most of the genes induced by H₂O₂ except *CYP6Z9* were induced by at least one xenobiotic supporting the hypothesis that the induction of some detoxification genes following xenobiotic exposure could be the result of oxidative stress (Ding *et al.*, 2005).

Figure 3. Transcription profiles of 11 P450s in *Aedes aegypti* larvae exposed to sub-lethal concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and 20-hydroxyecdysone (20E). Larvae were exposed during 6 and 24 h to 0.025% of H₂O₂ and 5 mg/l 20E. For each time point, transcription levels are expressed as mean fold transcription relative to controls (unexposed larvae). Red and green indicate significant over- and under-transcription respectively (ratio >1.5-fold in either direction and Mann–Whitney test *P*-value < 0.05). Yellow indicates no significant transcription variations. Genes are organized according to their protein sequence homology.



Differential P450 transcription during mosquito development may be explained by hormonal variations such as moulting hormone fluctuations. To test this hypothesis, mosquito larvae were exposed to 20E, the active moulting hormone for 6 and 24 h (Fig. 3 right side and Table S3). Only *CYP6AL1* showed a strong response to 20E, suggesting that this gene may play a significant role in moults, metamorphosis and/or hormone metabolism. This hypothesis is supported by a chaotic xenobiotic induction profile, a preferential transcription in the abdomen carcass and an over-transcription in pupae. Similarly, *CYP9M8*, found over-transcribed in pupae and down-regulated in the alimentary canal, slightly responded to 20E, suggesting that this gene may also have a possible role in endogenous metabolism.

Conclusion

In the present study, transcription profiles of 11 *Ae. aegypti* *CYP6s* and *CYP9s* were investigated in order to identify those possibly involved in xenobiotic metabolism. Following these results, most *CYP6Zs* but also *CYP6M11*, *CYP6M6* and *CYP6N12* are all preferentially transcribed in typical detoxification tissues and larvae or adult males. Most of these genes are also inducible by various xenobiotics and oxidative stress. Although the unambiguous functional characterization of these enzymes requires further experimental work such as heterologous expression followed by *in vitro* metabolism studies, these P450s are likely to have a chemoprotective role in *Ae. aegypti*.

Experimental procedures

Choice of studied P450s and sequence analysis

Candidate *Ae. aegypti* *CYP* genes were chosen for their ability to be induced by pesticides or pollutants (Poupardin *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2009) and for their putative role in insecticide resistance according to the literature (Table 1). Considering the high sequence similarity of *CYP6Zs*, we decided to analyse the transcription profile of all subfamily members. For each P450, protein sequence was compared to other available insect P450s by using the local BLASTP function available at the insect P450 website (<http://p450.sophia.inra.fr>). For each P450, only the five BLASTP hits showing the smallest *E*-values were considered. The involvement of those similar insect P450s in insecticide resistance and/or xenobiotic induction was reported based on the existing literature.

Mosquitoes and sample preparation

A laboratory *Ae. aegypti* strain susceptible to insecticides (Bora-Bora strain) was reared in standard insectary conditions (27 °C, 16 h/8 h light/dark period, 80% relative humidity) and used for all experiments. Larvae were reared in tap water and fed with standard larval food (hay pellets). Each experiment was per-

formed with three independent egg batches from different generations (three biological replicates).

P450 transcription profiles were first investigated at four different life stages: fourth-stage larvae, pupae, adult males and adult females (3-days post emergence, nonblood-fed). For each biological replicate, 30 fresh individuals of each life stage were collected and immediately used for RNA extractions.

Transcription profiles were then investigated in different larval tissues obtained by dissecting fourth stage larvae. The different larval tissues studied were: whole larvae (WL), head (H), anterior midgut including gastric caeca (AM), midgut (M), Malpighian tubules and hindgut (MT) and carcass from abdomens (C). Tissues were dissected from more than 200 fresh larvae in ice-cold RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) and stored in RNAlater at 4 °C until RNA extractions.

The capacity of P450s to be induced by xenobiotics was investigated by exposing larvae to three different xenobiotics for 6 to 96 h. To avoid any bias because of pupation during xenobiotic exposure, third-stage larvae were used for exposure, leading to fourth-stage larvae after 96 h exposure. Xenobiotics used for larval exposure were: the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene (Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), the pyrethroid insecticide permethrin (Chem Service, West Chester, PA, USA) and the heavy metal copper (obtained from copper sulphate; Prolabo, France). Concentrations used for larval exposure were chosen according to the concentrations likely to be found in highly polluted environments (INERIS, <http://www.ineris.fr>). For the insecticide permethrin, a concentration of 1 µg/l resulting in less than 5% larval mortality after 96 h exposure was chosen. For the other xenobiotics, no larval mortality was observed during exposure and doses of 25 µg/l and 1 mg/l were chosen for fluoranthene and copper sulphate, respectively. Time-points chosen for monitoring gene transcription comparatively to unexposed larvae were 6, 24, 48, 72 and 96 h after the beginning of exposure. Exposures to all xenobiotics were performed in six replicates of 100 homogenous 2-day-old larvae in 200 ml tap water and 50 mg larval food (ground hay pellets). At each time point, three × 30 larvae were collected, rinsed twice in tap water and immediately used for RNA extractions.

The capacity of P450s to respond to oxidative stress and moulting hormone level was investigated by exposing fourth-stage larvae to H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and purified 20E kindly provided by Dr C. Dauphin-Villemant (Univ. Pierre et Marie Curie, France). Preliminary experiments allowed us to choose a concentration of H₂O₂ resulting in less than 5% mortality after 24 h. Similarly, a concentration of 20E resulting in no larval mortality and no modification of larval development time was chosen. Fourth-stage larvae were exposed during 6 and 24 h to 0.025% H₂O₂ or 5 mg/l 20E. Exposures were repeated three times with different egg batches. At each time point, 30 larvae were collected, rinsed twice in tap water and immediately used for RNA extractions.

RNA extractions and real-time quantitative RT-PCR

Total RNAs from each sample were extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Four micrograms of total RNAs were treated with DNase I (Invitrogen) for 20 min at 20 °C and used for cDNA synthesis with Superscript III (Invitrogen) and oligo-dT₂₀ primer (Invitrogen) for 60 min at 50 °C according to the manufacturer's

Table 2. Primers used for quantitative real-time PCR experiments

Primer	Sequence (5' to 3')	Annealing temperature*	Product length	Product Tm
CYP6Z6_forward	CTGCCTATTGGACTTATGC	54.5	113	79
CYP6Z6_reverse	ATCACAACTGGATTCTGG			
CYP6Z8_forward	AGGTTGTGATCCCATTGC	52	172	80
CYP6Z8_reverse	ACCATTACGCCATTCTG			
CYP6Z7_forward	TGTAGAGTCTTGCGGGAAG	54	157	82.5
CYP6Z7_reverse	CGATTTGTTCACTCACGATTC			
CYP6Z9_forward	TTTGCCCTGGACTGCTTAG	55	138	81
CYP6Z9_reverse	GTTGCTGGATGAAATCTTTACG			
CYP6M6_forward	CAGTTCAGCGAGTATATGG	52	198	82
CYP6M6_reverse	ATCTTTCTTCTATTCTTGG			
CYP6M11_forward	AGGTTAAGCAGGAGAGTG	51	198	82.5
CYP6M11_reverse	CCTTAGGCATAGTGTTCATC			
CYP6N12_forward	TGGGTGCTGTGAGGGATAC	54.5	122	78.5
CYP6N12_reverse	AGTCAATGTCTCTGTGTTGCC			
CYP9M8_forward	TCCAGAACACCTTGCCAAC	54	78	76
CYP9M8_reverse	CTTACAATGCCATTATCCAAACG			
CYP9M9_forward	AAGGAGATTGGGAAATGATGTG	58	107	79
CYP9M9_reverse	TTGACAAACGCTTTCCACTACTG			
CYP9J15_forward	CCGCAGAAGAGTCCCAAG	54.5	98	83
CYP9J15_reverse	GAACCCAGCCGAGAAGAAG			
CYP6AL1_forward	CAACGCTGATGTCATTCTG	52	189	81.5
CYP6AL1_reverse	GGAACGATACTGGAGGATG			

*Annealing temperatures were chosen according to optimal PCR efficiency and primer specificity. Product TM, product melting temperature.

instructions. Resulting cDNAs were diluted 100 times in ultra-high quality water for real-time quantitative RT-PCR reactions. Real-time quantitative PCR reactions of 25 μ l were performed on an iQ5 system (BioRad, Hercules, CA, USA) using MesaGreen Supermix (Eurogentec, Liège, Belgium), 0.3 μ M of each primer and 5 μ l of diluted cDNAs according to the manufacturers' instructions. For each gene analysed, a cDNA dilution scale from five to 50 000 times was performed in order to assess PCR efficiency and quantitative differences amongst samples. For each gene analysed, a melt curve analysis was performed to check for the unique presence of the targeted PCR product and the absence of significant primer dimers. Primers used for real-time quantitative PCR are listed in Table 2. Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_t$ method taking into account PCR efficiency (Pfaffl, 2001) and using the housekeeping genes encoding the ribosomal protein L8 (*AeRPL8*, GenBank accession no.: DQ440262) and the ribosomal protein S7 (*AeRPS7*, GenBank accession no.: EAT38624.1) for a dual-gene normalization. For xenobiotic exposure experiments, results were expressed as mean transcription ratios (fold) between larvae exposed to each xenobiotics and controls at each time point. For life-stage experiments, results were expressed as mean transcription ratios (fold) relative to adult females. For tissue experiments, results were expressed as mean transcription ratios (fold) relative to whole larvae. Quantitative RT-PCR data were computed by using a Mann-Whitney test on transcription ratios (H_0 : transcription ratio = 1). Genes were considered significantly over-transcribed when the transcription ratio minus SE was superior to 1.5 and the Mann-Whitney *P*-value was <0.05. Reciprocally, genes were considered significantly under-transcribed when transcription ratio

plus SE was inferior to 0.67 (corresponding to 1.5-fold under-transcription) and the Mann-Whitney *P*-value was <0.05.

Acknowledgements

This research project was funded by the French National Research Agency (Agence Nationale de la Recherche, ANR 'Santé-Environnement Santé-travail') grant MOSQUITO-ENV N° 07SEST014. We are grateful to Dr Chantal Dauphin-Villemant for providing purified 20E and useful comments on the manuscript. We thank J. Patoureaux for technical help and mosquito rearing and Professor P. Ravanel for useful comments on the manuscript. We thank Dr Eric Coissac for providing advice on the statistical analysis.

References

- Ai, J., Yu, Q., Cheng, T., Dai, F., Zhang, X., Zhu, Y. *et al.* (2009) Characterization of multiple CYP9A genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol Biol Rep*, doi: 10.1007/511033-009-09580-9.
- Aly, C. (1988) Filtration rates of mosquito larvae in suspensions of latex microspheres and yeast cells. *Entomol Exp Appl* **46**: 55–61.
- Berenbaum, M.R. (2002) Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *J Chem Ecol* **28**: 873–896.
- Boyer, S., David, J.P., Rey, D., Lemperiere, G. and Ravanel, P. (2006) Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae

- to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities. *Environ Toxicol Chem* **25**: 470–476.
- Chiu, T.L., Wen, Z., Rupasinghe, S.G. and Schuler, M.A. (2008) Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 8855–8860.
- Chung, H., Bogwitz, M.R., McCart, C., Andrianopoulos, A., Ffrench-Constant, R.H., Batterham, P. *et al.* (2006) Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene *Cyp6g1*. *Genetics* **175**: 1071–1077.
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P. and Daborn, P.J. (2009) Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 5731–5736.
- Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S. *et al.* (2002) A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* **297**: 2253–2256.
- David, J.P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P.M. *et al.* (2005) The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4080–4084.
- Després, L., David, J.P. and Gallet, C. (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* **22**: 298–307.
- Ding, Y., Hawkes, N., Meredith, J., Eggleston, P., Hemingway, J. and Ranson, H. (2005) Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochem J* **387**: 879–888.
- Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Coulibaly, O.N., Akogbeto, M.C., Ranson, H., Hemingway, J. *et al.* (2008) Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* **9**: 538.
- Feyereisen, R. (2005) Insect Cytochrome P450. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S., eds), pp. 1–77. Elsevier, Oxford.
- Gilbert, L.I. (2004) Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* **215**: 1–10.
- Gong, M.Q., Gu, Y., Hu, X.B., Sun, Y., Ma, L., Li, X.L. *et al.* (2005) Cloning and overexpression of CYP6F1, a cytochrome P450 gene, from deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**: 317–326.
- Harrison, T.L., Zangerl, A.R., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. (2001) Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a host-plant allelochemical. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**: 179–189.
- Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L. *et al.* (2006) Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem Mol Biol* **36**: 674–682.
- Li, H.M., Buczkowski, G., Mittapalli, O., Xie, J., Wu, J., Westerman, R. *et al.* (2008) Transcriptomic profiles of *Drosophila melanogaster* third instar larval midgut and responses to oxidative stress. *Insect Mol Biol* **17**: 325–339.
- McGraw, L.A., Gibson, G., Clark, A.G. and Wolfner, M.F. (2004) Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* **14**: 1509–1514.
- McLaughlin, L.A., Niazi, U., Bibby, J., David, J.P., Vontas, J., Hemingway, J. *et al.* (2008) Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2. *Insect Mol Biol* **17**: 125–135.
- Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C. *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.
- Margam, V.M., Gelman, D.B. and Palli, S.R. (2006) Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Insect Physiol* **52**: 558–568.
- Müller, P., Donnelly, M.J. and Ranson, H. (2007) Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics* **8**: 36.
- Neira Oviedo, M., Vanekeris, L., Corena-McLeod, M.D. and Linser, P.J. (2008) A microarray-based analysis of transcriptional compartmentalization in the alimentary canal of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insect Mol Biol* **17**: 61–72.
- Nikou, D., Ranson, H. and Hemingway, J. (2003) An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* **318**: 91–102.
- Petersen, R.A., Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R. and Schuler, M.A. (2001) Expression of *CYP6B1* and *CYP6B3* cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 679–690.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J. and David, J.P. (2008) Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 540–551.
- Riaz, M.A., Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H. and 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.
- Schuler, M.A. (1996) The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol* **112**: 1411–1419.
- Scott, J.G. and Wen, Z. (2001) Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag Sci* **57**: 958–967.
- Scott, J.G., Liu, N. and Wen, Z. (1998) Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **121**: 147–155.
- Strode, C., Steen, K., Ortelli, F. and Ranson, H. (2006) Differential expression of the detoxification genes in the different life stages of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **15**: 523–530.

- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R. *et al.* (2008) Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 113–123.
- Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A.C., David, J.P., Kafatos, F.C., Louis, C. *et al.* (2005) Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol Biol* **14**: 509–521.
- Wen, Z.M., Pan, L.P., Berenbaum, M.R. and Schuler, M.A. (2003) Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 937–947.
- Wen, Z., Zeng, R.S., Niu, G., Berenbaum, M.R. and Schuler, M.A. (2009) Ecological significance of induction of broad-substrate cytochrome P450s by natural and synthetic inducers in *Helicoverpa zea*. *J Chem Ecol* **35**: 183–189.
- Willoughby, L., Chung, H., Lumb, C., Robin, C., Batterham, P. and Daborn, P.J. (2006) A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochem Mol Biol* **36**: 934–942.
- Yang, J., McCart, C., Woods, D.J., Terhzaz, S., Greenwood, K.G., ffrench-Constant, R.H. *et al.* (2007) A *Drosophila* systems

approach to xenobiotic metabolism. *Physiol Genomics* **30**: 223–231.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article under the DOI reference: DOI 10.1111/j.1365-2583.2009.00967.x

Table S1. Constitutive transcription profiles of 11 *Aedes aegypti* P450s across different larval tissues and different life stages.

Table S2. Transcription profiles of 11 P450s in *Aedes aegypti* larvae exposed to three different xenobiotics.

Table S3. Transcription profiles of 11 P450s in *Aedes aegypti* larvae exposed to hydrogen peroxide and 20-hydroxyecdysone.

Please note: Neither the Editors nor Wiley-Blackwell are responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Chapitre III : Impact à long terme des polluants sur la biologie des moustiques

Le chapitre précédent a mis en évidence que l'exposition de larves de moustiques à des doses sub-létales de xénobiotiques peut modifier leur tolérance vis-à-vis de différents insecticides chimiques et que cette augmentation de tolérance peut être expliquée par l'induction de différents gènes, notamment ceux impliqués dans la détoxification. Dans des gîtes continuellement exposés à des polluants et traités avec des insecticides chimiques, il est important d'étudier l'impact à long terme des xénobiotiques sur l'apparition des mécanismes de résistance aux insecticides et la sélection des gènes associés. Autrement dit, les polluants peuvent-ils agir sur la sélection de mécanismes de résistance aux insecticides chimiques chez les moustiques, et si oui, ces polluants favorisent-ils la sélection de certains gènes en particulier ? Ces questions sont originales et à notre connaissance, aucune étude présente dans la littérature n'a pu y répondre clairement. De nombreuses études traitent de la sélection des mécanismes de résistances chez les moustiques, tandis que d'autres traitent de l'adaptation des organismes à de forts niveaux de pollution mais aucune étude expérimentale n'a jusqu'ici combiné la présence de polluants et la force de sélection induite par les insecticides.

Pour tenter de répondre à ces questions, différentes approches ont été menées au cours de la présente thèse. Une première approche expérimentale basée sur la sélection avec l'insecticide pyréthrianoïde perméthrine de différentes souches de moustiques préalablement exposées ou non à des doses sub-létales de différents polluants a été menée au laboratoire. Les études toxicologiques et transcriptomiques ensuite réalisées sur ces différentes souches ont montré que la présence de polluants est susceptible d'agir sur les mécanismes de sélection induits par les insecticides (**Publication V**).

En parallèle, une collaboration avec l'IRD (laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Montpellier) nous a permis de travailler sur des souches d'*Ae. aegypti* multi-résistantes aux insecticides de Martinique et de découvrir que ces résistances étaient liées à des mutations de cibles mais aussi dues à de la surexpression de différentes enzymes de détoxification. Une étude populationnelle plus précise de la résistance aux insecticides et de la pollution chimique observée en Martinique nous a ensuite permis de proposer des hypothèses

quant à l'apparition des mécanismes de résistances aux insecticides observés à la Martinique (**Publications VI et VII**).

D'une manière globale, cette deuxième partie a permis de mettre en évidence **l'impact potentiel de l'environnement chimique** des moustiques sur **l'apparition des mécanismes de résistances aux insecticides**.

Liste des publications pour le chapitre III :

Publication V: Poupardin R, Riaz MA, Jones C, Strode C, Chandor-Proust A, Ranson H, Reynaud S and David JP. Do environmental pollutants affect the selection of genes involved in insecticide resistance in mosquitoes? Experimental evidences from transcriptomics. En préparation.

Apport personnel : Conception de l'étude et design expérimental, expérimentations, interprétation des résultats et rédaction du manuscrit.

Publication VI: Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yébakima 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.

Apport personnel : Expérimentations de biochimie et transcriptomique (puces à ADN et RT-qPCR) et participation à la rédaction du manuscrit.

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

Apport personnel : Préparation des échantillons, participation à l'extraction des ARNs et aux expérimentations de RT-qPCR. Contribution à la rédaction du manuscrit.

I/ Les polluants peuvent-ils influencer la sélection des mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques ? (Publication V)

1/ Approche expérimentale utilisée

Pour mettre en évidence l'impact possible des polluants environnementaux sur les mécanismes de la résistance aux insecticides chimiques héritée chez les moustiques, nous avons opté pour une approche expérimentale en conditions contrôlées combinant une sélection avec un insecticide chimique et une exposition à des xénobiotiques. La perméthrine, insecticide de la famille des pyrethrinoïdes, a été choisie pour la sélection des larves de moustiques. Bien que cet insecticide ne soit pas utilisé en tant que larvicide, il reste cependant un bon insecticide modèle sur lequel nous avons accumulé de nombreuses données au cours des études précédentes, concernant ses interactions avec les polluants. Le choix des xénobiotiques utilisés pour l'exposition des larves à chaque génération s'est porté sur deux molécules. La première est le HAP fluoranthène qui s'est révélé être un inducteur de la transcription de certains gènes, notamment ceux impliqués dans la détoxification. De plus, nous avons montré précédemment que l'exposition des larves à ce polluant entraîne une augmentation de tolérance à certains insecticides chimiques, notamment la perméthrine. La deuxième molécule choisie pour l'exposition des larves avant la sélection est la perméthrine (à des doses très faibles) afin de mimer les résidus de traitements insecticides potentiellement rencontrés dans l'environnement des larves pendant leur développement.

L'approche expérimentale utilisée est résumée dans la Figure 23. Brièvement, une souche sensible d'*Ae. aegypti* (souche Bora-Bora) a été utilisée comme souche parente pour sélectionner les trois souches Noexp-Perm, Fluo-Perm, et Perm-Perm. Les larves de la souche Noexp-perm sont élevées dans de l'eau dénuée de xénobiotique avant leur sélection à la perméthrine au stade 4 (taux de mortalité entre 60 et 80%). Pour les deux autres souches, les larves (stade 2/3) sont exposées durant 72 heures à 100 µg/L de fluoranthène (souche Fluo-Perm) ou à une dose sub-létale (0,4 µg/L) de perméthrine (souche Perm-Perm) avant sélection au stade 4.

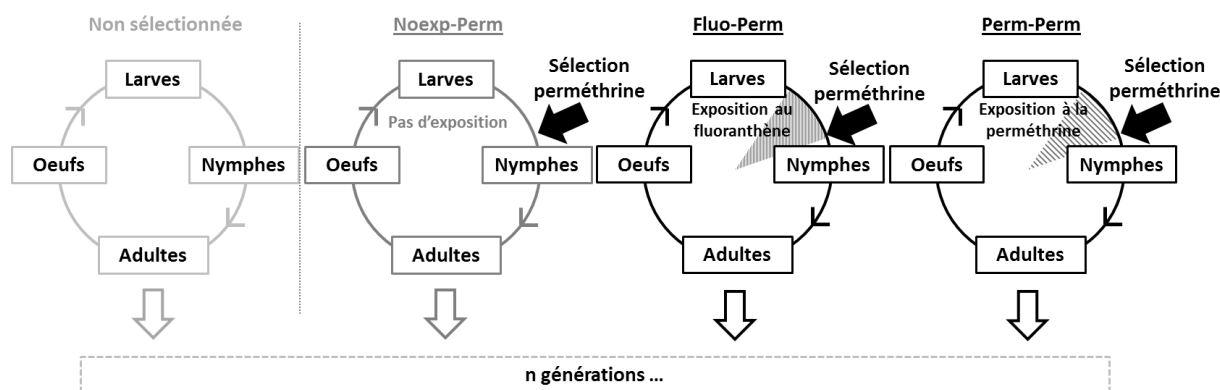


Figure 23: Approche expérimentale utilisée pour étudier l'impact de l'exposition de larves de moustiques au polluant fluoranthène ou à des résidus de l'insecticide perméthrine sur la sélection de la résistance à l'insecticide perméthrine.

Après 10 générations de sélection, des tests toxicologiques ont permis de comparer les niveaux de résistance larvaire constitutive des trois souches vis-à-vis de la perméthrine. L'utilisation d'une puce à ADN représentant plus de 14200 transcrits d'*Ae. aegypti* (Agilent 8 x 15K) a permis d'identifier les gènes différentiellement transcrits au sein de chaque souche sélectionnée comparativement à la souche parentale non sélectionnée. Les transcrits présentant des rapports de transcription supérieurs à 1,5 fois (sur- ou sous-transcription) en comparaison de la souche parentale et une P-value après correction de test multiples < 0.01 ont été considérés comme significatifs. Pour l'analyse des données, une analyse comparative de la fonction des 423 gènes retrouvés différentiellement transcrits dans au moins une souche a été conduite. Pour cela, les gènes ont été classés en douze catégories « fonctionnelles » distinctes : enzymes de détoxication, deshydrogénases, kinases/phosphatases, autres enzymes, transport/chaperones, métabolisme des hormones, catabolisme/anabolisme cellulaire, interactions avec l'ADN, cytosquelette, protéines ribosomales, protéines hypothétiques et autres protéines. Les pourcentages de gènes significativement sur- et sous-transcrits ont été comparés pour chaque souche d'une part mais aussi entre les différentes souches résistantes. Pour étudier plus précisément le rôle potentiel des gènes codant pour les enzymes de détoxication dans la résistance des différentes souches, une analyse par hiérarchisation des patrons de transcription (« Clustering ») a été réalisée. Les arbres ont été construits en utilisant la distance Euclidienne entre les rapports de transcription et la méthode d'appariement complet avec optimisation de l'ordre des gènes à l'aide du logiciel TM4 Multi experiment Viewer (MeV) (Saeed et al. 2003).

2/ Résultats obtenus

2-1/ Tolérance des souches à la perméthrine

Les bioessais (Figure 24) révèlent qu'après 10 générations de sélection, les larves des trois souches sélectionnées montrent une résistance constitutive accrue à la perméthrine comparativement à la souche non sélectionnée. Ces augmentations de résistance de 3, 1,8 et 2,4 fois chez Noexp-Perm, Fluo-Perm et Perm-Perm respectivement sont modérées mais significatives. La comparaison des CL_{50} et des intervalles de confiance ne révèlent pas de différence significative de résistance à la perméthrine entre les souches Noexp-Perm et Perm-Perm. En revanche, la souche Fluo-Perm apparaît légèrement moins résistante par rapport aux deux autres souches.

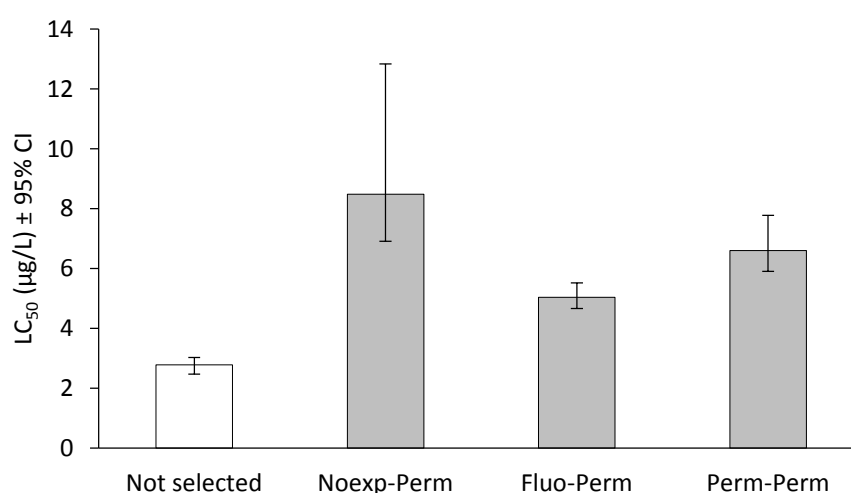


Figure 24 : Mesure de la tolérance constitutive à la perméthrine des différentes souches après 10 générations de sélection. Les bioessais ont été réalisés sur des larves de stade 4 de la génération 11 non exposées à aucun xénobiotique ou insecticide. Cinq doses de perméthrine allant de 1,5 à 6,5 µg/L ont été utilisées et la mortalité a été mesurée 24 heures après le début du bioessai. Les CL_{50} ont été calculées avec le logiciel XL-Stats (Addinsoft, Paris, France) et les données ont été représentées en microgrammes de perméthrine par litre ± les intervalles de confiance à 95%.

2-2/ Etude des variations de transcription des gènes

Après 10 générations de sélection, l'analyse par puce à ADN a permis de quantifier le niveau de transcription de plus 13500 gènes pour chaque souche analysée (Tableau 2). Chez Noexp-Perm, souche non exposée aux xénobiotiques avant sélection, seulement 80 transcrits (0,51%) sont différentiellement transcrits (rapports de transcription $> 1,5$ et $< -1,5$ avec une P-value $< 0,01$). Le nombre de gènes trouvés différentiellement transcrits dans les deux

souches résistantes exposées à des xénobiotiques avant sélection apparaît plus important avec 260 (1,71%) et 191 (1,21%) gènes chez les souches Fluo-Perm et Perm-Perm respectivement.

Tableau 2: Statistiques de l'étude transcriptomique par puce à ADN

Transcripts	Noexp-Perm	Fluo-Perm	Perm-Perm
Detected	13766 (100%)	13902 (100%)	13882 (100%)
Over-transcribed	44 (0.32%)	150 (1.07%)	100 (0.72%)
Annotated	27 (0.20%)	98 (0.70%)	68 (0.49%)
Hypothetical	17 (0.12%)	52 (0.37%)	32 (0.23%)
Under-transcribed	36 (0.26%)	110 (0.79%)	91 (0.65%)
Annotated	26 (0.19%)	65 (0.47%)	55 (0.40%)
Hypothetical	10 (0.07%)	45 (0.32%)	36 (0.25%)

Le nombre de transcrits détectés est indiqué pour chaque souche et correspond à 100%. Les nombres de gènes sur- ou sous-transcrits sont également indiqués pour chaque souche.

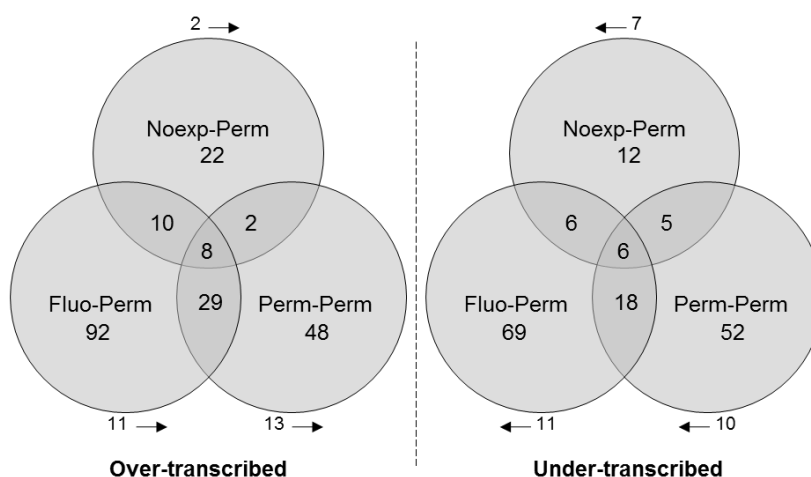


Figure 25: Diagramme de Venn montrant les gènes sur- et sous-transcrits chez les trois souches sélectionnées avec la perméthrine comparativement à la souche non sélectionnée. Le nombre total de gènes différentiellement transcrits chez Noexp-Perm est de 80, 260 pour Fluo-Perm et 191 pour Perm-Perm. Les chiffres couplés aux flèches correspondent aux gènes retrouvés sur-transcrits et sous-transcrits chez différentes souches.

De nombreux gènes apparaissent différentiellement transcrits chez plusieurs souches sélectionnées avec la perméthrine (Figure 25). Parmi eux, la majorité est trouvée chez les souches Fluo-Perm et Perm-Perm. Seulement 8 et 6 gènes apparaissent communément sur et sous-transcrits chez les trois souches résistantes. Certains gènes apparaissent sur-transcrits chez une souche et sous-transcrits chez une autre représentant 11,5%, 8,5% et 12% des gènes différentiellement transcrits chez Noexp-Perm, Fluo-Perm et Perm-Perm. La validation des données de puces à ADN sur 8 gènes par RT-qPCR (Figure 26) révèle une bonne corrélation

entre les rapports de transcription obtenus avec les deux techniques. Seul le gène CYP4J17 montre un profil de transcription différent selon les deux techniques.

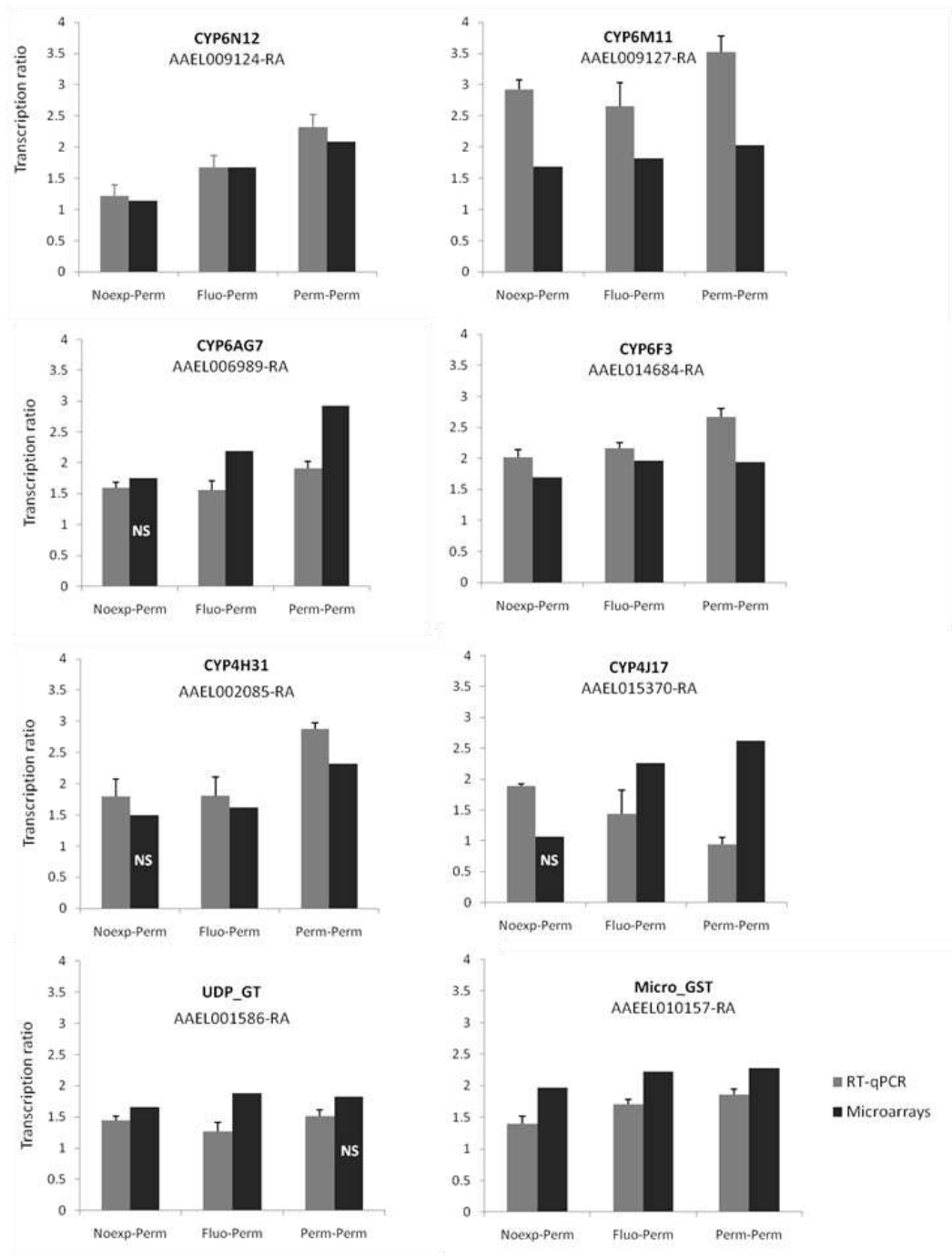


Figure 26: Validation des données de puces à ADN par RT-qPCR. Les mêmes échantillons d'ARN totaux ont été utilisés pour les deux techniques. Les rapports de transcription (souche sélectionnée/souche non sélectionnée \pm erreurs standards) de 7 CYPs, 1 GST microsomale et 1 UDP-GT sont mesurés par RT-qPCR chez les trois souches résistantes (barres grises) et comparés aux rapports de transcription obtenus par puce à ADN (barres noires). Deux gènes domestiques (RPL8 et RPS7) ont été utilisés pour la normalisation des données de RT-qPCR selon le protocole décrit dans les publications I et II). Pour les résultats de puces à ADN, les rapports de transcription non-significatifs (P -value $> 0,01$) sont indiqués par le sigle « NS ».

L'ensemble des gènes différentiellement transcrits chez les souches sélectionnées avec la perméthrine ont ensuite été classés en différentes catégories fonctionnelles. Au niveau global, la comparaison des proportions des différentes catégories fonctionnelles (Figure 27) ne montre pas de fortes différences entre les souches. Parmi les gènes sur-transcrits, ceux codant pour les enzymes de détoxification apparaissent fortement représentés chez toutes les souches sélectionnées (15 à 18%) comparativement à leur représentation dans le génome d'*Ae. aegyti* (1,5%). Parmi eux, les gènes codant pour des monooxygénases à cytochrome P450s (gènes CYPs) et dans une moindre mesure pour des glucosyl/glucuronosyl transférases (UDP-GTs) sont sur-représentés comparativement aux GSTs et CCEs. Six gènes codant pour des hexamérines potentiellement impliquées dans le transport apparaissent sur-transcrits chez la souche Noexp-Perm. A l'inverse, plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire et hormonal sont surreprésentés chez les souches exposées aux xénobiotiques. Parmi les gènes sous-transcrits, de nombreux transporteurs sont surreprésentés chez les souches Fluo-Perm et Perm-Perm.

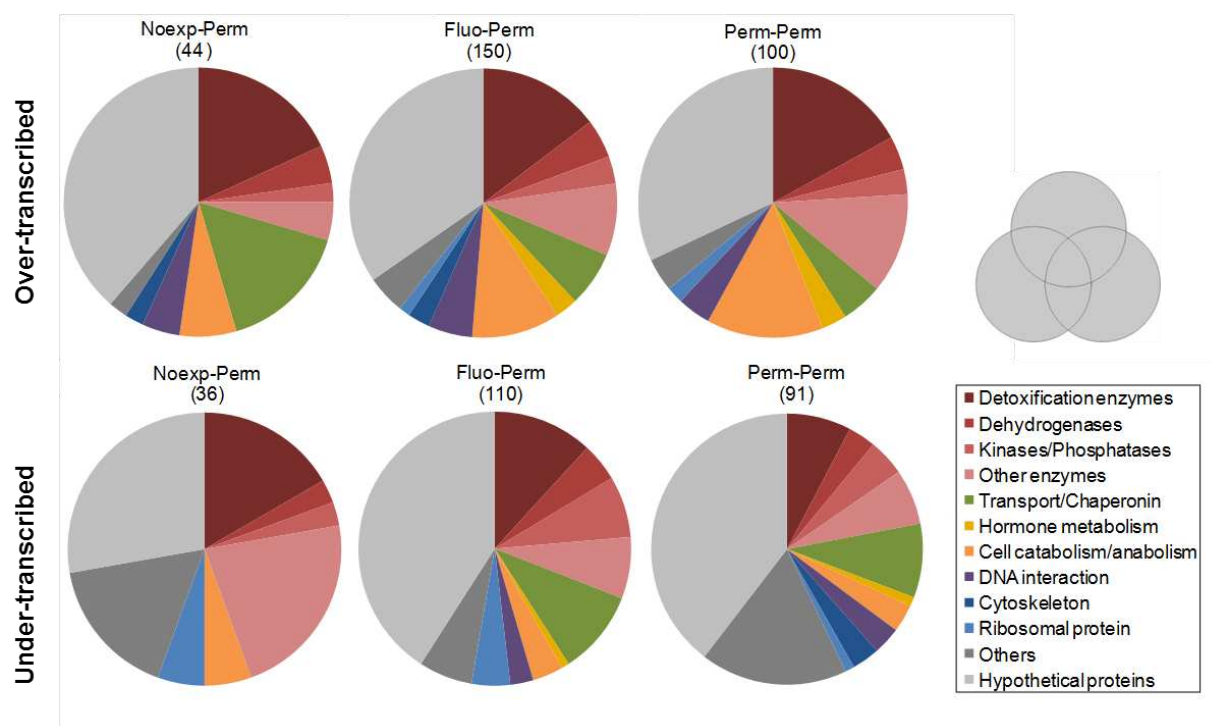


Figure 27: Catégories fonctionnelles représentées par l'ensemble des gènes significativement différentiellement transcrits chez chaque souche sélectionnée avec la perméthrine comparativement à la souche non-sélectionnée (le diagramme de Venn de la Figure 25 est symbolisé dans la légende).

Des différences plus claires entre les trois souches sélectionnées apparaissent en considérant les gènes différentiellement transcrits de manière spécifique dans chaque souche (Figure 28). Les six hexamérines sur-transcrites chez Noexp-Perm ne sont pas

différentiellement transcrites chez Fluo-Perm et Perm-Perm entraînant une surreprésentation des gènes impliqués dans le transport/chaperones chez Noexp-Perm. Chez Noexp-Perm, seul un gène de détoxification (GSTe5) est spécifiquement sur-transcrit tandis que 10 gènes (3 CYPs, 4 UDP-GTs, 1 GST et 1 estérase) et 5 gènes (1 CYP, 1 UDP-GT et 1 GST) sont spécifiquement sur-transcrits chez Fluo-Perm et Perm-Perm respectivement. Seulement 12 gènes apparaissent significativement sous-transcrits spécifiquement chez la souche Noexp-Perm, codant majoritairement pour des enzymes (6 gènes). A contrario, de nombreux gènes sont trouvés spécifiquement sous-transcrits chez les souches exposées aux xénobiotiques avant sélection à la perméthrine avec de fortes variations au niveau des catégories fonctionnelles représentées. Une proportion relativement importante de gènes sous-transcrits et codant pour des enzymes, incluant 5 CYPs, 3 deshydrogénases et 7 kinases/phosphatases est trouvée chez la souche Fluo-Perm. Enfin, on peut noter que le gène codant pour le récepteur Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) est spécifiquement sous-transcrit chez la souche Fluo-Perm.

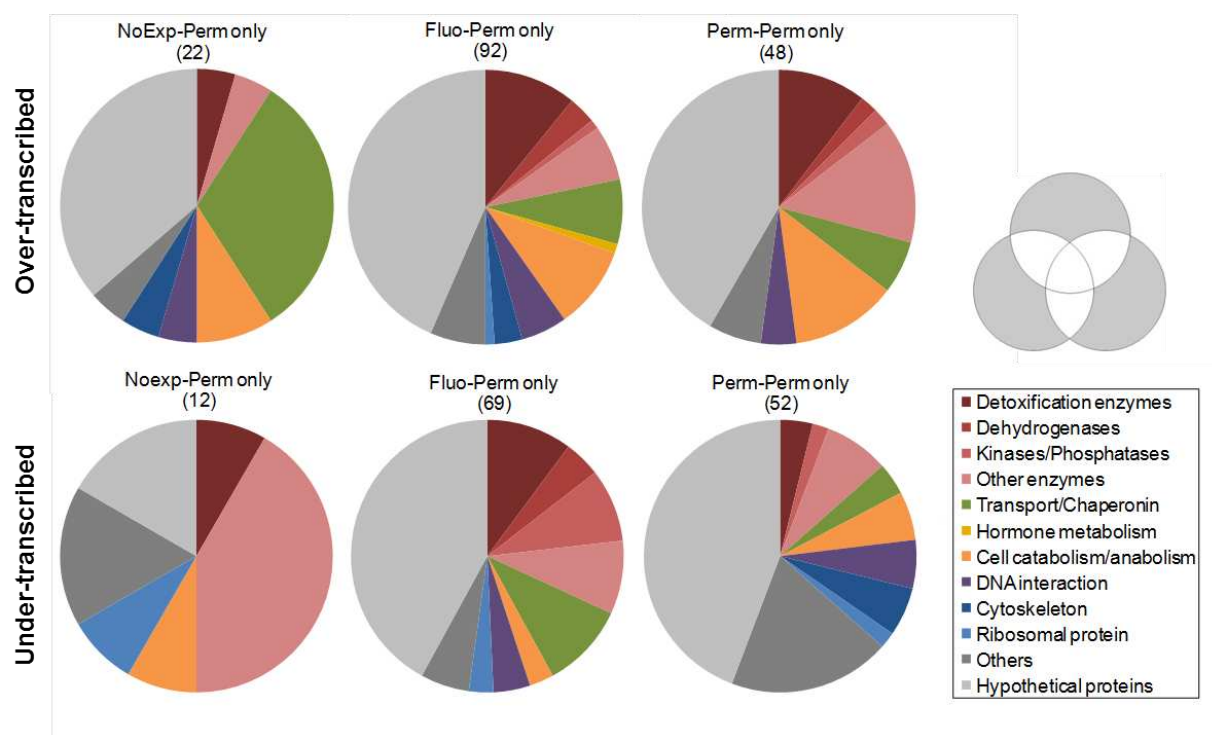


Figure 28: Catégories fonctionnelles représentées par les gènes différentiellement transcrites spécifiquement chez chaque souche sélectionnées avec la perméthrine (le diagramme de Venn de la Figure 25 est symbolisé dans la légende).

L'étude des gènes différentiellement transcrites au sein de plusieurs souches sélectionnées avec la perméthrine (Figure 29) souligne le nombre peu important de gènes

trouvés communément sous ou sur-transcrits chez Noexp-Perm et les deux autres souches exposées aux xénobiotiques (16 gènes en commun avec Fluo-Perm et 7 gènes avec Perm-Perm). A l'inverse, les deux souches Fluo-perm et Perm-Perm partage un nombre important de gènes appartenant à plusieurs catégories fonctionnelles dont les enzymes de détoxification (7 gènes), transport/chaperone (6 gènes) et métabolisme des hormones (4 gènes). Enfin, 14 gènes sont communément différentiellement transcrits chez les trois souches sélectionnées. Parmi eux, deux CYP6 et une GST microsomale sont sur-transcrits tandis que deux autres CYP6 sont trouvés sous-transcrits chez toutes les souches.

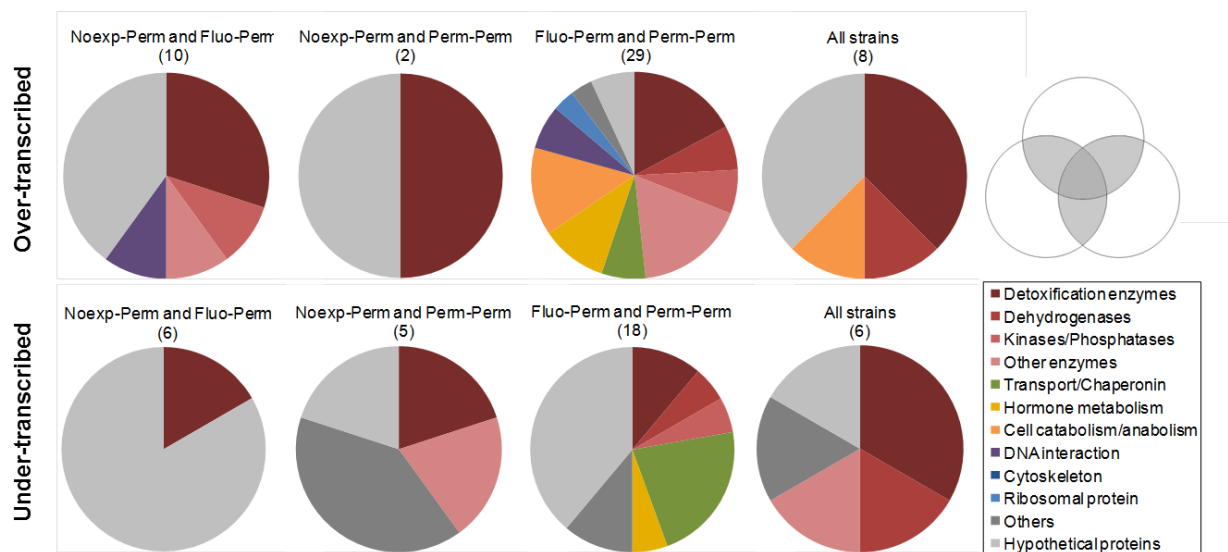


Figure 29: Catégories fonctionnelles représentées par les gènes différentiellement transcrits chez plusieurs souches sélectionnées avec la perméthrine (le diagramme de Venn de la Figure 25 est symbolisé dans la légende).

L'analyse par clustering des 29 CYPs et 18 autres gènes de détoxification différentiellement transcrits chez au moins une des souches sélectionnées (Figure 30) montre une proportion similaire entre le nombre de CYPs sur et sous-transcrits contrairement aux autres gènes de détoxification qui apparaissent majoritairement sur-transcrits. La plupart des CYPs sur-transcrits appartiennent aux familles CYP6 (9 gènes) et CYP4 (4 gènes). Parmi les 18 autres enzymes, les transférases sont clairement surreprésentées avec 7 UDP-GTs et 3 GSTs. Parmi les gènes significativement sur ou sous-transcrits, les patterns d'expression sont majoritairement conservés entre les trois souches résistantes à la perméthrine. A l'inverse, les profils de transcription de 6 gènes (2 CYPs, 1 GST, 1 UDP-GT, 1 alcool deshydrogénase et une sulfotransférase) sont inversés chez Fluo-Perm et Perm-Perm. Enfin, parmi les gènes sur-transcrits chez toutes les souches, on peut noter que plusieurs montrent des niveaux de transcription plus importants chez les souches Fluo-Perm et Perm-Perm comparativement à la souche Noexp-Perm.

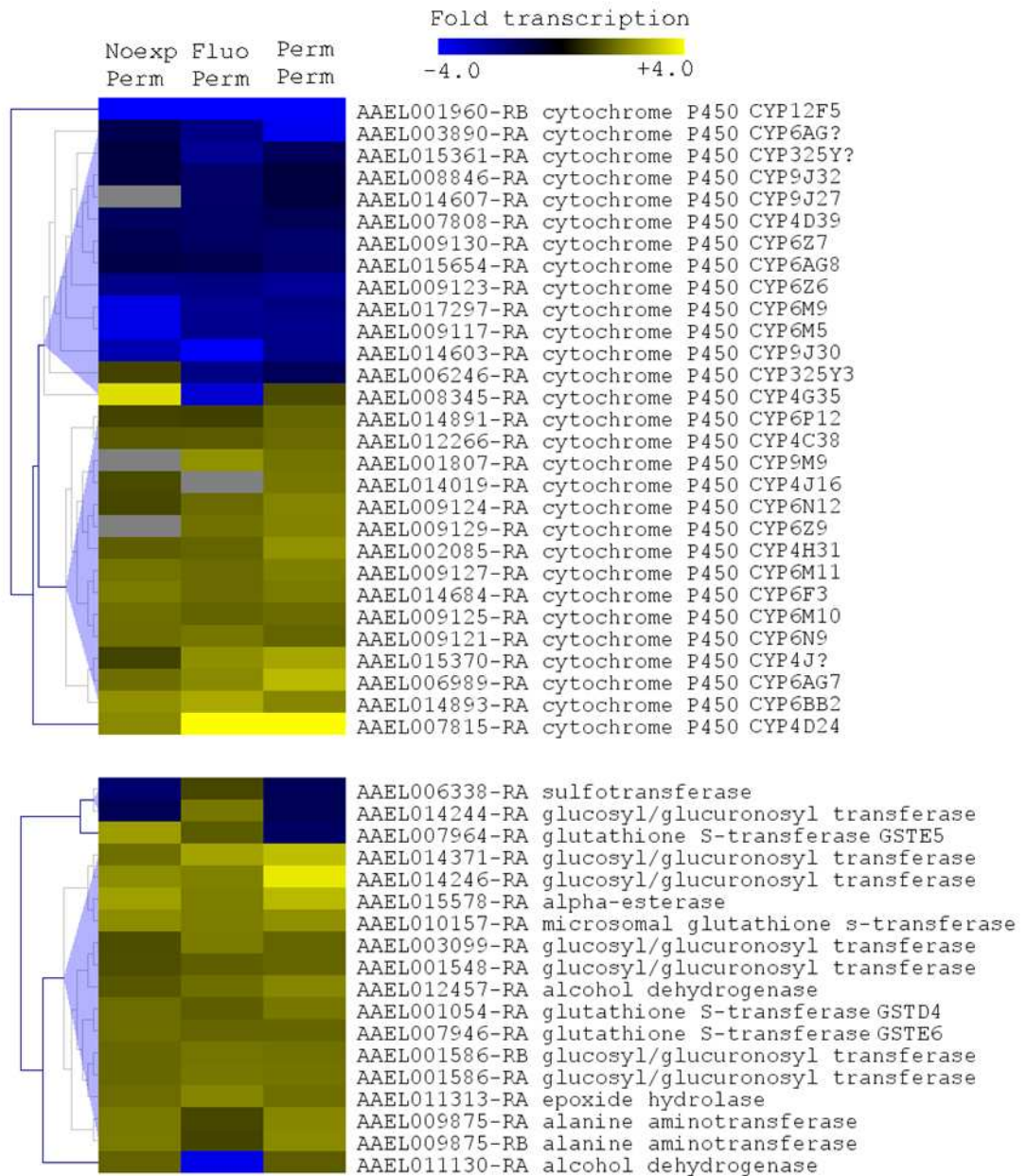


Figure 30: Analyse hiérarchique des gènes de détoxification significativement différentiellement transcrits chez au moins une souche sélectionnée avec la perméthrine. L'analyse hiérarchique été réalisée à partir des rapports de transcription (souche résistante / souche sensible) sur 29 CYPs et 18 autres gènes de détoxification séparément. L'échelle de couleur allant du bleu au jaune indique des rapports de transcription compris entre -4 et + 4 fois.

3/ Discussion

Le but de cette étude était de comprendre si l'exposition prolongée de larves de moustiques à certains xénobiotiques pouvait influencer l'apparition de la résistance après sélection par un insecticide et aussi si cette exposition pouvait favoriser la sélection de gènes

particuliers. Pour répondre à cette question, une approche de transcriptomique couplée à des bioessais a été menée sur trois souches de moustiques exposées ou non à deux xénobiotiques (perméthrine ou fluoranthène) avant d'être sélectionnées avec l'insecticide perméthrine.

3-1/ Résistance des souches à la perméthrine

La première partie de cette étude consistait à déterminer par des bioessais si les trois souches sélectionnées avaient développé une résistance à la perméthrine. Les niveaux de résistance obtenus chez les trois souches (entre 1,8 et 3 fois comparé à la souche non sélectionnée) sont relativement modérés comparativement aux niveaux décrits chez d'autres souches résistantes de plusieurs milliers de fois aux insecticides (Chandre et al. 1998). Dans la plupart de ces études, ces souches sont sélectionnées à partir de souches de terrain ayant subi des traitements insecticides intensifs pendant plusieurs années, possédant une diversité génétique plus importante et souvent une forte fréquence de mutations de la protéine cible de l'insecticide (Chandre et al. 1998, Hunt et al. 2005). Dans notre cas, nous avons débuté le processus de sélection à partir d'une souche de laboratoire ne présentant aucun mécanisme de résistance métabolique ni de mutation des protéines cibles des insecticides. De ce fait, les niveaux de résistance obtenus après seulement 10 générations de sélection sont déjà importants. Nous avons délibérément fait ce choix afin de focaliser notre approche sur les mécanismes de résistance métaboliques fortement susceptibles d'interagir avec les polluants environnementaux (pas de mutation Kdr) et de ne pas favoriser un mécanisme de résistance en particulier déjà sélectionné chez une souche collectée sur le terrain. Bien que les différences de niveaux de résistance à la perméthrine soient faibles entre les trois souches, le niveau de tolérance plus faible de la souche Fluo-Perm vis-à-vis de la perméthrine est assez logique. En effet, la souche Fluo-Perm a subi une pression de sélection légèrement moindre comparée aux souches Noexp-Perm et Perm-Perm car l'exposition des larves au fluoranthène engendre une légère augmentation de leur tolérance à la perméthrine (voir chapitre II). Pour confirmer ce résultat et déterminer si l'exposition chronique des larves de moustiques à certains polluants peut réellement modifier la vitesse d'apparition de la résistance aux insecticides, la sélection de ces trois souches devrait être poursuivie sur plus de générations de sélection. Cependant, nos résultats tendent à confirmer le fait que la plasticité phénotypique interagit avec les processus d'évolution adaptative liés à la sélection (Ghalambor et al. 2007).

3-2/ Etude des variations de transcription des gènes

L'analyse transcriptomique a révélé un nombre beaucoup plus important de gènes différentiellement transcrits chez les souches exposées aux xénobiotiques avant sélection (260 et 191 gènes chez les souches Fluo-Perm et Perm-Perm) comparativement à la souche Noexp-Perm (80 gènes). Ce résultat est d'autant plus intéressant si on le relie aux résultats des bioessais qui montrent un taux de résistance plus faible de Fluo-Perm par rapport aux deux autres souches. Parmi les gènes différentiellement transcrits, on rencontre un grand nombre de CYPs mais aussi de nombreux autres gènes. Ces gènes codent pour des enzymes impliquées dans la réponse au stress ou des transporteurs comme les transporteurs ABC impliqués dans l'excrétion des xénobiotiques (Wakabayashi et al. 2006, Labbé et al. 2011). Des gènes impliqués dans la réponse aux stress chimiques ont aussi été identifiés dans l'étude précédente (Publication IV) après exposition de larves de moustiques à différents polluants et insecticides.

Il est connu que les HAPs peuvent s'incorporer et perturber le fonctionnement des membranes biologiques. De plus, ils peuvent interagir avec de multiples voies de signalisation cellulaires par l'induction de nombreux gènes (Owen et al. 2008). Dans les études précédentes (Publications I, III et IV), nous avons montré que l'exposition de larves de moustiques au fluoranthène pouvait induire des gènes potentiellement impliqués dans l'augmentation de tolérance des larves à certains insecticides (gènes codant pour des protéines cuticulaires, ou d'autres impliquées dans le transport, le stress et les processus de détoxification). Ainsi, après pré-exposition au fluoranthène et sélection à la perméthrine, de nombreux gènes apparaissent sur-exprimés. Cependant, ces gènes ne semblent pas (après 10 générations) conférer à la souche Fluo-Perm un niveau de résistance accru à la perméthrine. Ainsi, il est possible que la plasticité phénotypique sollicitée par la pré-exposition au fluoranthène ait « protégé » le génôme du processus de sélection par la perméthrine (Ghalambor et al. 2007). Il serait intéressant de réaliser d'autres bioessais après un nombre plus important de générations de sélection pour vérifier cette hypothèse.

L'exposition des larves à de faibles doses de perméthrine augmente aussi leur tolérance à ce même insecticide et peut aussi induire la transcription de certains gènes. Néanmoins, nos études précédentes (publications I et IV) montrent qu'à la dose utilisée pour l'exposition (dose faible pour éviter toute toxicité), ce composé induit beaucoup moins de gènes ce qui pourrait expliquer le nombre moins important de gènes retrouvés différentiellement transcrits chez la souche Perm-Perm en comparaison avec la souche Fluo-

Perm. Cependant, en considérant les proportions représentées par les différentes catégories fonctionnelles, un patron similaire est observé entre les deux souches exposées aux xénobiotiques. En effet, ces deux souches présentent des similitudes au niveau des catégories fonctionnelles qui semblent spécifiquement sélectionnées, confirmant ainsi le fait que l'exposition des larves de moustiques à certains xénobiotiques peut favoriser la sélection de certains gènes sous la pression insecticide. De plus, même si la perméthrine et le fluoranthène présentent de nombreuses différences que ce soit au niveau de leurs caractéristiques chimiques, de leur distribution tissulaire mais aussi de leur « mode d'action », ces patrons communs suggèrent que les grandes catégories fonctionnelles retrouvées sureprésentées chez les deux souches pourraient être liées à une réponse globale au stress chimique (Publication IV). Ainsi, il n'est pas exclu que la sélection sur le long terme de ces gènes puisse avoir une influence directe ou indirecte sur la tolérance des moustiques aux insecticides chimiques.

La souche Noexp-perm, non pré-exposée aux xénobiotiques, présente à la fois le niveau de résistance le plus important à la perméthrine et le nombre de gènes différentiellement transcrits le moins important. Une des différences majeure entre cette souche et les deux autres souches Fluo-Perm et Perm-Perm se situe dans la surreprésentation d'une catégorie fonctionnelle impliquée dans le transport. Dans ce groupe, six hexamérines montrent des différences de transcription élevées comparativement à la souche non sélectionnée (certains gènes sont sur-transcrits jusqu'à 40 fois). Ces enzymes appartiennent à une grande famille enzymatique et leurs rôles ne sont aujourd'hui pas tous élucidés. Certaines hexamérines se lient avec une forte affinité à de petits métabolites tels que les riboflavines ou biliverdines (Burmester 1999). Une autre étude a démontré la liaison d'insecticides à l'arylphorine (qui est une hexamérine) chez le lépidoptère *Heliothis zea* suggérant l'affinité non spécifique de cette protéine pour de petits composés organiques et le rôle potentiel des hexamérines dans le métabolisme des xénobiotiques (Haunerland et Bowers 1986). De plus, ces protéines peuvent être impliquées dans la métamorphose de l'insecte (Tang et al. 2010). Récemment, une étude a montré que la synthèse d'arylphorine (et potentiellement d'autres hexamérines) est régulée par la 20-hydroxyecdysone (Manohar et al. 2010). Ces protéines peuvent également jouer un rôle dans la formation de la cuticule (Burmester 1999). Ainsi, l'augmentation de résistance observée chez la souche Noexp-Perm comparativement à la souche non sélectionnée pourrait donc être liée au couplage de plusieurs mécanismes distincts comme la détoxification, la séquestration de l'insecticide par les hexamérines ou bien à

réduction de la pénétration de l'insecticide par épaissement de la cuticule (Vontas et al. 2007, Djouaka et al. 2008).

3-3/ Diversité des gènes de détoxification détectés dans les souches résistantes.

Notre étude a révélé un très grand nombre de gènes différentiellement transcrits chez les souches sélectionnées avec la perméthrine. De ce fait, il est difficile de discerner les gènes directement ou indirectement impliqués dans la tolérance à l'insecticide des gènes répondant à la pré-exposition aux xénobiotiques mais n'ayant pas de rôle dans l'augmentation de tolérance à la perméthrine. Cependant, les 13 gènes trouvés différentiellement transcrits chez les trois souches sélectionnées avec la perméthrine pourraient être directement impliqués dans la résistance à cet insecticide. Parmi ces gènes, trois gènes de détoxification CYP6F3, CYP6M11 et une GST microsomale (AAEL010157-RA) sont sur-transcrits chez les trois souches résistantes. Les rapports de transcription de ces trois gènes semblent de plus corrélés avec les niveaux de résistance des trois souches soulignant leur rôle possible dans l'augmentation de résistance à la perméthrine. Nous avons montré que le gène CYP6M11 était induit après exposition des larves à plusieurs xénobiotiques dont le fluoranthène et la perméthrine (Publications I, III, IV). Ce gène est aussi sur-transcrit chez des souches de moustiques résistantes aux pyréthrinoïdes (Publications VI et VII). De plus, chez *An. gambiae*, CYP6M2 qui est relativement proche de CYP6M11 (66% de la séquence protéique est identique) est sur-transcrit plus de deux fois chez des populations résistantes aux pyréthrinoïdes (Djouaka et al., 2008). Plus récemment, CYP6M2 a été montré capable de métaboliser les pyréthrinoïdes (B. Stevenson, communication personnelle). Les autres CYPs sur-transcrits chez au moins une souche sont également susceptibles de jouer un rôle dans la résistance métabolique à la perméthrine. CYP6AG7 par exemple qui est sur-transcrit chez Fluo-Perm et Perm-Perm a été également détecté chez une souche d'*Ae. aegypti* résistante aux pyrethrinoïdes initialement collectée au Mexique (Strode et al. 2008) et est inductible par la perméthrine (<http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/gene/AAEL006989>). De même, le gène CYP6N12, trouvé sur-transcrit chez les souches Fluo-Perm et Perm-Perm en comparaison de la souche non sélectionnée est induit par plusieurs composés tels que le fluoranthène et la perméthrine (Publications I, II, IV). De manière globale, il semble intéressant de remarquer que les CYPs montrant de bonnes capacités d'induction par les xénobiotiques semblent avoir été préférentiellement sélectionnés par la perméthrine chez les souches exposées aux xénobiotiques. D'une manière générale, les CYPs trouvés sur-transcrits chez au moins une souche appartiennent majoritairement à la famille des CYP6, famille connue pour jouer un

rôle important dans le métabolisme des xénobiotiques (Feyereisen 2005). D'autres gènes codant pour des GSTs (3 GSTs cytosoliques et une GST microsomale) ont été trouvés sur-transcrits dans les souches résistantes. Jusqu'à aujourd'hui, le métabolisme des pyréthriinoïdes par les GSTs n'a pas été démontré mais plusieurs GSTs sont sur-transcrites chez des souches de moustiques résistants aux pyréthriinoïdes (Strode et al. 2008). Ces gènes pourraient être impliqués dans les réactions de phase II qui interviennent après l'action des CYPs. Enfin, le grand nombre de gènes codant pour des UDP-GT trouvés différentiellement transcrits chez les souches sélectionnées avec la perméthrine pourrait indiquer leur rôle dans la résistance métabolique à cet insecticide. Ces enzymes de phase II sont connues pour conjuguer l'acide glucuronique à de nombreux composés lipophiles (médicaments, xénobiotiques, etc...) et ainsi faciliter leur excrétion de l'organisme (Mackenzie et al. 1997, Radomska-Pandya et al. 1999). Ces enzymes ont pour l'instant surtout été étudiées chez les vertébrés (Radomska-Pandya et al. 1999, Mortensen et Arukwe 2007) et les plantes (Li et al. 2001) et mériteraient sans aucun doute plus d'intérêt chez les insectes. Comme pour les plantes, les UDP-GT d'insectes peuvent utiliser l'UDP-glucose plutôt que l'acide glucuronique-UDP comme donneur de sucres (Luque et O'Reilly 2002, Huang et al. 2008). Les activités UGT sur de nombreux substrats endogènes et exogènes ont été rapportées chez plusieurs espèces d'insectes (Luque et O'Reilly 2002). Les UDP-GT (ou UGT) d'insectes jouent un rôle important dans différents processus tels que la formation de la cuticule, la pigmentation et l'olfaction (Huang et al. 2008). A notre connaissance, une seule étude a démontré le rôle des UDP-GT dans la résistance aux organophosphorés chez *Heliothis virescens* (Bull et Whitten 1972). Considérant leurs capacités à conjuguer un grand nombre de substrats et à être induites par différents composés chimiques tels que le phénobarbital (Marie et Cresteil 1989, Plewka et al. 1997), d'autres études plus approfondies du rôle potentiel de ces enzymes dans la résistance aux insecticides devront être réalisées.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur la transcription différentielle des gènes pour expliquer l'impact à long terme de certains xénobiotiques anthropogéniques sur les processus de sélection de la résistance à un insecticide chimique. D'autres phénomènes tels que les mutations ou bien la sélection d'allèles particuliers déjà présents chez la souche initiale pourraient aussi conduire à une augmentation de la résistance des moustiques aux insecticides (Publication VI) (Puinean et al. 2010). Bien que seulement 10 générations de sélection aient été effectuées, ces phénomènes ont pu se produire chez les trois souches Noexp-Perm, Fluo-Perm et Perm-Perm. Pour étudier ces mécanismes d'adaptation, d'autres

approches sont nécessaires et seront détaillées dans le Chapitre V. Cependant, notre approche transcriptomique nous a permis de montrer que l'exposition chronique de populations de moustiques à certains xénobiotiques est susceptible d'affecter les mécanismes de sélection de la résistance aux insecticides.

II/ Etude de la résistance aux insecticides des populations d'*Aedes aegypti* en Martinique (Publications VI et VII)

A la Martinique, la résistance aux insecticides chez *Ae. aegypti* a été découverte dans les années 80 (Yébakima 1991) puis régulièrement suivie au laboratoire par des tests biologiques (Rosine 1999, Etienne 2006). Jusqu'en 2010, le principal larvicide utilisé était l'organophosphoré téméphos, aujourd'hui abandonné au profit du bactério-insecticide Bti. Enfin, le pyréthrianoïde deltaméthrine constitue la seule molécule utilisée aujourd'hui contre les adultes en milieu aérien. Aujourd'hui, les populations d'*Ae. aegypti* de la Martinique présentent de forts niveaux de résistance à la deltaméthrine et au téméphos mais les mécanismes associés à ces résistances sont restés jusqu'à aujourd'hui peu étudiés. Dans le but d'élaborer de nouvelles stratégies de lutte adaptées au contexte martiniquais, une connaissance plus approfondie de ces mécanismes ainsi que des facteurs à l'origine de leur sélection dans cette île apparaît importante. Parmi les différents facteurs étudiés, outre la pression insecticide due aux interventions de démoustication, l'environnement chimique a également été pris en compte.

1/ Etude des mécanismes de résistance d'une population d'*Aedes aegypti* de la Martinique (Publication VI).

Cette étude visait à étudier une population d'*Ae. aegypti* échantillonnée dans la commune de Vauclin, à l'Est de l'île et présentant un taux de résistance assez élevé vis-à-vis de différents insecticides chimiques. La caractérisation de cette population a été menée à

différents niveaux biologiques avec des techniques variées allant de la toxicologie (bioessais) à la transcriptomique et l'étude de certaines mutations en passant par la biochimie des enzymes de détoxification.

Les bioessais sur larves révèlent de très fort taux de résistance de la souche Vauclin (individus F1 élevés au laboratoire) vis-à-vis du téméphos par rapport à la souche sensible Bora-Bora (Ratio de résistance pour 95% de mortalité (RR₉₅) de l'ordre de 175). Les tests en applications topiques sur femelles montrent également une forte résistance à la deltaméthrine (RR₉₅ = 76). L'effet des inhibiteurs d'enzymes de détoxification PBO, DEF et DMC, respectivement inhibiteurs des CYPs, GSTs et CCEs, suggèrent qu'une part importante des niveaux de résistance observés peut être d'origine métabolique (CYPs et CCEs majoritairement pour le téméphos et CYPs et GSTs pour la deltaméthrine). Des tests biochimiques menés au LECA corroborent cette hypothèse en montrant des activités globales P450s (ECOD), GSTs (CDNB) et CCEs (naphtyl acétate) plus élevées chez les larves et adultes de la souche Vauclin que chez la souche sensible.

Au niveau moléculaire, le séquençage d'une partie du canal sodium met en évidence la présence de la mutation Kdr V1016I (Valine remplacée par une Isoleucine en position 1016) à la fréquence allélique de 71% confirmant la distribution très large de cette mutation aux Caraïbes et en Amérique du Sud (Saavedra-Rodriguez et al. 2007) et suggérant que les forts niveaux de résistance aux pyréthrinoïdes sont aussi liés à une mutation au niveau des canaux sodium voltage-dépendant. Les mutations de l'acétylcholinestérase Ache (G119S et F290V) n'ont pas été détectées chez Vauclin suggérant que la résistance observée au téméphos est probablement d'origine métabolique.

Afin d'identifier les gènes de détoxification potentiellement impliqués dans la résistance en Martinique, l'expression des gènes de détoxification de la souche Vauclin a été comparée à la souche Bora-Bora grâce à la puce « Aedes detox chip » développée à l'école de médecine tropicale de Liverpool (cf Chapitre II partie 1/). Cette étude a permis d'identifier 14 et 9 gènes de détoxification sur-transcrits chez les larves et adultes Vauclin comparativement à la souche sensible Bora-Bora. La majorité de ces gènes codent pour des CYPs (CYP6Z6, CYP6M6, CYP6M10, CYP6M11, CYP9J22, CYP9J23, CYP6CB2, CYP6BB2, CYP9M9, CYP6AA5, CYP4D23 et CYP4J15). Deux gènes codant pour une GST (GSTe7) et une CCE (CCEae3A) sont également sur-transcrits chez Vauclin. Précédemment, nous avons montré que la transcription des gènes CYP6M6 et CYP6M11 était induite par différents xénobiotiques

(Chapitre II, Publication I, II et IV) tandis que CYP6Z6 est le gène le plus proche de CYP6Z8, gène également inductible par plusieurs xénobiotiques. Cela conforte le rôle potentiel de ces gènes dans le métabolisme des insecticides.

Globalement, cette étude a permis de mettre en évidence une résistance multiple chez la souche Vauclin qui se traduit par une efficacité moindre des traitements insecticides sur le terrain. La Martinique est au cœur de graves problèmes environnementaux notamment liés à la forte contamination des sols et des eaux par un insecticide organochloré fortement utilisé mais interdit aujourd'hui : le Chlordécone (Bocquene et Franco 2005). Nos résultats soulèvent la question du possible impact des résidus de pesticides dans l'environnement sur l'apparition des mécanismes de résistance des populations de moustique, qui sera étudiée plus en détail dans le paragraphe suivant.

2/ Etude de la résistance aux insecticides de différentes populations d'*Aedes aegypti* en Martinique : Distribution, mécanismes et relation avec les facteurs environnementaux (Publication VII).

Cette étude s'inscrit dans la continuité de l'étude précédente en étudiant cette fois les mécanismes de résistances chez des individus F1 élevés au laboratoire et issus de plusieurs populations distinctes d'*Ae. aegypti* échantillonnées en Martinique. Toutes les données obtenues (niveaux de résistance, niveau de transcription des gènes étudiés, fréquence des mutations, historique des traitements) ainsi que d'autres données environnementales telles que les usages agricoles, le degré de pollution chimique aux organochlorés, etc., ont également été soumises à une analyse en composante principale (ACP).

Les études toxicologiques par bio-essais révèlent une faible résistance constitutive des 9 populations testées vis-à-vis du bioinsecticide Bti. Par contre, ces populations présentent des niveaux de résistance hétérogènes vis-à-vis des insecticides téméphos (RR₉₅ allant de 26 à 153 par rapport à la souche sensible Bora-Bora) et deltaméthrine (RR₉₅ allant de 5 à 12 par rapport à la souche Bora-Bora), ce qui semble relativement étonnant pour un milieu insulaire de cette taille.

Au niveau biochimique, des niveaux significativement élevés mais aussi hétérogènes d'activités globales P450s, GSTs et CCEs sont trouvés chez les neuf populations comparé à la souche Bora-Bora.

Toutes les souches présentent des taux importants de mutation *kdr* (fréquences de l'allèle résistant toutes supérieures à 0,87). Concernant la résistance aux organochlorés, les expérimentations n'ont pas mis en évidence de résistance liée à la mutation de l'Acétylcholinestérase (mutations G119S et F290V).

Les niveaux de transcription de 11 enzymes de détoxification (6 CYPs, 3 GSTs, 1 estérase) et deux cofacteurs des CYPs (la NADPH cytochrome P450 réductase et le cytochrome b5), choisis pour leur rôle potentiel dans la métabolisation des xénobiotiques et insecticides ont été mesurés par RT-qPCR au LECA sur larves et adultes. Les niveaux de transcription mesurés chez les populations de la Martinique présentent de fortes hétérogénéités en comparaison avec les souches sensibles Bora-Bora et SBE originaire du Bénin. Chez les larves, certains gènes comme CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6M11, CYP9M9 et GSTE2 sont retrouvés fréquemment sur-transcrits chez les populations de la Martinique. Le gène codant pour la carboxylestérase CCEae3a est aussi sur-transcrit dans toutes les populations martiniquaises. Chez les adultes, ce sont les gènes CYP6Z6, CYP6Z8, CYP9J22, CYP9M9, CPR, GSTE2 et GSTE7 qui sont fréquemment sur-transcrits chez les populations de la Martinique. Le gène CCEae3a est également sur-transcrit chez les adultes.

L'ACP montre une absence de corrélation entre l'utilisation d'insecticides en agriculture et les niveaux de résistance des souches de moustiques à la deltaméthrine tandis qu'il y a une corrélation avec les niveaux de résistance au téméphos. Des liens significatifs apparaissent entre l'urbanisation, les traitements à la deltaméthrine et la fréquence de la mutation *kdr* sans toutefois que ceux-ci soient significativement corrélés avec le phénotype de résistance (RR_{50}) à la deltaméthrine. En revanche, la surexpression de plusieurs gènes de détoxification est significativement corrélée à la résistance à la deltaméthrine (gènes CYP6Zs et GSTs) et au temephos (gènes CCEae3A, CYP6M et CYP9M11), confirmant le rôle possible de ces gènes dans la résistance métabolique à la Martinique.

Globalement, cette étude a montré une certaine hétérogénéité des niveaux de résistance aux insecticides chimiques des populations d'*Ae. aegypti* à la Martinique. La résistance aux pyréthrinoïdes semble liée à la présence de la mutation *kdr* mais aussi vraisemblablement à la sur-expression d'enzymes de détoxification. Concernant le téméphos, aucune mutation de l'acétylcholine estérase n'a été mise en évidence tandis que la sur-expression d'une estérase chez l'ensemble des populations étudiées semble confirmer la présence de mécanismes métaboliques liés à la résistance. Enfin, cette étude a tenté, par une

approche corrélative, d'appréhender l'impact potentiel des traitements de démoustication, de l'agriculture, des niveaux de pollutions aux pesticides et de l'urbanisation sur les mécanismes de résistances des moustiques aux insecticides.

Publication V

Do environmental pollutants affect the selection of genes involved in insecticide resistance in mosquitoes? Experimental evidences from transcriptomics

Rodolphe Poupardin¹, Muhammad Asam Riaz¹, Christopher Jones², Clare Strode², Alexia Chandor-Proust¹, Hilary Ranson², Stéphane Reynaud¹ and Jean-Philippe David^{1*}

¹ Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR 5553 CNRS - Université de Grenoble, France;

² Vector Research group, Liverpool School of Tropical Medicine, United Kingdom;

* Corresponding author.

Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR CNRS-Université de Grenoble 5553,
Domaine Universitaire de Saint-Martin d'Hères.

2233, rue de la piscine Bât D Biologie,

BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9,

France.

Tel: +33 (0) 4-76-51-44-59

Fax: +33 (0) 4-76-51-44-63

Email addresses:

RP: rodolphe.poupardin@e.ujf-grenoble.fr

MAR: muhammad-asam.riaz@e.ujf-grenoble.fr

CJ : c.m.Jones@liverpool.ac.uk

CS : c.strode@liverpool.ac.uk

ACP: alexia.proust@gmail.com

HR: hranson@liverpool.ac.uk

SR: stephane.reynaud@ujf-grenoble.fr

JPD*: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

Abstract

Background: The control of mosquitoes transmitting infectious diseases relies mainly on the use of chemical insecticides. However, the emergence of insecticide resistance threatens mosquito control programs. Until now, most research efforts have been focused on elucidating resistance mechanisms caused by insecticide selection pressure. Less attention has been paid to mosquito chemical environment of mosquitoes which could have an impact on the selection of insecticide resistance mechanisms. Here the mosquito *Aedes aegypti* was used as a model to perform a laboratory experiment combining mosquito larvae exposure to a sub-lethal dose of xenobiotic and their selection with the insecticide permethrin. After ten generations, bioassays and a transcriptome profiling with a 15K microarray were performed comparatively on all strains.

Results: The three permethrin-selected strains showed a significant increase of insecticide resistance comparatively to the susceptible parental strain. Microarray analysis allowed to detect over 13000 transcripts in each selected-strain and revealed that the transcription of many genes was affected by insecticide selection. Exposing larvae to a sub-lethal dose of the pollutant fluoranthene or the insecticide permethrin prior to selection at each generation affected the selection of several genes, including those involved in detoxification, transport and cell metabolism. Genes potentially involved in permethrin resistance and inherited cross-effects between xenobiotic exposure and insecticide selection were identified.

Conclusions: The present study investigated for the first time the inherited cross-effects between mosquitoes' chemical environment and insecticide selection in controlled conditions. Our experimental design allowed us to demonstrate that sub-lethal exposure of mosquitoes to xenobiotics affect the insecticide-driven selection of their transcriptome. Despite minor effect on insecticide resistance levels after few generations, our results suggest that insect chemical

environment can shape the long-term selection of metabolic mechanisms leading to insecticide resistance.

Background

Mosquitoes are vectors of several major human diseases such as malaria, dengue fever and filariasis [1, 2]. During the last decades, chemical insecticides have been massively used to limit their proliferation but their efficiency is now threatened by resistance mechanisms developed by insects. Target-site mutation and metabolic resistance are known as the two main physiological insecticide resistance mechanisms in mosquitoes [3]. Target-site resistance consists of non synonymous mutations occurring in the proteins targeted by insecticides. Metabolic resistance is caused by an increased metabolism of the insecticide molecule by the insect and is usually associated to detoxification enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases (P450s or CYPs for genes), carboxy/cholinesterases (CCEs) and glutathione S-transferases (GSTs) [3-6]. The rapid expansion and diversification of these enzyme families in insects is thought to be the consequence of their adaptation to a broad range of natural xenobiotics found in their environment [7-9]. Today, metabolic resistance of mosquitoes to chemical insecticides has been reported worldwide and several studies have described the over-production of detoxification enzymes in field or laboratory populations under insecticide selective pressure [10-13]. More recently, the ability of particular mosquito detoxification enzymes such as epsilon GSTs and few P450s belonging to the CYP6 family to metabolize chemical insecticides has been demonstrated [6, 14-17]

Hitherto, most molecular studies focused on characterizing insecticide resistance mechanisms in regard with the strong selection pressure caused by insecticides while less attention has been paid to the impact of anthropogenic xenobiotics found in environment on

the capacity of mosquitoes to resist insecticides. Considering the ability of detoxification enzymes to respond to xenobiotics exposure by induction/repression mechanisms [8, 18], interactions between the presence of xenobiotics in mosquito environment and their tolerance to chemical insecticides through detoxification or other metabolic mechanisms is likely.

Several studies showed that exposing insects to natural or anthropogenic xenobiotics could affect their tolerance to insecticides. Exposing larvae of the corn earworm *Helicoverpa zea* to the plant toxin xanthotoxin lead to an increased tolerance to the pyrethroid insecticide α -cypermethrin linked to an increased transcription of P450s [19, 20]. In *Drosophila*, [18] showed that the barbiturate phenobarbital and the herbicide atrazine induce the transcription of various detoxification enzymes, including those previously associated with metabolic resistance to chemical insecticides. In mosquitoes, exposing *Aedes albopictus* larvae to benzothiazole (a major leachate compound of automobile tires) and pentachlorophenol (a wood-protecting agent) increase their tolerance to different chemical insecticides such as carbaryl, rotenone and temephos. This increased tolerance was then correlated with an induction of P450 activities [21]. More recently, we demonstrated that *Aedes aegypti* larvae exposed to sub-lethal doses of different xenobiotics including herbicides, insecticides, heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons displayed an increased tolerance to multiple insecticides together with an induction of several genes encoding detoxification enzymes [22, 23]. A further study confirmed that CYP genes induced by anthropogenic xenobiotics are close to those known to metabolize insecticides in other mosquito species and are preferentially transcribed in tissues classically involved in xenobiotic metabolism [24]. Although the role of detoxification enzymes in cross-response mechanisms between environmental xenobiotics and insecticides is likely, other genes may also be involved in such interactions. By using a whole transcriptome approach based on the sequencing of millions cDNA tags, we recently showed that exposing *Ae. aegypti* larvae to sub-lethal doses of

various xenobiotics and insecticides affect the transcription of several other gene families coding for various enzymes, cuticular proteins and transporters [25].

These studies evidenced the short term impact of xenobiotics on mosquito tolerance to insecticides and started to investigate the molecular mechanisms involved. However, considering the persistent contamination of wetlands by anthropogenic chemicals and the potential effect of phenotypic plasticity on selection processes [26], the long term impact of pollutants on the selection of insecticide resistance mechanisms is still ambiguous. Recent studies using natural mosquito populations pointed out the possible role of pollutants and pesticides used in agriculture in the selection of insecticide resistance mechanisms. In 2008, [27] evidenced the impact of pesticides used on cotton crops on the level of pyrethroid resistance and metabolic resistance mechanisms of *An. arabiensis* in Cameroon. By evaluating insecticide resistance levels of several *Anopheles* populations across 3 african countries, [28] suggested that the high insecticide resistance levels observed in several populations could be explained by the use of pesticides in agriculture. Another study highlighted the potential impact of insecticides used in an improper manner in agriculture on the emergence of insecticide resistance in malaria vectors [29]. By investigating molecular resistance mechanism in *An. gambiae* populations collected from urban, agricultural and polluted breeding sites from Nigeria and Benin, [11] pointed out the potential role of environmental xenobiotics in the selection of insecticide resistance mechanisms. Despite these evidences, the complex interactions between the phenotypic plasticity induced by xenobiotic exposure and the selection of insecticide resistance mechanisms remain unclear.

In this context, the present study aims at investigating the impact of xenobiotic exposure on the insecticide-driven selection of insecticide resistance mechanisms in mosquitoes. In order to limit factors affecting selection processes and avoid field-sampling bias, we opted for a laboratory approach combining the selection of mosquitoes with an

insecticide and their exposure to xenobiotics. An *Ae. aegypti* strain susceptible to all insecticides was used as a parental strain to select three different strains with the pyrethroid insecticide permethrin at the larval stage. At each generation, larvae of one strain were not exposed to any xenobiotic (Noexp-Perm strain), while larvae of the two other strains were exposed for 3 days prior selection to a sub-lethal dose of permethrin (Perm-Perm strain) or to the polycyclic aromatic hydrocarbon pollutant fluoranthene (Fluo-Perm strain). After several generations of selection, comparative larval bioassays were performed with permethrin to compare the tolerance level of each strain to the insecticide. A comparative quantitative transcriptome analysis was then performed between larvae of the susceptible strain and each selected strain by using a DNA microarray representing over 14000 *Ae. aegypti* transcripts. Results are then discussed regarding the impact of mosquito chemical environment on the long-term selection of molecular mechanisms conferring insecticide resistance.

Results

After 10 generations of selection with the insecticide permethrin, bioassays revealed that larvae of the three selected strains showed a constitutive increased tolerance to permethrin (Figure 1). This increased tolerance was moderate but significant for each selected strain with 3.0-fold, 1.8-fold and 2.4-fold for the strains Noexp-Perm, Fluo-Perm and Perm-Perm respectively. Within selected strains, comparison of LC_{50} and their confidence intervals revealed no significant differences of tolerance between the two strains Noexp-Perm and Perm-Perm while the Fluo-Perm strain appeared slightly less tolerant to permethrin.

Microarray analysis allowed quantifying the transcription level of more than 13500 genes in each permethrin-selected strain comparatively with the parental susceptible strain (Table 1). In the Noexp-Perm strain not exposed to any xenobiotic prior to selection, only 80 transcripts (0.51%) were significantly differentially transcribed (>1.5 -fold in either direction and corrected P-value <0.01). More genes were differentially transcribed in the two strains exposed to a sub-lethal dose of xenobiotic before permethrin selection with 260 genes (1.71%) and 191 genes (1.21%) for Fluo-Perm and Perm-Perm strains respectively. For each strain, distribution of transcription ratios was well balanced between under- and over-transcription with most ratios being within a 10-fold variation in either direction (not shown). Several genes were significantly differentially transcribed in multiple strains (Figure 2). Among them, the majority were found in the two strains exposed to xenobiotics, while only few genes were shared with the Noexp-Perm strain. Only 8 and 6 genes were significantly over- and under-transcribed in all strains respectively. Finally, several genes were over-transcribed in one strain and under-transcribed in another strain or reciprocally, representing 8% to 12% of genes differentially transcribed in each strain. Validation of microarray data on 8 selected genes by qRT-PCR revealed a relatively good correlation between transcription

ratios obtained by the two techniques with only one gene showing significant discrepancies (Additional file 1: Suppl. Figure 1).

Comparison of the proportion of gene functions found differentially transcribed did not reveal strong differences between strains (Figure 3 and additional file 2: Suppl. Table 1). Among over-transcribed genes, those encoding detoxification enzymes appeared strongly over-represented in all permethrin selected strains (15 to 18 %) comparatively to their representation in *Ae. aegypti* genome (1.5 %) with over-transcription levels up to 3.5-fold, 8.5-fold and 4.7-fold in Noexp-Perm, Fluo-Perm and Perm-Perm strains respectively. Among them, cytochrome P450 monooxygenases (P450s or CYPs for genes) and in a lesser extent UDP-glucosyl/glucuronosyl transferases (UDPGTs) were well represented compared to glutathione S-transferases (GSTs) and carboxy/cholinesterases (CCEs). Genes potentially involved in transport were over-represented in the Noexp-Perm strain with six of them encoding hexamerins associated to high over-transcription levels (up to 43-fold). Conversely, genes involved in cell and hormone metabolism were over-represented in the two strains exposed to xenobiotics before permethrin selection. Among genes under-transcribed, several transporters of various types were over-represented in the strains exposed to xenobiotics comparatively to the Noexp-Perm strain.

When considering genes differentially transcribed in each strain specifically (Figure 4 and additional file 2: Suppl. Table 1), differences between strains become more apparent. The six hexamerins over-transcribed in the Noexp-Perm strain were not found differentially transcribed in the two other strains, leading to a higher proportion of transport/chaperonin genes. Among detoxification genes, only 1 gene (GSTE5) was found specifically over-transcribed in the Noexp-Perm strain, while 10 genes (3 CYPs, 4 UDPGTs, 1 GST and 1 esterase and 1 epoxyde hydrolase) and 5 genes (1 CYP, 2 UDPGT, 1 GST and 1 alanine aminotransferase) were over-transcribed specifically in the Fluo-Perm and Perm-Perm strains

respectively. Only 12 genes were specifically down-regulated in the Noexp-Perm strain, mainly represented by enzymes. Conversely numerous genes were specifically down-regulated in the two strains exposed to xenobiotics before permethrin selection, with marked differences between them. A larger proportion of enzymes was under-transcribed in the Fluo-Perm strain, including 5 CYPs, 3 dehydrogenases and 7 kinases/phosphatases.

Investigating genes differentially transcribed in multiple strains (Figure 5 and additional file 2: Suppl.Table 1) evidenced the low number of genes over- or under-transcribed in the Noexp strain and the two other strains exposed to xenobiotics (16 genes with Fluo-Perm and 7 genes with Perm-Perm). Conversely, the two strains Fluo-Perm and Perm-Perm shared several genes belonging to various categories including a good proportion of detoxification enzymes, transporters/chaperonins and several genes involved in cell or hormone metabolism. Finally, only 14 genes were significantly differentially transcribed in all strains. Among them, 2 CYP6s (CYP6M11 and CYP6F3) and the 1 microsomal GST AAEL010157 were over-transcribed while 2 other CYP6s (CYP6Z6 and CYP6M9) were under-transcribed.

Clustering analysis of the 29 P450s and 18 other detoxification enzymes differentially transcribed in at least one strain (Figure 6) revealed a similar proportion of P450s over- and under-transcribed in permethrin-selected strains while most other detoxification enzymes were over-transcribed. Most over-transcribed P450s belong to the CYP6 and CYP4 families, with over-transcription ratios up to 3.5-fold, 8.5-fold and 4.7-fold for Noexp-Perm, Fluo-Perm and Perm-Perm strains respectively. Among other detoxification enzymes, transferases were clearly over-represented (7 UDPGTs and 3 GSTs) with up to 3.7-fold over-transcription. The transcription patterns of most detoxification genes were conserved between the three permethrin-selected strains although more significant transcription ratios were observed in both strain exposed to xenobiotics. Among over-transcribed genes, several showed increased

transcription ratios in the two xenobiotic-exposed strains comparatively to the Noexp-Perm strain. Although not significant in all conditions, the transcription patterns of 6 genes (CYP325Y3, CYP4G35, GSTE5, the UDPGT AAEL014244, the suflotransferase AAEL006338 and the alcohol dehydrogenase AAEL011130) were inverted in strains exposed to xenobiotic compared to the Noexp-Perm strain.

Discussion

The aim of the present study was to investigate the impact of mosquito larvae exposure to xenobiotics on the selection of permethrin resistance and if such exposure could favor the selection of particular genes. To answer this question, a laboratory study combining larval exposures with a sub-lethal dose of the pollutant fluoranthene or the insecticide permethrin and selection with permethrin was conducted for several generations. Then, bioassays and microarray analyses were conducted to compare resistance levels and gene transcription variations between the different strains.

Impact of xenobiotic exposure on the level of inherited permethrin resistance

After 10 generations of selection, bioassays revealed an increased constitutive larval resistance of the three permethrin-selected strains comparatively to the parental strain, with significant resistance levels from 1.8-fold to 3.0-fold. Although resistance levels appear low regarding those reported in natural mosquito populations [12, 13], they are not negligible considering the few generations of selection and the fact that the parental strain is fully susceptible to insecticides and does not possess any resistance mechanisms. The choice to start from a fully susceptible strain was made in order to avoid putative resistance

mechanisms already present in field populations and to focus on metabolic changes likely to generate cross-responses between insecticides and environmental xenobiotics rather than target-site mutations. Moreover, no Kdr target-site mutation, involved in pyrethroid resistance [30, 31], was detected in our three resistant strains (DNA samples were extracted from pools of 50 larvae for each strain) following the protocol of [32] (Data not shown). These results suggest that metabolic pyrethroid resistance can arise relatively quickly in mosquito populations submitted to repeated insecticide treatments, possibly due to the selection of allele combinations initially present in the susceptible population.

The lower resistance level of the Fluo-perm strain exposed to the PAH fluoranthene prior to permethrin selection (1.8-fold comparatively to 3-fold for the Noexp-Perm strain) may lead to the conclusion that larval exposure to this pollutant delay the emergence of pyrethroid resistance. However, this lower resistant level is probably rather due to the slightly higher permethrin tolerance of larvae exposed to this pollutant due to phenotypic plasticity [22, 23], leading to a lower insecticide selection pressure on this strain. Because of experimental constraints, we made the choice not to adapt the dose of permethrin used for selection between the different strains to obtain identical mortality rates. Consequently, the impact of larval xenobiotic exposure on the level of inherited resistance to permethrin is still unclear. However, our transcriptomic results suggest that the selection of several genes is affected by xenobiotic exposure. Prolonging the selection process for further generations and adjusting permethrin doses to obtain an identical selection pressure in each strain will provide more answers to the impact of xenobiotics on the level of inherited resistance to insecticides. Performing additional bioassays with other insecticides from different chemical families will allow assessing if cross-resistance pattern is affected by xenobiotic exposure prior to insecticide selection.

Gene transcription variations selected by insecticide in different chemical environments

After 10 generations of selection with permethrin, a transcriptome profiling of each strain was performed at the larval stage comparatively to the parental susceptible strain by using a DNA microarray approach. This analysis revealed a higher number of genes differentially transcribed in the two strains exposed to xenobiotics Fluo-Perm and Perm-Perm comparatively to the Noexp-Perm strain. This striking difference was neither related to the number of transcripts detected in each strain nor to the ratio between over- and under-transcribed genes, suggesting the absence of technical bias. These results confirm that exposing larvae to a sub-lethal dose of xenobiotic prior to their selection with an insecticide for multiple generations affect the constitutive transcription level of several genes.

A high proportion of genes encoding detoxification enzymes were differentially transcribed in all selected strains comparatively to their proportion in *Ae. aegypti* genome. Several of them were specifically over-transcribed in the two strains exposed to a sub-lethal dose of fluoranthene (Fluo-Perm) or permethrin (Perm-Perm) prior to permethrin selection. Among them, our study clearly revealed an over-representation of P450s and UDP-glucosyl/glucuronosyl transferases (UDPGTs). Although P450s and GSTs have been frequently involved in the resistance of various insects to insecticides [3] [5] and see below), only one study has pointed out the possible role of UDPGTs in resistance of insects to insecticides [33]. Like in plants, insect UDPGTs use UDP-glucose rather than UDP-glucuronic acid as a sugar donor to conjugate various substrates [34]. UDPGT activities have been reported in a wide range of insect species [34] and their inducibility by numerous xenobiotics has been described [35, 36]. Although these enzymes can be involved in several biological processes in insects including cuticle formation, pigmentation and olfaction, their role in phase II insecticide detoxification requires further attention.

Several genes encoding P450s and GSTs were over-transcribed in permethrin-selected strains. Among them, several were previously shown over-transcribed in insecticide resistant mosquito populations or induced by xenobiotics. CYP6M11 was significantly over-transcribed in all permethrin-selected strains with transcription ratio between 1.7 to 2-fold. Induction of this gene in larvae by several chemicals such as the PAH fluoranthene, the insecticide permethrin and copper sulfate has been demonstrated [22, 24, 25, 34]. This gene was also found constitutively over-transcribed more than 2.5-fold in *Ae. aegypti* adults from Martinique island resistant to pyrethroids [12]. In *Anopheles gambiae*, CYP6M2 was found over transcribed in three pyrethroid-resistant populations from Nigeria [11]. Recently the capacity of this enzyme to metabolize pyrethroids has been demonstrated (Paine M. personal communication). Interestingly CYP6M10 was also found upregulated in permethrin-selected strains while CYP6M9 and CYP6M5 were both downregulated. CYP6F3 was also found significantly over-transcribed in all selected strains, suggesting a possible role in permethrin metabolism. In the mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*, increased transcription of CYP6F1 was previously associated with resistance to pyrethroids [37]. Several other CYPs from 4, 6 and 9 families were found over-transcribed in one or multiple permethrin-selected strain and may contribute to permethrin metabolism. Among them, some were previously found constitutively over-transcribed in pyrethroid-resistant *Aedes* populations and/or induced by xenobiotics [22, 23, 38]. Concerning GSTs, GSTE5, GSTE6 and GSTD4 and the microsomal GST AAEL010157 were all found over-transcribed in one or multiple permethrin-resistant strains. GSTs have been frequently involved in insecticide resistance in mosquitoes and are often inducible [39]. Although their role in the direct metabolism of pyrethroids remains unclear, these enzymes can participate in dehydrochlorination reactions or in the conjugation of reduced glutathione to various substrates [6]. It has also been suggested that GSTs could have a role in pyrethroid sequestration [40] or in the prevention of

oxidative damage induced by insecticides [41]. Esterases have also been involved in pyrethroid metabolism [3]. In our dataset, only one alpha-esterase (AAEL015578), not previously associated with insecticide resistance, was found significantly over-transcribed in the Fluo-Perm strain. Finally, other enzymes potentially involved in detoxification such as alanine aminotransferases, epoxide hydrolases, shortchain dehydrogenases and alcohol dehydrogenases were over-transcribed in permethrin-resistant strains and could contribute to the observed resistance level. As an increasing number of mosquito detoxification enzymes are being purified and their ability to metabolize insecticides assessed, the impact of the selection of particular detoxification enzymes as a consequence of xenobiotic exposure on insecticide resistance will be clarified.

Altered insecticide penetration or transport can also contribute to insecticide tolerance. Several hexamerins were over-transcribed in the Noexp-Perm strain with high transcription ratios. Although their role is not fully elucidated, hexamerins can bind small organic metabolites with high affinity [42]. One study evidenced the binding of insecticides to the arylphorin of *Heliothis zea*, suggesting its non-specific affinity for small organic compounds and the putative role of hexamerins in xenobiotic response [43]. Moreover, these proteins may also be involved in cuticle formation and metamorphosis [42, 44]. It has been suggested that mosquitoes may protect themselves from insecticides by cuticular protein thickening leading to a reduction of insecticide penetration [11, 25, 45]. However, only one gene encoding a cuticular protein was found differentially transcribed in our permethrin-resistant strains (1.58-fold upregulated in Fluo-Perm strain), suggesting that this mechanism does not contribute to the resistance phenotype.

Cross-effects between sub-lethal xenobiotic exposure and insecticide selection

Distinction between genes directly involved in permethrin resistance from those responding to xenobiotic pre-exposure without any implication in insecticide resistance is not trivial. However, our experimental design allowed us to clearly evidence the impact of the phenotypic plasticity induced by mosquito larvae exposure to a sub lethal dose of an organic pollutant or the insecticide on the selection pressure caused by the insecticide. Although our bioassays did not demonstrate a significant impact of xenobiotic exposure on constitutive resistance levels after few generations of selection, the transcriptome variations observed on protein families frequently involved in xenobiotic metabolism suggest that an effect at a longer time scale is probable. The functional validation of the role of genes identified in the present study in insecticide resistance and xenobiotic response will provide a better view of the impact of insect chemical environment on the selection of insecticide resistance mechanisms.

Interactions between phenotypic plasticity induced by environmental changes and adaptive evolutionary processes such as natural selection are complex phenomena constantly occurring in natural environments. Theoretically, phenotypic plasticity can shield genotypes from selective pressures but can also favor their modification depending on the ecological and demographic context [26]. In nematodes, it has been shown that by applying a realistic heat stress to both uncontaminated and polluted systems, the specimens from polluted environment showed a stronger response [46]. As mosquito larvae are frequently found in xenobiotic-rich water bodies, the modulation of their adaptive mechanisms to insecticides by natural or anthropogenic chemicals is likely. In addition to cross-resistance events probably occurring between pesticides used in agriculture and insecticides used for vector control [28, 29], the effect of complex mixtures of pesticide residues, anthropogenic pollutants and natural xenobiotics on insecticide resistance mechanisms requires further research.

Conclusions

The present study represents a first attempt to decipher the complex interactions between phenotypic plasticity induced by mosquitoes' chemical environment and their ability to develop inherited resistance mechanisms to insecticides. We focused on quantitative transcriptome variations as the selection of particular alleles leading to altered gene expression is known to confer a higher tolerance to insecticides. Other genomic changes such as gene duplication, non-synonymous allelic variations or mutations can also contribute to insecticide resistance in the strains described here [5, 47]. Therefore, applying other molecular approaches such as RNA sequencing or genome scan on the different strains described here will provide further insights regarding their different adaptive responses to permethrin selection. Combining results obtained from field studies and those performed in laboratory conditions where the selective pressures can be strictly controlled will provide further insights into the impact of insect chemical environment on insecticide resistance. A better understanding of the impact of environment in the selection of insecticide resistance mechanisms may contribute to better prevent resistance events and optimize insecticide-based vector control strategies.

Methods

Mosquito strains and experimental design

The mosquito *Ae. aegypti*, possible vector of dengue and yellow fever was used in the present study. This mosquito species is often found in urban, sub-urban and industrial breeding sites and larvae are often exposed to residues of insecticides and pollutants [48]. Mosquitoes were reared in standard insectary conditions (26°C, 14 h/10 h light/dark period, 80% relative humidity) in tap water (larvae) and net cages (adults). Larvae and adults were fed with hay pellets and papers impregnated with honey respectively. Blood feeding of adult females was performed on mice. The laboratory strain Bora-Bora, originating from French Polynesia, was used as a parental strain to select three different strains with the pyrethroid insecticide permethrin. This strain is susceptible to all insecticides and does not present any target-site or metabolic resistance mechanism.

Larvae of the first selected strain named 'Noexp-Perm' were bred in tap water and not exposed to any xenobiotic prior to selection with permethrin. Selection was performed by exposing 4th-stage larvae for 24h to a lethal dose of the pyrethroid insecticide permethrin (ChemService, West Chester, PA, USA). Dose of permethrin was adjusted at each generation (between 4 µg/L to 5.5 µg/L) to reach 60-80% larval mortality. Surviving larvae were transferred in tap water, fed with standard larval food and allowed to emerge. Adults were allowed to reproduce for 4-days and fed on mice to obtain eggs for the next generation. In order to limit bottleneck effects, each generation was started with more than 6000 individuals. The two other strains were bred as above but exposed for 72h to a sub-lethal dose of permethrin or of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) prior to selection with permethrin. Fluoranthene is a common PAH

pollutant found in urban or industrial areas [49]. This compound is known to induce detoxification enzymes and *Ae. aegypti* larvae exposed to this chemical showed an increased tolerance to permethrin [22, 24]. In order to avoid the selection of particular genotypes prior to selection, sub-lethal doses of permethrin (0.4 µg/L) and fluoranthene (100 µg/L), leading to less than 5% mortality after exposure were used. The two strains exposed to permethrin or fluoranthene before permethrin selection were named 'Perm-Perm' and 'Fluo-Perm' respectively. Selection process was carried out for 10 generations on all strains simultaneously. Bioassays and molecular analysis were performed on calibrated 4th-stage larvae of the 11th generation (G₁₁ larvae) not exposed to any xenobiotic or insecticide.

Bioassays with permethrin

To assess the constitutive resistance level of the different strains to permethrin, larval bioassays were conducted with permethrin to determine the lethal concentration resulting in 50% mortality after 24h exposure (LC₅₀). Bioassays were conducted simultaneously on all strains with G₁₁ larvae bred in standardized laboratory conditions. Five doses of permethrin and four replicates of 30 larvae per dose were used. Doses of permethrin (from 1.5 µg/L to 6.5 µg/L) were chosen in order to cover larval mortality range (0 to 100%). LC₅₀ and 95% confident intervals (CI₉₅) were then calculated with a probit approach for each strain using XL-Stat (Addinsoft, Paris, France) and compared between the parental susceptible strain and permethrin-selected strains.

Total RNA extractions and sample preparation

Total RNAs were extracted simultaneously from G₁₁ larvae of three different egg batches for each strain (three biological replicates per strain). Each biological replicate consisted in 200 larvae reared in 200 mL tap water with 50 mg larval food in standardized

insectary conditions (see above). For each biological replicate, total RNAs were extracted from 60 4th-stage larvae using the RNAqueous-4PCR Kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) and RNA pellets were resuspended in 100 μ L RNase-free water. Total RNA amounts were quantified with the NanoDrop ND1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, 200 ng total RNA per biological replicate were amplified and labeled with Cy-5 and Cy-3 dyes with the 'Two colors low input Quick Amp labeling kit' (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Labeled cRNA were purified with the Stratagene 'Absolutely RNA Nanoprep kit' (Agilent technologies) and resuspended into 25 μ L elution buffer. Quantification and quality assessment of labeled cRNA were performed with the Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, DE, USA) and the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent technologies).

Hybridizations, data acquisition and statistical analysis

Microarray hybridizations were performed with the '15K Agilent Aedes chip' recently designed by the Liverpool School of Tropical Medicine (arrayexpress acc number xxxxxxx), containing eight replicated arrays of oligo-probes representing 14204 different *Ae. aegypti* transcripts and several control probes. A pool of cRNAs from the three replicates of the parental susceptible strain was used as a common reference for all hybridizations against selected strains. For each biological replicate, two hybridizations were performed in which the Cy3 and Cy5 labels were swapped between samples for a total of six hybridizations per strain comparison (N=6). For each hybridization, 300 ng of labeled cRNA from one selected strain and the reference labeled with a different Cy-dye were resuspended in hybridization buffer, mixed and hybridized for 17h onto the array according to manufacturer's instructions. After hybridization, non-specific probes were washed off with the 'Agilent hybridization kit' according to manufacturer's instructions (Agilent technologies). Slides were scanned

immediately after washes with the Agilent microarray scanner G2205B (Agilent technologies). Spot finding, signal quantification and spot superimposition for both dye channels were performed using the Agilent feature extraction software (Agilent technologies). Data were then loaded into Genespring GX (Agilent technologies) for normalization and statistical analyses. For each strain comparison, only transcripts flagged 'present or marginal' in all 6 hybridizations were used for further statistical analysis. Mean transcription ratios were then submitted to a one sample Student's t-test against the baseline value of 1 (equal gene expression in both strains) with Benjamini and Hochberg's multiple testing correction procedure. For each selected strain, transcripts showing a fold change >1.5-fold in either direction and a t-test P-value lower than $P < 0.01$ after multiple testing correction were considered significantly differentially transcribed compared to the parental susceptible strain.

Functional analysis of genes differentially transcribed after permethrin selection

A comparative analysis of gene functions differentially transcribed after 10 generations of permethrin selection was performed on the 424 genes showing a significant differential transcription in at least one strain. Because the Gene Ontology (GO) annotation of *Ae. aegypti* genome is still incomplete (less than 9500 genes annotated with GO terms over 15988 predicted genes), we manually annotated the 'biological function' of all genes showing a significant differential transcription in at least one strain. Genes were classified in 12 different categories: detoxification enzymes, dehydrogenases, kinases/phosphatases, other enzymes, transport/chaperonin, hormone metabolism, cell catabolism/anabolism, DNA interaction, cytoskeleton, ribosomal proteins, others and hypothetical proteins. For each strain, percentages of genes significantly over- and under-transcribed for each category were

compared. Percentages of genes represented in each functional category were compared i) for gene significantly differentially transcribed in each strain, ii) for genes only significantly differentially transcribed in each strain and iii) for genes differentially transcribed in multiple strains (see results). In order to compare the transcription patterns of detoxification enzymes between the three selected strains, clustering analyses of genes encoding P450s and other enzymes potentially involved in detoxification processes was performed. Only genes found significantly differentially transcribed in at least one permethrin-selected strain were considered. Hierarchical clustering was performed by loading fold- transcription values into TM4 Multi experiment Viewer (MeV) software [50]. Gene trees were calculated using Pearson's uncentered distance metric and complete linkage method with optimization of genes order [51].

Microarray validation by RT-qPCR

Transcription levels of 8 detoxification genes (six P450s, one microsomal GST and one UDP-GT) found over-transcribed in at least two selected strains were validated by reverse transcription followed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Two micrograms of total RNAs per biological replicate were treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and used for cDNA synthesis with superscript III and Oligo-dT₂₀ primer (Invitrogen) for 60 minutes according to manufacturer's instructions and resulting cDNAs were diluted 50 times. Real time quantitative PCR reactions of 25 µL were performed on an iQ5 system (Biorad, Hercules, CA, USA) using iQ SYBR Green supermix (Biorad), 0.3 mM of each primer and 5 µL of diluted cDNAs according to manufacturer's instructions. For each analyzed gene, a cDNA dilution scale from 5 to 50000 times was performed in order to assess efficiency of the PCR. A melt curve analysis was also performed to check for the unique presence of the targeted PCR product and the low abundance of primer dimers. Quantification of gene

transcription level was performed according to the $\Delta\Delta C_t$ method taking into account PCR efficiency [52] and using two housekeeping genes for normalization: the ribosomal proteins L8 and S7 (RPL8, Genbank accession no. DQ440262 and RPS7, Genbank accession no. EAT38624.1). Results were expressed as mean transcription ratio (\pm SE) between selected strains and the parental susceptible strain.

Data deposition

Detailed transcription data for all genes detected by microarray in the present study are presented in the additional file 3: Suppl.Table 2. All microarray data associated to the present study have been deposited at Vectorbase and are freely accessible at [xx](http://www.vectorbase.org). The 15K microarray used in the present study has been deposited at arrayexpress under accession number [xxxxxxxxxxxxxxxx](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) . All gene accession numbers mentioned in the present manuscript are compatible with Ensembl, NCBI-GenBank and Vectorbase (<http://aaegypti.vectorbase.org>) genome databases.

Authors' contributions

RP selected the mosquito strains, performed bioassays, conducted the microarray study and helped to draft the manuscript. MAR participated in microarray experiments and analysis. CJ helped for microarray hybridizations. CS designed the 15K Aedes microarray. ACP helped to draft the manuscript. HR helped to write the manuscript. SR contributed to study design, participated in sample preparation, microarray data analysis and participated in manuscript writing. JPD conceived and coordinated the study, participated in sample preparation and microarray data analysis and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The present research project was funded by the French National Research Agency (ANR project 07SEST014 MOSQUITO-ENV). We are grateful to S. Veyrenc for technical help. We thank Dr. B. MacCallum from Vectorbase for help with microarray data deposition and arrayexpress submission. We are grateful to Dr. [xxxxxxx](#), Dr. [xxxxxxxxxx](#) for useful comments on the manuscript.

References

1. Clements AN: **Biology Of Mosquitoes : Development, Nutrition And Reproduction** London: Chapman & Hall; 1992.
2. Lounibos LP: **Invasions by insect vectors of human disease**. *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:233-266.
3. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H: **The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes**. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2004, **34**(7):653-665.
4. Scott JG: **Cytochromes P450 and insecticide resistance**. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1999, **29**(9):757-777.
5. Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR: **Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics**. *Annu Rev Entomol* 2007, **52**:231-253.
6. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J: **Insect glutathione transferases and insecticide resistance**. *Insect Mol Biol* 2005, **14**(1):3-8.
7. Despres L, David JP, Gallet C: **The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals**. *Trends Ecol Evol* 2007, **22**(6):298-307.
8. Feyereisen R: **Insect Cytochrome P450 in: Comprehensive Molecular Insect Science**, vol. vol. 4, ed. L. I. Gilbert, K. Iatrou & S.S. Gill edn: Elsevier; 2005.
9. Francis F, Vanhaelen N, Haubruge E: **Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the Myzus persicae aphid**. *Arch Insect Biochem Physiol* 2005, **58**(3):166-174.
10. Hunt RH, Brooke BD, Pillay C, Koekemoer LL, Coetzee M: **Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector Anopheles funestus**. *Med Vet Entomol* 2005, **19**(3):271-275.
11. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of Anopheles gambiae s.s. from Southern Benin and Nigeria**. *BMC Genomics* 2008, **9**:10.
12. Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yebakima A, Ranson H, Corbel V et al: **Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti: a case study in Martinique Island (French West Indies)**. *BMC Genomics* 2009, **10**:494.
13. Chandre F, Darriet F, Darder M, Cuany A, Doannio JMC, Pasteur N, Guillet P: **Pyrethroid resistance in Culex quinquefasciatus from West Africa**. *Med Vet Entomol* 1998, **12**(4):359-366.
14. Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J: **Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector Anopheles gambiae**. *Biochem J* 2003, **373**:957-963.
15. Jousen N, Heckel DG, Haas M, Schuphan I, Schmidt B: **Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 GYP6G1 expressed in cell cultures of Nicotiana**

- tabacum suggests detoxification of these insecticides in Cyp6g1-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance.** *Pest Manag Sci* 2008, **64**(1):65-73.
16. Chiu TL, Wen ZM, Rupasinghe SG, Schuler MA: **Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(26):8855-8860.
 17. Muller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J et al: **Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids.** *PLoS Genet* 2008, **4**(11):10.
 18. Le Goff G, Hilliou F, Siegfried BD, Boundy S, Wajnberg E, Sofer L, Audant P, Ffrench-Constant RH, Feyereisen R: **Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2006, **36**(8):674-682.
 19. Li XC, Berenbaum MR, Schuler MA: **Plant allelochemicals differentially regulate *Helicoverpa zea* cytochrome P450 genes.** *Insect Mol Biol* 2002, **11**(4):343-351.
 20. Li XC, Zangerl AR, Schuler MA, Berenbaum MR: **Cross-resistance to alpha-cypermethrin after xanthotoxin ingestion in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera : Noctuidae).** *J Econ Entomol* 2000, **93**(1):18-25.
 21. Suwanchaichinda C, Brattsten LB: **Effects of exposure to pesticides on carbaryl toxicity and cytochrome P450 activities in *Aedes albopictus* larvae (Diptera : Culicidae).** *Pest Biochem Physiol* 2001, **70**(2):63-73.
 22. Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP: **Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**(5):540-551.
 23. Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, David JP: **Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics.** *Aquat Toxicol* 2009, **93**(1):61-69.
 24. Poupardin R, Riaz MA, Vontas J, David JP, Reynaud S: **Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*.** *Insect Mol Biol* 2010, **19**(2):185-193.
 25. David JP, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor-Proust A, Reynaud S: **Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology.** *BMC Genomics* 2010, **11**:216.
 26. Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN: **Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments.** *Funct Ecol* 2007, **21**(3):394-407.
 27. Muller P, Chouaibou M, Pignatelli P, Etang J, Walker ED, Donnelly MJ, Simard F, Ranson H: **Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon.** *Mol Ecol* 2008, **17**(4):1145-1155.

28. Ranson H, Abdallah H, Badolo A, Guelbeogo W, Keraf-Hinzoumbe C, Yangalbe-Kalnane E, Sagnon NF, Simard F, Coetzee M: **Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem.** *Malaria Journal* 2009, **8**(1):299.
29. Yadouleton AWM, Asidi A, Djouaka RF, Braima J, Agossou CD, Akogbeto MC: **Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin.** *Malaria Journal* 2009, **8**:8.
30. Zlotkin E: **The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides.** *Annu Rev Entomol* 1999, **44**:429-455.
31. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: **Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* S.S.** *Insect Mol Biol* 1998, **7**(2):179-184.
32. Saavedra-Rodriguez K, Urduaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ et al: **A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*.** *Insect Mol Biol* 2007, **16**(6):785-798.
33. Bull DL, Whitten CJ: **Factors influencing organophosphorus insecticide resistance in tobacco budworms.** *J Agric Food Chem* 1972, **20**(3):561-&.
34. Huang FF, Chai CL, Zhang Z, Liu ZH, Dai FY, Lu C, Xiang ZH: **The UDP-glucosyltransferase multigene family in *Bombyx mori*.** *Bmc Genomics* 2008, **9**.
35. Marie S, Cresteil T: **Phenobarbital-inducible gene-expression in developing rat-liver - relationship to hepatocyte function.** *Biochimica Et Biophysica Acta* 1989, **1009**(3):221-228.
36. Plewka A, Kaminski M, Plewka D: **The influence of age and some inducers on UDP-glucuronyltransferase activity.** *Exp Gerontol* 1997, **32**(3):305-313.
37. Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T, Yamakawa M: **Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2000, **30**(2):163-171.
38. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne S, Hemingway J, Black WC et al: **Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2008, **38**(1):113-123.
39. Ranson H, Hemingway J: **Mosquito glutathione transferases.** In: *Gluthione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*. vol. 401. San Diego: Elsevier Academic Press Inc; 2005: 226-+.
40. Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E: **Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2001, **31**(4-5):313-319.
41. Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J: **Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.** *Biochem J* 2002, **362**:329-337.

42. Burmester T: **Evolution and function of the insect hexamerins**. Eur J Entomol 1999, **96**(3):213-225.
43. Haunerland NH, Bowers WS: **Binding of insecticides to lipophorin and arylphorin, 2 hemolymph-proteins of *Heliothis zea***. Arch Insect Biochem Physiol 1986, **3**(1):87-96.
44. Tang B, Wang SG, Zhang F: **Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: Cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival**. BMC Mol Biol 2010, **11**.
45. Vontas J, David JP, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson H: **Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization**. Insect Mol Biol 2007, **16**(3):315-324.
46. van der Wurff AWG, Kools SAE, Boivin MEY, van den Brink PJ, van Megen HHM, Riksen JAG, Doroszuk A, Kammenga JE: **Type of disturbance and ecological history determine structural stability**. Ecol Appl 2007, **17**(1):190-202.
47. Wondji CS, Irving H, Morgan J, Lobo NF, Collins FH, Hunt RH, Coetzee M, Hemingway J, Ranson H: **Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector**. Genome Res 2009, **19**(3):452-459.
48. Dutta P, Khan SA, Khan AM, Sharma CK, Doloi PK, Mahanta J: **Solid waste pollution and breeding potential of dengue vectors in an urban and industrial environment of Assam**. J Environ Biol 1999, **20**(4):343-345.
49. Srogi K: **Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review**. Environ Chem Lett 2007, **5**(4):169-195.
50. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M et al: **TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis**. Biotechniques 2003, **34**(2):374-378.
51. D'Haeseleer P: **How does gene expression clustering work?** Nat Biotechnol 2005, **23**(12):1499-1501.
52. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**. Nucleic Acids Res 2001, **29**(9):e45.

Table 1 - Transcription level variations in permethrin-selected strains

Transcripts	Noexp-Perm	Fluo-Perm	Perm-Perm
Detected*	13766 (100%)	13902 (100%)	13882 (100%)
Over-transcribed [†]	44 (0.32%)	150 (1.07%)	100 (0.72%)
Annotated	27 (0.20%)	98 (0.70%)	68 (0.49%)
Hypothetical	17 (0.12%)	52 (0.37%)	32 (0.23%)
Under-transcribed [†]	36 (0.26%)	110 (0.79%)	91 (0.65%)
Annotated	26 (0.19%)	65 (0.47%)	55 (0.40%)
Hypothetical	10 (0.07%)	45 (0.32%)	36 (0.25%)
Ratio (over- / under-transcribed)	1.23	1.35	1.11

* Numbers of transcripts detected by the microarray analysis. [†] Numbers of transcripts found significantly differentially transcribed (> 1.5-fold in either direction and corrected P value < 0.01). Ratio of over- versus under-transcribed transcripts was calculated from percentages.

Figures legends

Figure 1 - Larval tolerance of permethrin-selected strains to permethrin

Not selected: parental susceptible strain, Noexp-Perm: strain not exposed to any xenobiotic and selected with permethrin, Fluo-Perm: strain exposed to fluoranthene and selected with permethrin, Perm-Perm: strain exposed to a sub-lethal dose of permethrin and selected with permethrin. Larval tolerance to permethrin is shown as mean $LC_{50} \pm 95\%$ confidence interval.

Figure 2 - Overview of genes differentially transcribed in permethrin-selected strains

Distribution of genes significantly over- (left) or under-transcribed (right) is represented as two Venn diagrams. Genes showing a transcription ratio > 1.5 -fold in either direction comparatively to the susceptible strain and a corrected P value < 0.01 were considered significantly differentially transcribed. Numbers of transcripts are indicated for each area of the Venn diagram. Numbers associated with arrows indicate genes over-transcribed in one strain and under-transcribed in another strain or reciprocally. Noexp-Perm: strain not exposed to any xenobiotic and selected with permethrin, Fluo-Perm: strain exposed to fluoranthene and selected with permethrin, Perm-Perm: strain exposed to a sub-lethal dose of permethrin and selected with permethrin.

Figure 3 - Functional categories represented by genes differentially transcribed in each permethrin-selected strain

For each strain, the number of genes significantly over- or under-transcribed used for assessing the frequency of functional categories are indicated. The small Venn diagram indicates the gene sets considered for the analysis.

Figure 4 - Functional categories represented by genes specifically differentially transcribed in each permethrin-selected strain

For each strain, the number of genes significantly over- or under-transcribed used for assessing the frequency of functional categories are indicated. The small Venn diagram indicates the gene sets considered for the analysis.

Figure 4 - Functional categories represented by genes differentially transcribed in multiple permethrin-selected strain

For each strain, the number of genes significantly over- or under-transcribed used for assessing the frequency of functional categories are indicated. The small Venn diagram indicates the gene sets considered for the analysis.

Figure 6 - Hierarchical clustering of detoxification genes differentially transcribed in permethrin-selected strains

Clustering analysis was performed on 29 P450s and 18 other detoxification genes significantly differentially transcribed in at least one permethrin-selected strain. Color scale indicates transcription ratios relative to the parental susceptible strain. Accession numbers and gene names or annotation are indicated. Stars indicate significant transcription variations (>1.5-fold in either direction and corrected P value < 0.01). P450 names ending by interrogation marks refer to genes associated to a CYP subfamily but for which gene name is ambiguous.

Description of additional data files

Additional file 1

Suppl. Figure 1. This figure shows the validation of transcription ratios obtained from microarray analysis by real-time quantitative RT-PCR. Validation was performed on 8 selected genes found significantly over-transcribed by microarray in at least one strain. For each gene, transcription ratios from both techniques across all strains are represented. Black bars represent microarray transcription ratios with NS indicating a non significant corrected P value. Grey bars indicate RT-qPCR mean transcription ratios (\pm SE). Gene names or annotation and accession numbers are indicated.

Additional file 2

Suppl. Table 1. This table contains all transcription data for all genes found differentially transcribed in permethrin-selected strains comparatively to the parental susceptible strain Bora-Bora. For each gene, accession number, gene annotation and functional category are indicated. Fold transcription relative to the susceptible strain and corrected P value are indicated for each strain. ND indicates a gene not detected by microarray.

Additional file 3

Suppl. Table 2. This table contains all transcription data for all genes detected in our microarray experiment. Fold transcription relative to the susceptible strain and corrected P value are indicated for each strain. ND indicates a gene not detected by microarray.

Figure 1

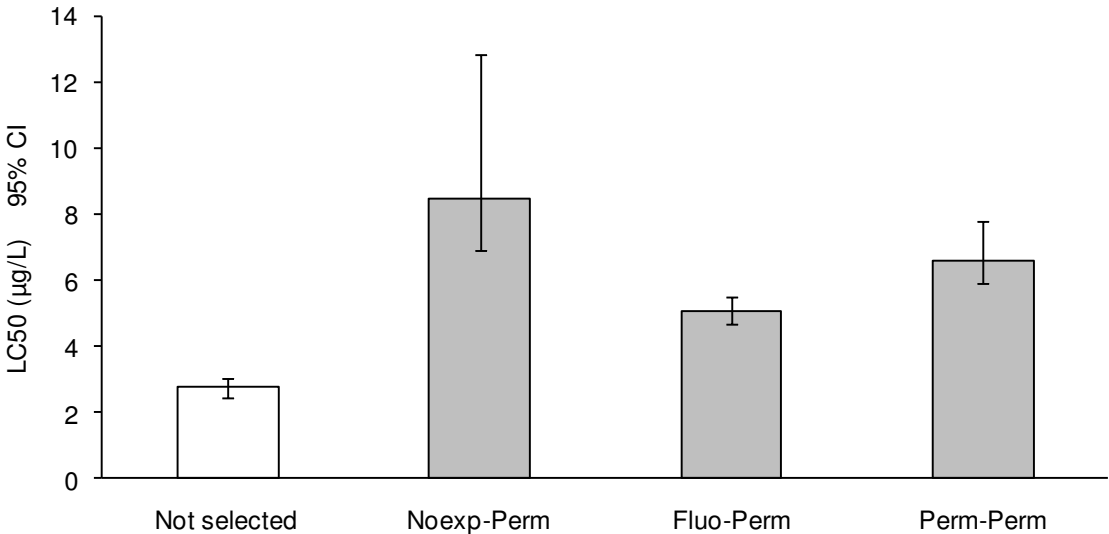


Figure 2

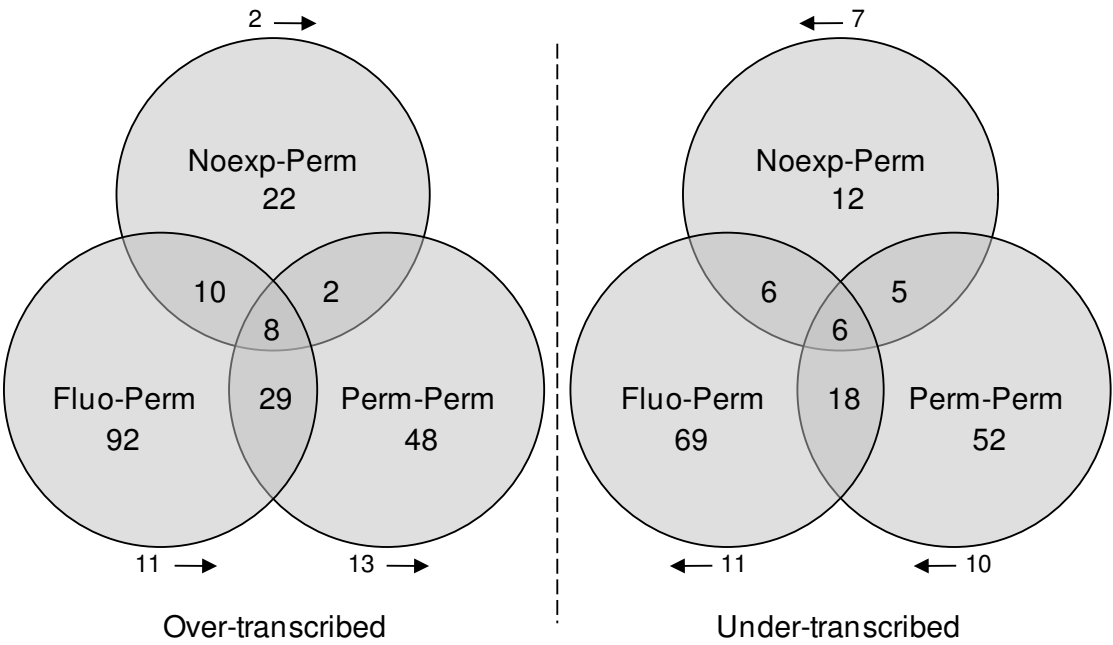


Figure 3

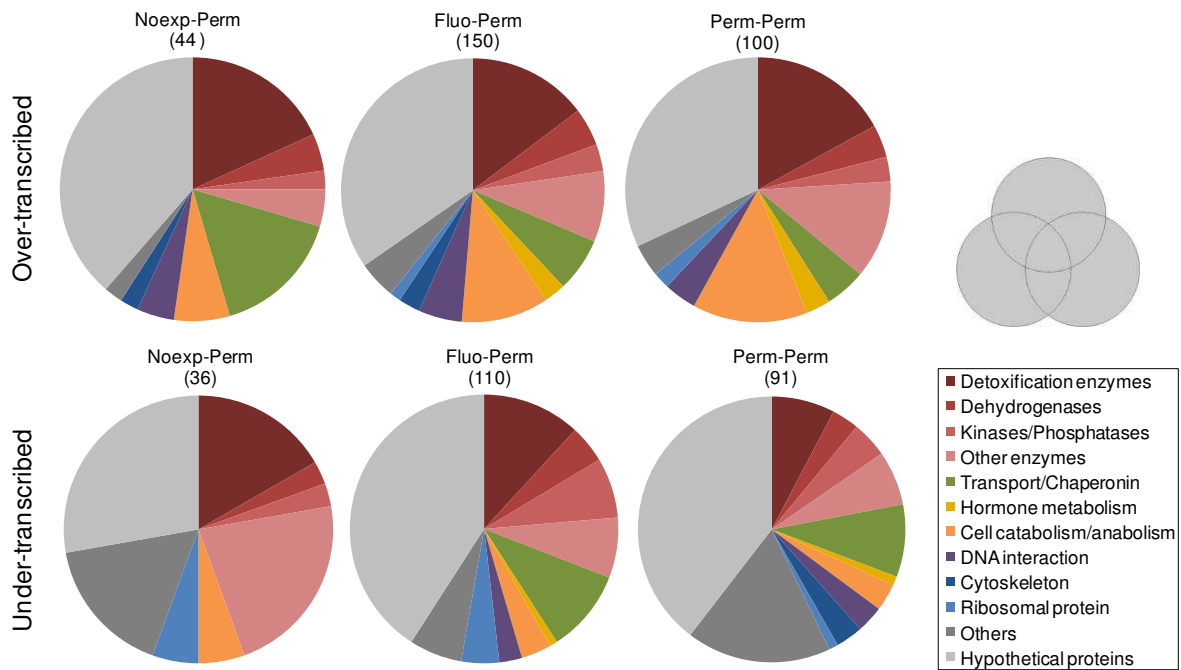


Figure 4

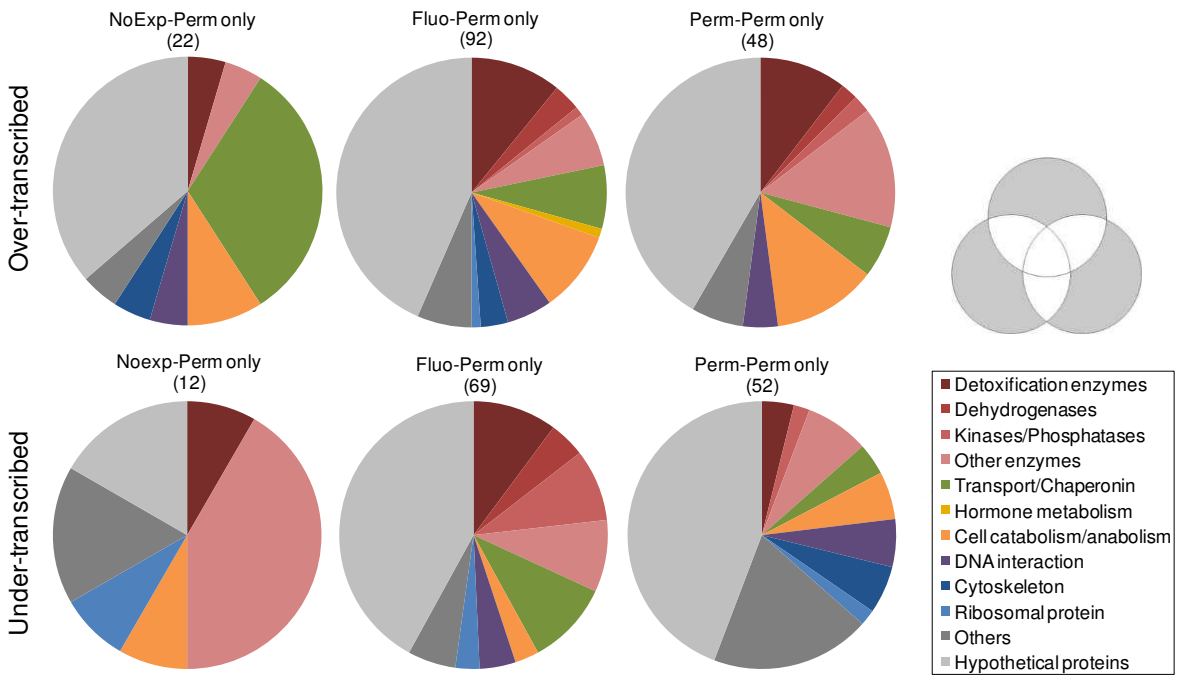


Figure 5

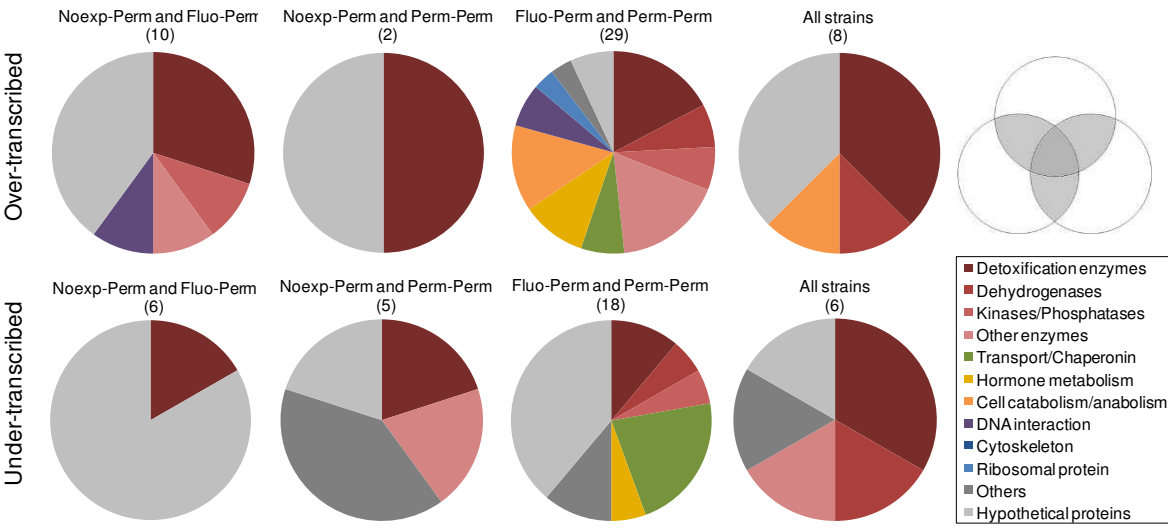
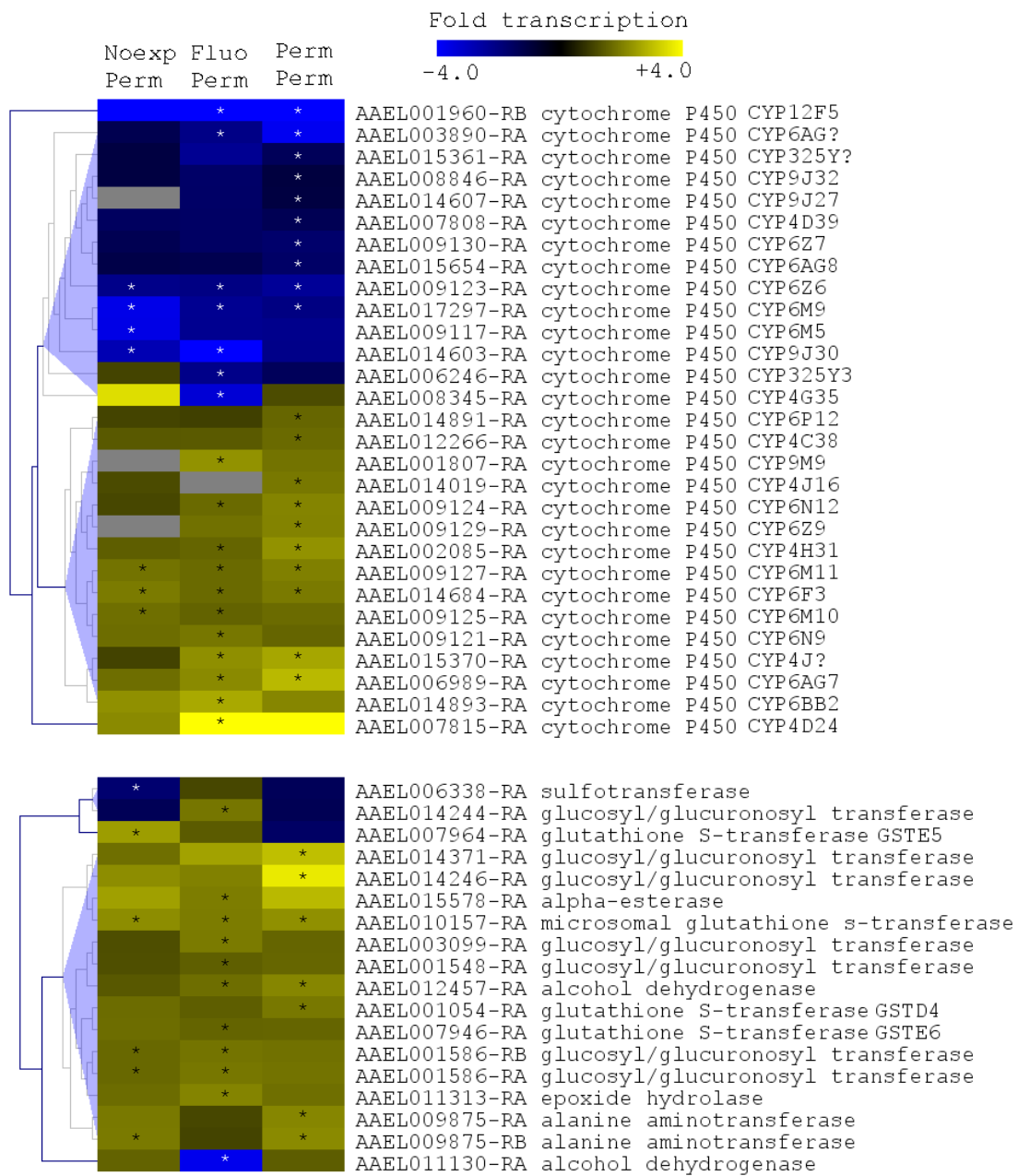


Figure 6



Publication VI

Research article

Open Access

Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies)

Sébastien Marcombe¹, Rodolphe Poupardin², Frederic Darriet¹, Stéphane Reynaud², Julien Bonnet¹, Clare Strode³, Cecile Brengues¹, André Yébakima⁴, Hilary Ranson³, Vincent Corbel¹ and Jean-Philippe David*²

Address: ¹Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche Pour le Développement (IRD) Montpellier, France, ²Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, UMR 5553 CNRS - Université de Grenoble), Grenoble, France, ³Vector Research group, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK and ⁴Centre de démoustication, Conseil général de la Martinique, Fort de France, Martinique, France

Email: Sébastien Marcombe - sebastien.marcombe@ird.fr; Rodolphe Poupardin - rodolphe.poupardin@e.ujf-grenoble.fr; Frederic Darriet - darriet@mpl.ird.fr; Stéphane Reynaud - stephane.reynaud@ujf-grenoble.fr; Julien Bonnet - bonnetj@mpl.ird.fr; Clare Strode - c.strode@liverpool.ac.uk; Cecile Brengues - cecile.brengue@ird.fr; André Yébakima - Yebakima@cg972.fr; Hilary Ranson - hranson@liverpool.ac.uk; Vincent Corbel - vincent.corbel@ird.fr; Jean-Philippe David* - jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

* Corresponding author

Published: 26 October 2009

Received: 25 May 2009

BMC Genomics 2009, 10:494 doi:10.1186/1471-2164-10-494

Accepted: 26 October 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/494>

© 2009 Marcombe et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The yellow fever mosquito *Aedes aegypti* is a major vector of dengue and hemorrhagic fevers, causing up to 100 million dengue infections every year. As there is still no medicine and efficient vaccine available, vector control largely based on insecticide treatments remains the only method to reduce dengue virus transmission. Unfortunately, vector control programs are facing operational challenges with mosquitoes becoming resistant to commonly used insecticides. Resistance of *Ae. aegypti* to chemical insecticides has been reported worldwide and the underlying molecular mechanisms, including the identification of enzymes involved in insecticide detoxification are not completely understood.

Results: The present paper investigates the molecular basis of insecticide resistance in a population of *Ae. aegypti* collected in Martinique (French West Indies). Bioassays with insecticides on adults and larvae revealed high levels of resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides. Molecular screening for common insecticide target-site mutations showed a high frequency (71%) of the sodium channel 'knock down resistance' (*knr*) mutation. Exposing mosquitoes to detoxification enzymes inhibitors prior to bioassays induced a significant increased susceptibility of mosquitoes to insecticides, revealing the presence of metabolic-based resistance mechanisms. This trend was biochemically confirmed by significant elevated activities of cytochrome P450 monooxygenases, glutathione S-transferases and carboxylesterases at both larval and adult stages. Utilization of the microarray *Aedes Detox Chip* containing probes for all members of detoxification and other insecticide resistance-related enzymes revealed the significant constitutive over-transcription of multiple detoxification genes at both larval and adult stages. The

over-transcription of detoxification genes in the resistant strain was confirmed by using real-time quantitative RT-PCR.

Conclusion: These results suggest that the high level of insecticide resistance found in *Ae. aegypti* mosquitoes from Martinique island is the consequence of both target-site and metabolic based resistance mechanisms. Insecticide resistance levels and associated mechanisms are discussed in relation with the environmental context of Martinique Island. These findings have important implications for dengue vector control in Martinique and emphasize the need to develop new tools and strategies for maintaining an effective control of *Aedes* mosquito populations worldwide.

Background

Every year, 50 to 100 million dengue infections worldwide causing from 20,000 to 25,000 deaths from dengue and hemorrhagic fever are recorded [1]. As there is still no medicine and efficient vaccine available, vector control by the recourse of environmental management, educational programs and the use of chemical and biological agents, remains the only method to reduce the risk of dengue virus transmission [1]. Unfortunately, most of dengue vector control programs implemented worldwide are facing operational challenges with the emergence and development of insecticide resistance in *Ae. aegypti* [2] and *Ae. albopictus* [3]. Resistance of *Ae. aegypti* to insecticides has been reported in many regions including South east Asia [4,5], Latin America [6] and the Caribbean [7].

Inherited resistance to chemical insecticides in mosquitoes is mainly the consequence of two distinct mechanisms: the alteration of target sites inducing insensitivity to the insecticide (target-site resistance) and/or an increased metabolism of the insecticide (metabolic-based resistance) [8]. Metabolic-based resistance involves the bio-transformation of the insecticide molecule by enzymes and is now considered as a key resistance mechanism of insects to chemical insecticides [8,9]. This mechanism may result from two distinct but additive genetic events: *i*) a mutation of the enzyme protein sequence leading to a better metabolism of the insecticide, and/or *ii*) a mutation in a non-coding regulatory region leading to the over-production of an enzyme capable of metabolizing the insecticide. So far, only the second mechanism has been clearly associated with the resistant phenotype in mosquitoes. Three large enzyme families, the cytochrome P450 monooxygenases (P450s), glutathione S-transferases (GSTs) and carboxy/cholinesterases (CCEs) have been implicated in the metabolism of insecticides [8,10-12]. The rapid expansion and diversification of these so-called 'detoxification enzymes' in insects is likely to be the consequence of their adaptation to a broad range of natural xenobiotics found in their environment such as plant toxins [13]. These enzymes have also been involved in mosquito response to various anthropogenic xenobiotics such as heavy metals, organic pollutants and chemical insecticides [14-16].

Although identifying metabolic resistance is possible by toxicological and biochemical techniques, the large panel of enzymes potentially involved together with their important genetic and functional diversity makes the understanding of the molecular mechanisms and the role of particular genes a challenging task. As more mosquito genomes have been sequenced and annotated [17,18], the genetic diversity of genes encoding mosquito detoxification enzymes has been unravelled and new molecular tools such as the *Aedes* and *Anopheles* 'detox chip' microarrays allowing the analysis of the expression pattern of all detoxification genes simultaneously have been developed [19,20]. These specific microarrays were successfully used to identify detoxification genes putatively involved in metabolic resistance in various laboratory and field-collected mosquito populations resistant to insecticides [19-24].

In Latin America and the Caribbean, several *Ae. aegypti* populations show strong resistance to pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides correlated with elevated activities of at least one detoxification enzyme family [25-28]. In addition, several points of non-synonymous mutations in the gene encoding the trans-membrane voltage-gated sodium channel (*kdr* mutations) have been described and showed to confer resistance to pyrethroids and DDT [27,29].

Several questions remain concerning the impact of insecticide resistance on the efficacy of vector control operations. In Martinique (French West Indies), high levels of resistance to the organophosphate temephos and the pyrethroid deltamethrin were reported. This resistance was characterized by an important reduction of both mosquito knock-down and mortality levels after thermal-fogging with deltamethrin and P450-inhibitor synergized pyrethroids, indicating that resistance was negatively impacting on control programmes and that this resistance was conferred, at least in part, by elevated cytochrome P450 activity [30].

In this study, we explored the mechanisms conferring insecticide resistance in an *Ae. aegypti* population from Martinique island. Larval bioassays and adult topical

applications were used to determine the current resistance level of this population to insecticides. The presence of metabolic-based resistance mechanisms was investigated by exposing mosquitoes to enzyme inhibitors prior to bioassays with insecticides and by measuring representative enzyme activities of each detoxification enzyme family. At the molecular level, the frequency of the target-site *kdr* mutation was investigated and a microarray approach followed by quantitative real-time RT-PCR validation was used to identify detoxification genes putatively involved in metabolic resistance. Results from this study will help to implement more effective resistance management strategies in this major disease vector in the future.

Results

Larval bioassays (Table 1) showed that the Vauclin strain is far less affected by temephos than the susceptible Bora-Bora strain (RR₅₀ of 44-fold and RR₉₅ of 175-fold). In the susceptible strain, temephos toxicity was not significantly increased in the presence of detoxification enzyme inhibitors (PBO, DEF and DMC). By contrast, the level of resistance to temephos of the Vauclin strain was significantly reduced in the presence of PBO, DEF and DMC (from 175 to 60, 44 and 109-fold respectively for RR₉₅) indicating the involvement of P450s, CCEs and in a lesser extent GSTs in the resistance of larvae to temephos.

Topical applications of the pyrethroid insecticide deltamethrin on adults of each strain (Table 2) revealed that the Vauclin strain is also highly resistant to deltamethrin (RR₅₀ of 56-fold and RR₉₅ of 76-fold). In both strains, the toxicity of deltamethrin increased significantly in the pres-

ence of detoxification enzyme inhibitors, however only PBO and DMC induced higher synergistic effects in the Vauclin strain than in the susceptible Bora-Bora strain (SR₅₀ of 9.94 and 3.76 respectively). In the Vauclin strain, PBO and DMC significantly reduced the resistance level (from 76-fold to 41-fold and 43-fold respectively for RR₉₅), indicating a significant role of P450s and GSTs in the resistance of adults to deltamethrin.

Comparison of constitutive detoxification enzyme activities between the susceptible strain Bora-Bora and the insecticide-resistant Vauclin strain revealed significant differences at both larval and adult stages (Figure 1). P450 activities were elevated in both larvae and adults of the Vauclin strain (1.57-fold and 1.78-fold respectively with P < 0.001 at both life stages). Similarly, GST activities were found elevated in larvae and adults of the Vauclin strain (1.43-fold and 1.53-fold respectively with P < 0.001 at both life stages). Finally, α- and β-carboxylesterase activities were also found slightly elevated in the Vauclin strain in larvae (1.13-fold and 1.18-fold with P < 0.05 and P < 0.001 respectively) and adults (1.11-fold and 1.16-fold with P < 0.001 and P < 0.05 respectively).

Sequencing of the voltage-gated sodium channel gene conducted on the Vauclin strain showed the presence of the *kdr* mutation at position 1016 (GTA to ATA) leading to the replacement of valine by an isoleucine (V1016Ile) at a high allelic frequency (f(R) = 0.71, n = 24) with RR = 12, RS = 11 and SS = 1. Conversely, no *kdr* resistant allele was detected in the susceptible Bora-Bora strain (n = 30).

Table 1: Insecticidal activity of temephos with and without enzyme inhibitors on larvae of *Aedes aegypti* Vauclin and Bora-Bora strains

Strain	Enzyme inhibitor	Slope (± SE)	LC ₅₀ (µg/L) (95% CI)	LC ₉₅ (µg/L) (95% CI)	RR ₅₀ (95% CI)	RR ₉₅ (95% CI)	SR ₅₀ (95% CI)	SR ₉₅ (95% CI)
Bora-Bora	-	8.49 (0.45)	3.7 (3.6-3.8)	5.7 (5.5-6)	-	-	-	-
	PBO	8.28 (0.67)	4.2 (4-4.4)	6.7 (6.4-7)	-	-	0.87 (0.74-1.03)	0.87 (0.74-1.03)
	DEF	8.13 (0.44)	3.3 (3.2-3.4)	5.3 (5.1-5.6)	-	-	1.10 (0.98-1.24)	1.10 (0.98-1.24)
	DMC	11.16 (0.54)	4.3 (4.2-4.4)	6.0 (5.8-6.2)	-	-	0.86 (0.79-0.94)	0.96 (0.81-1.14)
Vauclin	-	2.08 (0.08)	160 (150-180)	1000 (870-1180)	44 (40-48)	175 (150-205)	-	-
	PBO	3.60 (0.24)	140 (130-150)	400 (360-450)	33 (29-38)	60 (51-71)	1.16 (1.05-1.29)	2.52 (2.16-2.95)
	DEF	3.00 (0.16)	68 (64-72)	240 (210-270)	21 (18-22)	44 (38-52)	2.37 (2.18-2.57)	4.27 (3.64-5)
	DMC	2.05 (0.11)	103 (92-110)	650 (560-790)	24 (22-27)	109 (92-129)	1.57 (1.39-1.79)	1.57 (1.39-1.79)

Resistant ratios RR₅₀ and RR₉₅ were obtained by calculating the ratio between the LC₅₀ and LC₉₅ between Vauclin and Bora-Bora strains; Synergism ratios SR₅₀ and SR₉₅ were obtained by calculating the ratio between LC₅₀ and LC₉₅ with and without enzyme inhibitor. (CI): Confidence Interval. Significant RR and SR are shown in bold.

Table 2: Insecticidal activity of deltamethrin with and without enzyme inhibitors on adults of *Aedes aegypti* Vauclin and Bora-Bora strains

Strain	Enzyme inhibitor	Body weight (mg)	Slope (\pm SE)	LD ₅₀ (μ g/L) (95% CI)	LD ₉₅ (μ g/L) (95% CI)	RR ₅₀ (95% CI)	RR ₉₅ (95% CI)	SR ₅₀ (95% CI)	SR ₉₅ (95% CI)
Bora-Bora	-	2.12	3.31 (0.27)	18 (16-19)	55 (47-69)	-	-	-	-
	PBO	2.27	3.65 (0.34)	3.4 (3.1-3.7)	9.5 (8.1-12.1)	-	-	5.2 (4.52-5.98)	5.79 (4.30-7.81)
	DEF	2.44	2.41 (0.27)	3.4 (3-3.9)	16 (12-25)	-	-	5.12 (4.48-5.86)	3.35 (2.42-4.64)
	DMC	2.39	2.94 (0.22)	7.3 (6.6-8.1)	27 (22-34)	-	-	2.41 (2.11-2.76)	2.09 (1.57-2.78)
Vauclin	-	2.65	2.61 (0.19)	990 (880-1100)	4210 (3470-5380)	56 (49-64)	76 (58-99)	-	-
	PBO	2.27	2.78 (0.17)	99 (91-108)	390 (330-470)	29 (26-33)	41 (31-53)	9.94 (8.79-11.23)	10.89 (8.64-13.72)
	DEF	2.25	2.14 (0.22)	170 (150-190)	1000 (750-1510)	49 (43-56)	60 (43-86)	5.81 (5.08-6.65)	4.23 (3.16-5.66)
	DMC	2.56	2.57 (0.16)	260 (240-290)	1150 (950-1460)	36 (32-40)	43 (33-57)	3.76 (3.35-4.23)	3.68 (2.86-4.72)

Resistant ratios RR₅₀ and RR₉₅ were obtained by calculating the ratio between the LD₅₀ and LD₉₅ between Vauclin and Bora-Bora strains; Synergism ratios SR₅₀ and SR₉₅ were obtained by calculating the ratio between LD₅₀ and LD₉₅ with and without enzyme inhibitor. (CI): Confidence Interval. Significant RR and SR are shown in bold.

We used the microarray '*Aedes Detox Chip*' (Strode et al., 2007) to compare the transcription levels of all *Ae. aegypti* detoxification genes between the insecticide-resistant strain Vauclin and the susceptible strain Bora-Bora in larvae and adults. Overall, 224 and 214 probes out of 318 were detected consistently in at least 3 hybridisations out of 6 in larvae and adults respectively. Among them, 31 detoxification genes were significantly differentially transcribed (transcription ratio > 1.5-fold in either direction and corrected P value < 0.01) in larvae or adults (Figure 2 and Additional file 1). Most of these genes encode P450s (CYPs) with 4 of them being differentially transcribed in the Vauclin strain at both life stages (*CYP9J22*, *CYP6Z6*, *CYP6M6* and *CYP304C1*).

In larvae, 18 genes (15 CYPs, 1 GST and 2 CCEs) were found significantly differentially transcribed between the insecticide-resistant strain Vauclin and the susceptible strain Bora-Bora (Figure 2A). Among them, 14 genes were over-transcribed in the Vauclin strain while only 4 genes were under-transcribed. Most over-transcribed genes were represented by CYP genes with a majority belonging to the CYP6 subfamily (*CYP6BB2*, *CYP6M6*, *CYP6Y3*, *CYP6Z6*, *CYP6M10* and *CYP6AA5*). Three CYP9s were also over-transcribed in larvae of the Vauclin strain (*CYP9J23*, *CYP9J22* and *CYP9J9*) with a strong over-transcription of *CYP9J23* (5.3-fold) together with 2 CYP4s (*CYP4J15* and *CYP4D23*). Among other over-transcribed genes, 2 carboxy/cholinesterases (*CCEunk7o* and *CCEae2C*) and 1 glutathione S-transferase (*AaGSTE7*) were slightly over-

transcribed in the Vauclin strain. Lastly, 4 CYPs (*CYP9M9*, *CYP9J20*, *CYP304C1* and *CYP6AG8*) were under-transcribed in insecticide-resistant larvae comparatively to susceptible Larvae.

In adults, 18 genes (12 CYPs, 1 GST, 3 CCEs and 2 Red/Ox) were found differentially transcribed in the insecticide-resistant strain Vauclin comparatively to the susceptible strain Bora-Bora (Figure 2B). As in larvae, most of the over-transcribed genes belong to the CYP6 and CYP9 subfamilies (*CYP6CB2*, *CYP6M11*, *CYP6Z6*, *CYP6M6* and *CYP9J22*, *CYP9M9*, *CYP9J6*) with only 2 additional CCEs (*CCEae3A* and *CCEae4B*) being moderately over-transcribed in the Vauclin strain. Nine genes were under-transcribed in Vauclin adults, including 5 CYPs (*CYP304C1*, *CYP9M6*, *CYP325Q2*, *CYP325V1* and *CYP6P12*), 1 CCE (*CCEunk6o*), 1 GST (*GSTS1-1*) and 2 thioredoxin peroxidases (*TPx4* and *TPx3B*). Interestingly *CYP304C1* and *TPx4* were both found strongly under-transcribed (14.1 and 10.4-fold respectively) in insecticide-resistant adults.

Validation of microarray data was performed by real-time quantitative RT-PCR on 10 detoxification genes identified as over-transcribed in larvae or adults of the Vauclin strain (Figure 3). The over-transcription of genes identified from microarray experiments were all confirmed by quantitative RT-PCR in both life stages, although expression ratios obtained from RT-PCR were frequently higher than those obtained from microarray experiments.

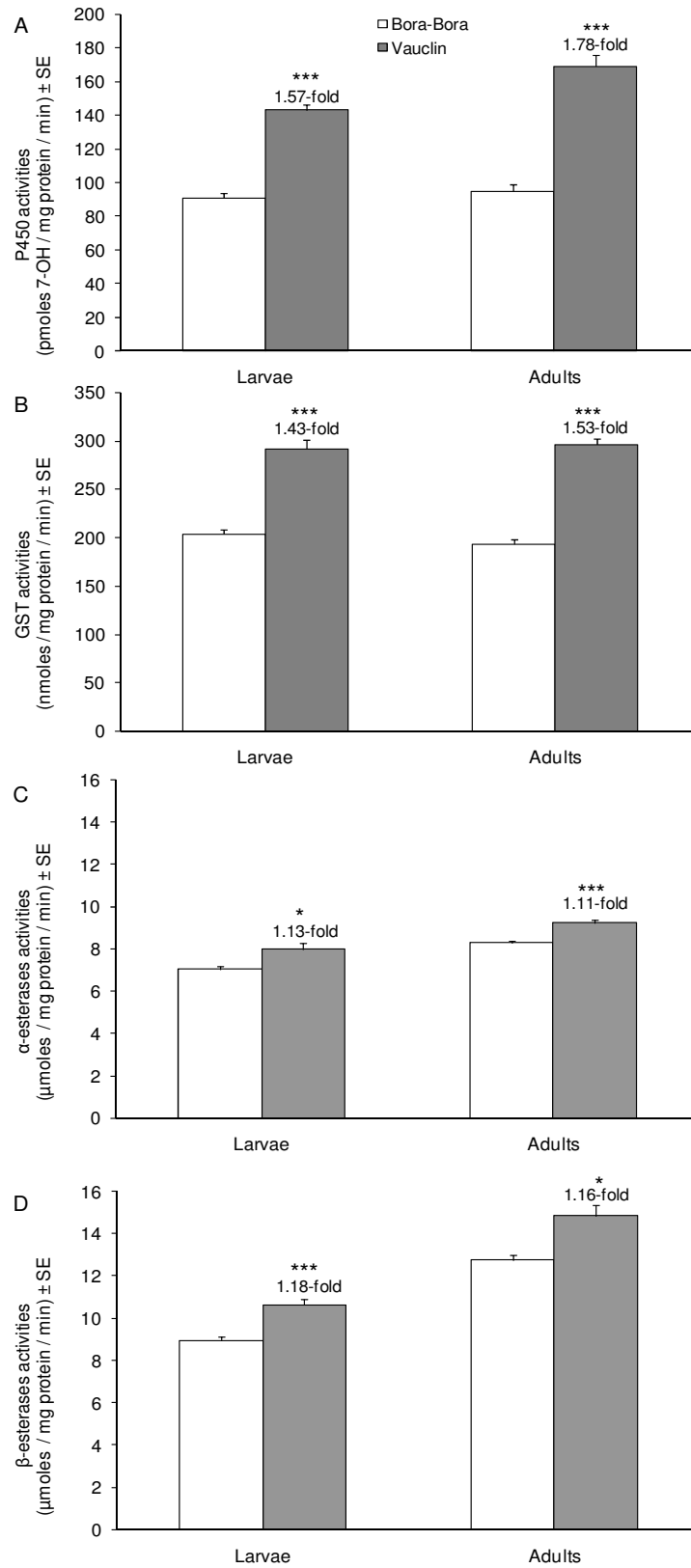


Figure 1 (see legend on next page)

Figure 1 (see previous page)

Comparison of detoxification enzymes activities between the insecticide-resistant strain Vauclin and the susceptible strain Bora-Bora. A) P450 activities were measured with the ECOD method [63] on 20 µg microsomal proteins after 15 min and expressed as pmol of 7-OH produced/mg microsomal protein/minute (± SE). B) GST activities were measured with the CDNB method [64] on 200 µg cytosolic proteins during 1 min and expressed as nmol of conjugated CDNB/µg protein/min (± SE). α-esterase (C) and β-esterase (D) activities were measured with the naphthyl acetate method [65] on 30 µg cytosolic proteins after 15 min and expressed as µmol α- or β-naphthol produced/mg protein/minute (± SE). For each strain and each life stage, 3 independent biological replicates were analyzed and measures were repeated 15, 15 and 30 times for P450, GST and esterase activities respectively. Statistical comparison of enzyme activities between the Vauclin and Bora-Bora strains were performed at each life stage separately with a Mann and Whitney's test (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Discussion

The aim of the present study was to investigate insecticide resistance mechanisms of *Ae. aegypti* mosquitoes from Martinique (French West Indies).

Toxicological results confirmed the high level of resistance of the Vauclin strain from Martinique to the organophosphate temephos at the larval stage and to the pyrethroid deltamethrin at the adult stage [30]. The use of specific detoxification enzyme inhibitors suggested that resistance of larvae to temephos is linked to carboxylesterases and to a lesser extent P450s and GSTs. In adults, resistance to deltamethrin appeared principally linked to P450s and GSTs. Comparison of global detoxification enzyme activities between the two strains revealed elevated P450s, GSTs and in a lesser extent CCEs activities in the Vauclin strain at both life-stages, confirming the importance of metabolic resistance mechanisms in Martinique.

Carboxylesterases based-resistance mechanism is a major mechanism for organophosphate resistance in insects [12]. Several examples of *Ae. aegypti* resistance to organophosphates in the Caribbean linked to elevated carboxylesterases activities have been described [25,31]. Our toxicological and biochemical data confirms these observations despite a moderate elevated level of CCEs activities in the Vauclin strain. Among detoxification enzymes, P450s have been shown to play a major role in pyrethroid resistance in insects [8,10,32]. In Martinique, Marcombe *et al.* [30] suggested the involvement of P450s in the reduced efficacy of deltamethrin space-spray operations. Elevated GST levels have also been frequently associated with insect resistance to insecticides such as DDT and pyrethroids [33-35]. Our toxicological and biochemical data support the role of P450s and GSTs in insecticide resistance in Martinique.

At the molecular level, several mutations in the voltage-gated sodium channel gene have been associated with pyrethroid resistance in *Ae. aegypti* from Asian, Latin American and Caribbean countries [27,29,36]. Our results revealed a high frequency (71%) of the V1016I *kdr* mutation in *Ae. aegypti* populations from the community

of Vauclin. The role of this mutation in pyrethroid resistance was clearly demonstrated by genotype-phenotype association studies [37]. The high frequency of the mutation, together with the incomplete effect of enzyme inhibitors in adults, supports a contribution of this *kdr* mutation in deltamethrin resistance.

Acetylcholinesterase (AChE) is critical for hydrolysis of acetylcholine at cholinergic nerve synapses and is a target for organophosphate and carbamate insecticides [38]. Altered AChE is an important resistance mechanism to organophosphates in many insects. Following the methods of Alout *et al.* [39] and Bourguet *et al.* [40], AChE activities of Vauclin mosquitoes were determined to investigate the presence of the G119S and/or F290V mutations. No insensitive AChE phenotypes were found in any of the mosquitoes tested (Corbel V., unpublished data), suggesting that organophosphate resistance of the Vauclin strain is rather due to detoxification enzymes unless other mutations occurred elsewhere in the *Ace* gene.

Our microarray screening identified 14 and 9 over-transcribed detoxification genes in larvae and adults of the Vauclin strain respectively. Among them, 4 P450s (*CYP6M6*, *CYP6Z6*, *CYP9J23* and *CYP9J22*), the glutathione S-transferase *GSTe7* and the carboxy/cholinesterase *CCEae3A* were all confirmed to be over-transcribed at both life-stages, supporting their involvement in insecticide-resistance. Other genes appeared more highly over-transcribed in adults (*CYP9J22*, *CYP9M9*, *CYP6M11*, *CCEae3A*) or in larvae (*CYP6M6*), suggesting that particular enzymes might be more specifically involved in resistance to one insecticide during a particular life-stage as argued by Paul *et al.* [41]. Validation of transcription profiles by real-time quantitative RT-PCR was successful for the 10 genes tested although expression ratios obtained with RT-PCR were often higher. The underestimation of transcription ratios obtained from microarray data is likely due to technical issues and has been previously evidenced in other studies [14,42].

Over-transcription of genes encoding P450s has been frequently associated with metabolic-based insecticide

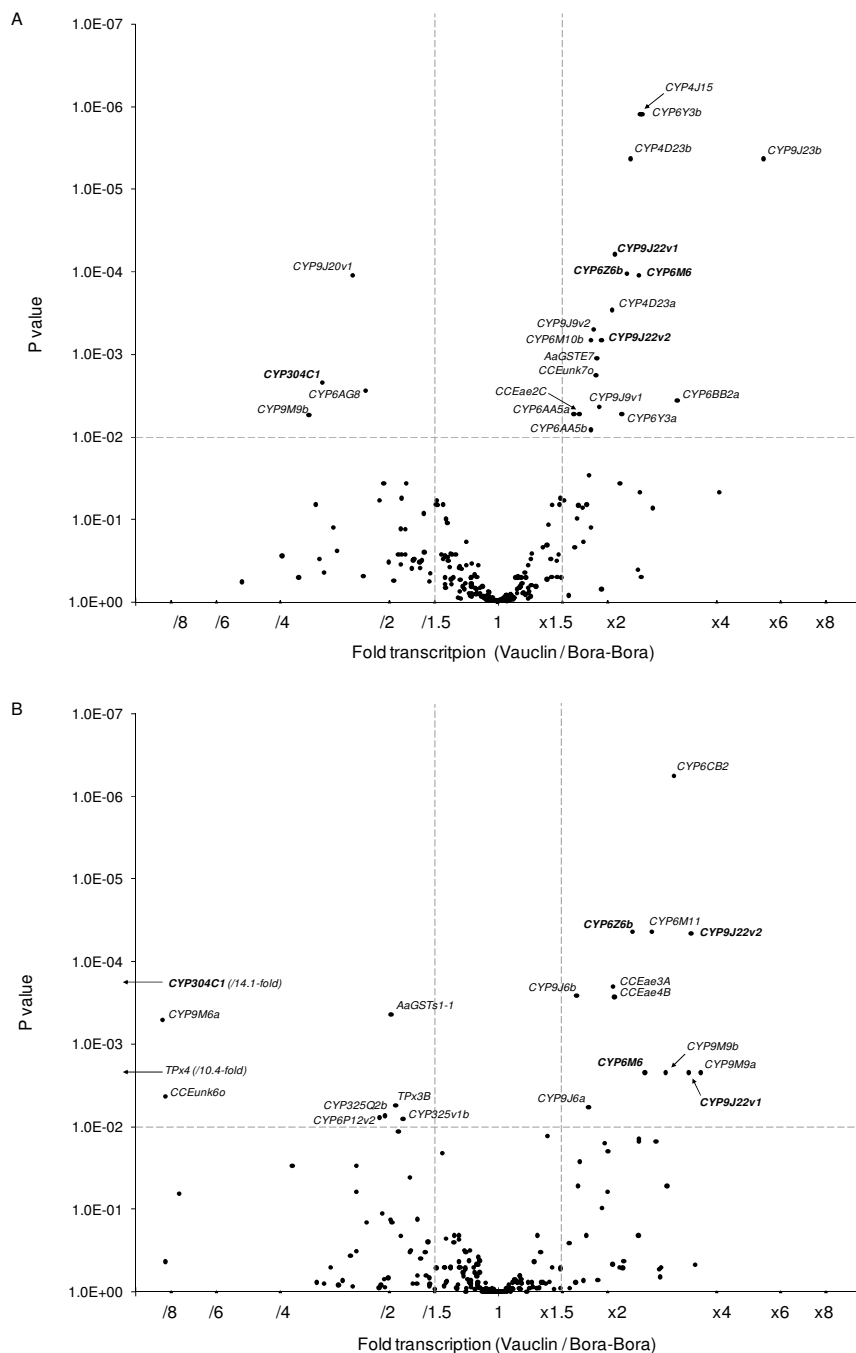


Figure 2
Microarray screening of detoxifications genes differentially transcribed in the insecticide-resistant strain Vauclin. Differential transcription of detoxification genes was investigated separately in 4th-stage larvae (A) and 3-days old adults (B). For each life stage, differences in gene transcription are indicated as a function of both transcription ratio (Vauclin/Bora-Bora) and ratio's significance (t-test P values). For each comparison, only probes showing consistent data in at least 3 hybridisations out of 6 were considered. Vertical lines indicate 1.5-fold transcription difference in either direction. Horizontal line indicates significance threshold ($p < 0.01$) adopted for the one sample t-test after Benjamini and Hochberg multiple testing correction procedure. Probes showing both more than 1.5-fold differential transcription and a significant P value are named. Probes that were found under- or over-transcribed in both larvae and adults are shown in bold. Suffixes *a* and *b* represent two different probes of the same gene while suffixes *v1* and *v2* represent two different alleles of the same gene.

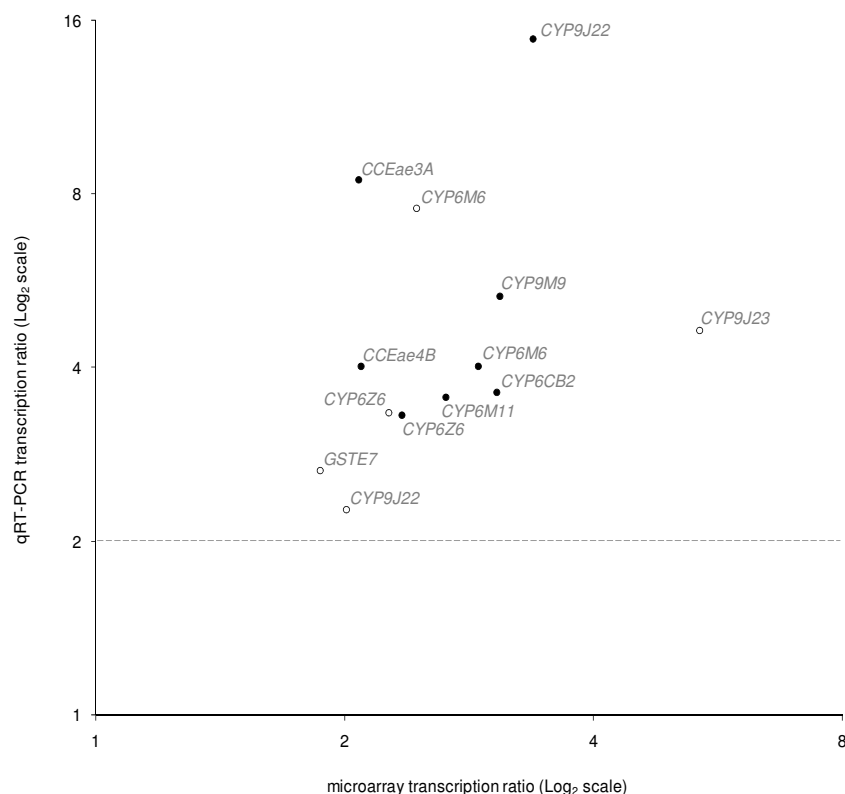


Figure 3

Real-time quantitative RT-PCR validation of microarray data. Validation of differential transcription between the two strains was performed on 11 selected genes in 4th-stage larvae (white dots) and 3-days old adults (black dots). Transcription ratios obtained from real-time quantitative RT-PCR experiments were normalized with the two housekeeping genes *AeRPL8* and *AeRPS7* and shown as mean value over 3 independent biological replicates.

resistance mechanisms in insects [10]. In mosquitoes, the *CYP6Z* subfamily has been previously associated with response to pyrethroid, carbamates and organochlorine insecticides. In *Ae. aegypti*, *CYP6Z9* has been found 4-fold over-transcribed in a permethrin-resistant strain collected in Northern Thailand [20]. In two recent studies, *CYP6Z8* was also identified as inducible by permethrin and other pollutants [14,15]. In *An. gambiae*, *CYP6Zs* have been frequently found constitutively over-transcribed in permethrin- and DDT-resistant strains [19,21,43]. Recent studies demonstrated that the enzyme encoded by *An. gambiae* *CYP6Z1* can metabolize the insecticides carbaryl and DDT while *CYP6Z2* with a narrower active site, can only metabolize carbaryl [44,45]. Recently, another *An. gambiae* P450 (*CYP6P3*), was shown to be able to degrade pyrethroid insecticides [22]. The over-transcription of *CYP6Z6* in the Vauclin strain may indicate the involvement of *Ae. aegypti* *CYP6Zs* in insecticide resistance in Martinique. However, the decisive demonstration of their capability to metabolize insecticides requires further investigations.

The association of *CYP6Ms* with metabolic resistance to pyrethroids has also been previously described in mosquitoes. In *Ae. aegypti* larvae, *CYP6M6* and *CYP6M11* were found inducible by permethrin and pollutants [14]. Although no *Aedes* *CYP6Ms* have been found constitutively over-transcribed in other insecticide-resistant strains, *An. gambiae* *CYP6M2* was found significantly over-transcribed in various strains resistant to pyrethroids [21,46]. Recent studies indicate that *CYP6M2* is able to metabolize pyrethroid insecticides (Stevenson B. personal communication). Our results suggest that *Ae. aegypti* *CYP6M6* and *CYP6M11*, with protein sequences similar to *An. gambiae* *CYP6M2*, might also be involved in resistance of *Ae. aegypti* to pyrethroids in Martinique.

Finally, the glutathione S-transferase *GSTE7* and the carboxy/cholinesterase *CCEae3A* were both found over-transcribed in both life-stages of the Vauclin strain. The role of GSTs in resistance to chemical insecticides has been previously evidenced in insects with the enzyme encoded by *An. gambiae* *GSTE2* metabolizing DDT [35,47,48] and the

housefly *MdGST6-A* metabolizing two organophosphate insecticides [49]. In *Ae. aegypti*, *GSTE2* also metabolises DDT and is over-transcribed in a pyrethroid and DDT-resistant strain from Thailand [35]. In 2008, Strode *et al.* [20] also revealed the over-transcription of *GSTE7* in pyrethroid-resistant mosquitoes. Our results confirm that *GSTE7* might have a role in insecticide resistance in *Ae. aegypti*. Over-production of carboxylesterases has been shown to play an important role in resistance to organophosphate insecticides in mosquitoes [50-53]. Elevated esterase activities conferring resistance to organophosphate insecticides has usually been linked to genomic amplification of specific alleles although gene over-transcription may also be involved [12]. Considering the high resistance of larvae of the Vauclin strain to temephos, over-transcribed *CCEs* represent good candidates for organophosphate metabolism in *Ae. aegypti*.

It has been suggested that insecticide resistance could be accentuated by the exposure of mosquito populations to pollutants and pesticides used in agriculture [14,15,54,55]. In Martinique, bananas, sugar cane, and pineapple represent important cultured surface areas often localized near mosquito breeding sites. These cultures have been submitted for decades to heavy use of insecticides such as the organochlorates aldrin, dieldrin and chlordecone and herbicides such as the triazine simazine, the pyridines paraquat and glyphosate [56]. This particular situation is likely to have contributed to the high resistance of *Ae. aegypti* to chemical insecticides and to the selection of particular detoxification genes in Martinique.

Conclusion

We have identified multiple insecticide resistance mechanisms in *Ae. aegypti* mosquitoes from Martinique (French West Indies) significantly reducing the insecticidal activity of insecticides used for their control. Microarray screening identified multiple detoxification genes over-transcribed at both life-stages in resistant mosquitoes, suggesting their possible involvement in insecticide-resistance. Further experimental validation by using enzyme characterization and RNA interference will allow confirming the role of these genes in the resistance phenotype. As previously shown in mosquitoes [57], the epistasis between the *kdr* mutation and particular P450s genes is likely to contribute to the high level of resistance to pyrethroids in *Ae. aegypti* from Martinique and might seriously threaten the control of dengue vectors in the future. A better understanding of the genetic basis of insecticide resistance is an essential step to implement more effective vector control strategies in the field in order to minimize dengue outbreaks.

Methods

Mosquito strains

Two strains of *Ae. aegypti* were used in this study. The susceptible reference Bora-Bora strain, originating from Bora-Bora (French Polynesia) is free of any detectable insecticide resistance mechanism. An *Ae. aegypti* colony was established from wild field-caught mosquito larvae collected from individual houses in the community of Vauclin in Martinique (Vauclin strain). Larvae and adults obtained from the F1 progeny were used for bioassays, biochemical and molecular studies.

Insecticides and detoxification enzyme inhibitors

Two technical grade compounds were used, representing organophosphate and pyrethroid classes of insecticides, temephos (97.3%; Pestanal™, Riedel-de-Haën, Seelze, Germany) and deltamethrin (100%; AgreEvo, Herts, United Kingdom). In addition, three classical detoxification enzyme inhibitors were used for larval and adult bioassays; piperonyl butoxide (PBO; 5-((2-(2-butoxyethoxy)ethoxy) methyl)-6-propyl-1,3-benzodioxole; 90% Fluka, Buchs, Switzerland) an inhibitor of mixed-function oxidases, tribufos (DEF; S,S,S-tributyl phosphorotrithioate; 98.1% Interchim, Montluçon, France) an inhibitor of carboxylesterases and in a lesser extent of glutathione S-transferases (GSTs) and chlorfenethol (DMC; 1,1-bis (4-chlorophenyl) ethanol; 98% Pestanal™, Riedel-de-Haën, Seelze, Germany) a specific inhibitor of GSTs.

Larval bioassays

Larval bioassays were performed using a standard protocol described by the World Health Organization [58]. Bioassays were carried out using late third and early fourth-instar larvae of the Bora-Bora and Vauclin strains. For each bioassay, 20 larvae of each strain were transferred to cups containing 99 ml of distilled water. Five cups per concentration (100 larvae) and 5 to 8 concentrations of temephos diluted in ethanol leading to 0 to 100% mortality were used. For each concentration, 1 ml of temephos at the desired concentration was added to the cups. Control treatments of 1 ml of ethanol were performed for each test. Temperature was maintained at 27°C ± 2°C all over the duration of bioassays, and larval mortality was recorded 24 h after exposure. Three replicates with larvae from different rearing batches were made at different times and the results were pooled for analysis. Larvae were then exposed to the insecticide plus each enzyme inhibitor for 24 h. Dose of enzyme inhibitors were determined according to preliminary bioassays showing that the sub-lethal concentrations of inhibitors were 1 mg/L, 1 mg/L and 0.008 mg/L for PBO, DMC and DEF respectively.

Topical applications

The intrinsic activity of deltamethrin against adult mosquitoes was measured using forced contact tests to avoid any side effects linked to the insect behavior as recommended by the World Health Organization [59]. A volume of 0.1 μL of insecticide solution in acetone was dropped with a micro-capillary onto the upper part of the pronotum of each adult mosquito that was briefly anaesthetized with CO_2 and maintained on a cold table. Doses were expressed in nanograms of active ingredient per mg of mosquito body weight. A total of 50 individuals (non blood fed females, 2 - 5 days old) were used per insecticide dose and for controls, with at least five doses leading to 0 to 100% mortality. Each test was replicated twice ($n = 100$ per dose) using different batches of insects and insecticide solutions. After treatment, mosquitoes were maintained at $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ and $80\% \pm 10\%$ relative humidity in plastic cups with honey solution provided. Mortality was recorded after 24 h. To assess the effect of detoxification enzyme inhibitors, each adult female was exposed to sub lethal doses of PBO (1000 ng/female), DEF (300 ng/female) and DMC (500 ng/female) 1 h prior to deltamethrin topical application following the same protocol described above.

Mortality data analysis

Larval and adult mortality levels were corrected by the formula of Abbott [60] in case of control mortality $> 5\%$, and data were analysed by the log-probit method of Finney [61] using the Probit software of Raymond *et al.* [62]. This software uses the iterative method of maximum likelihood to fit a regression between the log of insecticide concentration and the probit of mortality. The goodness of fit is estimated by a weighted χ^2 . It also estimates the slope of the regression lines and the lethal concentrations (LC_{50} and LC_{95} for larvae) or dosages (LD_{50} and LD_{95} for adults) with their 95% confidence intervals. Bora-Bora and Vaulin strains were considered as having different susceptibility to a given pesticide when the ratio between their $\text{LC}_{50/95}$ or $\text{LD}_{50/95}$ (resistance ratio: $\text{RR}_{50/95}$) had confidence limits excluding the value of 1. A mosquito strain is considered susceptible when its value of RR_{50} is less than 5, moderately resistant when RR_{50} is between 5 and 10, and highly resistant when RR_{50} is over 10. For detoxification enzyme inhibitors, synergism ratio's (SR_{50} and SR_{95}) were obtained by calculating the ratio between the LC_{50} (or LD_{50}) and LC_{95} (or LD_{95}) of each insecticide with and without each enzyme inhibitor. A SR significantly higher than 1 indicated a significant effect of enzyme inhibitor and synergist effects were considered different between the two strains when their confidence interval (CI) were not overlapping.

Detoxification enzyme activities

P450 monooxygenase activities were comparatively evaluated between susceptible and resistant strains in both larvae and adults by measuring the 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) activity on microsomal fractions based on the microfluorimetric method of De Sousa *et al.* [63]. One gram fresh 4th stage larvae or 3 days-old adults (50% males and 50% females) were homogenised in 12 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 5 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.8 mM PMSF. The homogenate was centrifuged at 10000 g for 20 min at 4°C and the resulting supernatant was ultracentrifuged at 100000 g for 1 h at 4°C . The microsomal fraction was then resuspended in 0.05 M phosphate buffer and the microsomal protein content was determined by the Bradford method. Twenty μg microsomal proteins were added to 0.05 M phosphate buffer (pH = 7.2) containing 0.4 mM 7-ethoxycoumarin (7-Ec, Fluka) and 0.1 mM NADPH for a total reaction volume of 100 μL and incubated at 30°C . After 15 min, the reaction was stopped and the production of 7-hydroxycoumarin (7-OH) by P450 monooxygenases was evaluated by measuring the fluorescence of each well (380 nm excitation, 460 nm emission) with a Fluoroskan Ascent spectrofluorimeter (Labsystems, Helsinki, Finland) in comparison with a scale of 7-OH (Sigma). P450 activities were expressed as mean pmoles of 7-OH per mg of microsomal protein per min \pm SE. Statistical comparison of P450 activities between the two strains was performed by using a Mann and Whitney test ($N = 15$).

Glutathione S-transferase activities were comparatively measured on 200 μg of cytosolic proteins from the 100000 g supernatant (see above) with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma) as substrate [64]. Reaction mixture contained 2.5 mL of 0.1 M phosphate buffer, 1.5 μM reduced glutathione (Sigma), 1.5 μM CDNB and 200 μg proteins. The absorbance of the reaction was measured after 1 min at 340 nm with a UVIKON 930 spectrophotometer. Results were expressed as mean nmoles of conjugated CDNB per mg of protein per min \pm SE. Statistical comparison of GST activities between the two strains was performed by using a Mann and Whitney test ($N = 15$).

Carboxylesterases activities were comparatively measured on 30 μg of cytosolic proteins from the 100000 g supernatant (see above) according to the method described by Van Asperen *et al.* [65] with α -naphthylacetate and β -naphthylacetate used as substrates (α -NA and β -NA, Sigma). Thirty μg cytosolic proteins were added to 0.025 mM phosphate buffer (pH 6.5) with 0.5 mM of α -NA or β -NA for a total volume reaction of 180 μL and incubated at 30°C . After 15 min, reaction was stopped by the addition of 20 μL 10 mM Fast Garnett (Sigma) and 0.1 M sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma). The production of α - or β -naphthol was measured at 550 nm with a $\Sigma 960$

microplate reader (Metertech, Taipei, Taiwan) in comparison with a scale of α -naphthol or β -naphthol and expressed as mean μ moles of α - or β -naphthol per mg of cytosolic protein per min \pm SE. Statistical comparison of esterase activities between the two strains was performed by using a Mann and Whitney test (N = 30).

Kdr genotyping

Genomic DNA was extracted from whole adult mosquitoes of the Bora-Bora and Vauclin strains by grinding tissues with a sterile micro-pestle in DNA extraction buffer (0.1 M Tris HCl pH 8.0, 0.01 M EDTA, 1.4 M NaCl, 2% cetyltrimethyl ammonium bromide). The mixture was incubated at 65°C for five min. Total DNA was extracted with chloroform, precipitated in isopropanol, washed in 70% ethanol, and resuspended in sterile water. The *kdr* genomic region was amplified by PCR using Dip3 (5'-ATCATCTTCATCTTGC-3') and Dip2A (5'-TTGTTGGT-GTCGTTGTCGGCCGTCGG-3') primers. PCR steps included an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 45 cycles at 95°C for 30 s, 48°C for 30 s, and 72°C for 45 s, and a final extension step at 72°C for six min. PCR products were gel-purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) before sequencing on an ABI Prism 3130 XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) using the same primers.

Microarray screening of differentially transcribed detoxification genes

The *Aedes detox chip* DNA-microarray, initially developed by Strode *et al.* [20] and recently updated with additional genes, was used to monitor changes in the transcription of detoxification genes between the Vauclin and the Bora-Bora strains in 4th-stage larvae and 3 days-old adults. This microarray contains 318 probes representing 290 detoxification genes including all cytochrome P450 monooxygenases (P450s), glutathione S-transferases (GSTs), carboxy/cholinesterases (CCEs) and additional enzymes potentially involved in response to oxidative stress from the mosquito *Ae. aegypti*. Each probe, plus 6 housekeeping genes and 23 artificial control genes (Universal Lucidea Scorecard, G.E. Health Care, Bucks, UK) were spotted 4 times at different positions on each array.

RNA extractions, cRNA synthesis and labeling reactions were performed independently for each biological replicate. Total RNA was extracted from batches of 30 4th-stage larvae or 30 3 days-old adults (15 males and 15 females) using the PicoPure™ RNA isolation kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed by digesting total RNA samples with DNase I by using the RNase-free DNase Set (Qiagen). Total RNA quantity and quality were assessed by spectrophotometry using a Nanodrop ND1000 (LabTech, France) and by using a Bioana-

lyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Messenger RNAs were amplified using the RiboAmp™ RNA amplification kit (Molecular Devices) according to manufacturer's instructions. Amplified RNAs were checked for quantity and quality by spectrophotometry and Bioanalyzer. For each hybridisation, 8 μ g of amplified RNAs were reverse transcribed into labelled cDNA and hybridised to the array as previously described by David *et al.* [19]. For each life-stage, 3 pairwise comparisons of Vauclin strain versus Bora-Bora strain were performed with different biological samples. For each biological replicate, 2 hybridizations were performed in which the Cy3 and Cy5 labels were swapped between samples for a total of 6 hybridisations per comparison in each life-stage.

Spot finding, signal quantification and spot superimposition for both dye channels were performed using Genepix 5.1 software (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). For each data set, any spot satisfying one of the following conditions for any channel was removed from the analysis: (i) intensity values less than 300 or more than 65000, (ii) signal to noise ratio less than 3, (iii) less than 60% of pixel intensity superior to the median of the local background \pm 2 SD. Data files were then loaded into Genespring 7.2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA) for normalization and statistic analysis. For each array, the spot replicates of each gene were merged and expressed as median ratios \pm SD. Data from dye swap experiments were then reversed and ratios were log transformed. Ratio values below 0.01 were set to 0.01. Data were then normalized using the local intensity-dependent algorithm *Lowess* [66] with 20% of data used for smoothing. For each comparison, only genes detected in at least 50% of all hybridizations were used for further statistical analysis. Mean transcription ratios were then submitted to a one-sample Student's t-test against the baseline value of 1 (equal gene transcription in both samples). Genes showing a transcription ratio > 1.5-fold in either direction and a t-test P value lower than 0.01 after Benjamini and Hochberg multiple testing correction [67] were considered significantly differentially transcribed between the two strains.

Real-time quantitative RT-PCR validation

Transcription profiles of 10 detoxification genes in 4th-stage larvae and adults were validated by reverse transcription followed by real-time quantitative RT-PCR on the same RNA samples used for microarray experiments. Four μ g total RNAs were treated with DNase I (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with superscript III (Invitrogen) and oligo-dT₂₀ primer for 60 min at 50°C according to manufacturer's instructions. Resulting cDNAs were diluted 125 times for PCR reactions. Real-time quantitative PCR reactions of 25 μ L were performed in triplicate on an iQ5 system (BioRad) using iQ SYBR Green super-

mix (BioRad), 0.3 μ M of each primer and 5 μ L of diluted cDNAs according to manufacturer's instructions. For each gene analysed, a cDNA dilution scale from 5 to 50000 times was performed in order to assess efficiency of PCR. Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method taking into account PCR efficiency [68] and using the genes encoding the ribosomal protein L8 [GenBank [DQ440262](#)] and the ribosomal protein S7 [GenBank [EAT38624.1](#)] for a dual gene normalisation. For each life-stage, results were expressed as mean transcription ratios (\pm SE) between the insecticide-resistant strain Vauclin and the susceptible strain Bora-Bora. Only genes showing more than 2-fold over- or under-transcription in the Vauclin strain were considered significantly differentially expressed.

Availability

Data Deposition:

The description of the microarray '*Aedes Detox Chip*' can be accessed at ArrayExpress <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress> acc. No. A-MEXP-623.

All experimental microarray data can be accessed at <http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/>.

Authors' contributions

SM participated in toxicological and biochemical studies together with microarray screening and *kdr* genotyping and helped to draft the manuscript. RP participated in biochemical studies, microarray screening and RT-qPCR. FD participated in toxicological studies. SR participated in RT-qPCR and helped to draft the manuscript. JB participated in toxicological studies. CS participated in microarray study. CB participated in *kdr* genotyping and sequencing. AY coordinated field mosquito collection in Martinique and helped to draft the manuscript. HR helped to draft the manuscript and coordinated the microarrays studies. VC conceived of the study and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. JPD participated in the design of the study and its coordination, performed microarray data analysis and conceived the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Microarray transcription data. This table contains all transcription data obtained from microarray analysis between the insecticide-resistant strain Vauclin and the susceptible strain Bora-Bora. Transcription ratios (Vauclin/Bora-Bora) and their associated corrected t-test P values are indicated for each gene in 4th-stage larvae and 3-days old adults.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-494-S1.XLS>]

Acknowledgements

The present research project was funded by the French Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the French Agency for Environmental Health and Safety (grant AFSSET N° 13-12-2007 to VC) and the Laboratory of Alpine Ecology of Grenoble (French National Research Agency grant ANR MOSQUITO-ENV N° 07SEST014 to JPD and SR). We thank Manuel Etienne and Said Crico for help on mosquito collection in Martinique. We thank Prof. A. Cossins, Dr. M. Hughes and the Liverpool Microarray User Community for microarray printing. We thank Dr. B. MacCallum and Vectorbase community for valuable help with microarray data deposition. We are grateful to Prof. P. Ravel for useful comments on the manuscript and J. Patouraux for technical help.

References

1. WHO: **Report of the Scientific Working Group on dengue.** Document WHO/TDR/SWG/08 Geneva, Switzerland, World Health Organization; 2006.
2. Yaicharoen R, Kiatfuengfoo R, Chaeroviriyaphap T, Rongnoparut P: **Characterization of deltamethrin, resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand.** *J Vect Ecol* 2005, **30(1)**:144-150.
3. Ponlawat A, Scott JG, Harrington LC: **Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand.** *J Med Entomol* 2005, **42(5)**:821-825.
4. Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharapit S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, Yoksan S: **Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005.** *J Econ Entomol* 2007, **100(2)**:545-550.
5. Jirakanjanakit N, Saengtharapit S, Rongnoparut P, Duchon S, Bellec C, Yoksan S: **Trend of Temephos resistance in *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes in Thailand during 2003-2005.** *Environ Entomol* 2007, **36(3)**:506-511.
6. Rodriguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F: **Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection.** *J Am Mosq Control Assoc* 2005, **21(4)**:437-445.
7. Rawlins SC, Martinez R, Wiltshire S, Legall G: **A comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad.** *J Am Mosq Control Assoc* 1998, **14(2)**:131-136.
8. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H: **The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes.** *Insect Biochem Mol Biol* 2004, **34(7)**:653-665.
9. Hemingway J, Field L, Vontas J: **An overview of insecticide resistance.** *Science* 2002, **298(5591)**:96-97.
10. Feyereisen R: **Insect cytochrome P450.** In *Comprehensive Molecular Insect Science* Edited by: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S. Elsevier; Oxford; 2005:1-77.
11. Ranson H, Hemingway J: **Mosquito glutathione transferases.** *Methods Enzymol* 2005, **401**:226-241.
12. Hemingway J, Karunaratne SH: **Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism.** *Med Vet Entomol* 1998, **12(1)**:1-12.

13. Despres L, David JP, Gallet C: **The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals.** *Trends Ecol Evol* 2007, **22(6)**:298-307.
14. Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP: **Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38(5)**:540-551.
15. Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, David JP: **Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics.** *Aquat Toxicol* 2009, **93(1)**:61-69.
16. Djouaka RF, Bakare AA, Bankole HS, Doannio JMC, Coulibaly ON, Kossou H, Tamo M, Basene HI, Popoola OK, Akogbeto MC: **Does the spillage of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance?** *Malar J* 2007, **6**:159.
17. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, et al.: **The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.** *Science* 2002, **298(5591)**:129-149.
18. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi ZY, Megy K, Grabherr M, et al.: **Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector.** *Science* 2007, **316(5832)**:1718-1723.
19. David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H: **The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:4080-4084.
20. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne S, Hemingway J, Black WC, et al.: **Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38(1)**:113-123.
21. Muller P, Donnelly MJ, Ranson H: **Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana.** *BMC Genomics* 2007, **8**:36.
22. Muller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, et al.: **Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids.** *PLoS Genetics* 2008, **4(11)**.
23. Vontas J, Blass C, Koutsos AC, David JP, Kafatos FC, Louis C, Hemingway J, Christophides GK, Ranson H: **Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure.** *Insect Mol Biol* 2005, **14(5)**:509-521.
24. Vontas J, David JP, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson H: **Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization.** *Insect Mol Biol* 2007, **16(3)**:315-324.
25. Rodriguez MM, Bisset J, De Fernandez DM, Lauzan L, Soca A: **Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela.** *J Med Entomol* 2001, **38(5)**:623-628.
26. Rodriguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A: **Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba.** *J Med Entomol* 2002, **39(6)**:882-888.
27. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J: **Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene.** *Med Vet Entomol* 2003, **17(1)**:87-94.
28. Macoris MD, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE: **Resistance of *Aedes aegypti* from the State of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides.** *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 2003, **98(5)**:703-708.
29. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, et al.: **A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*.** *Insect Mol Biol* 2007, **16(6)**:785-798.
30. Marcombe S, Carron A, Darriet F, Etienne M, Agnew P, Tolosa M, Yp-Tcha MM, Lagneau C, Yébakima A, Corbel V: **Reduced Efficacy of Pyrethroid Space Sprays for Dengue Control in an Area of Martinique with Pyrethroid Resistance.** *Am J Tropical Med Hyg* 2009, **80(5)**:745-751.
31. Wirth MC, Georghiou GP: **Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes Aegypti* from Tortola. British Virgin Islands.** *J Am Mosq Control Assoc* 1999, **15(3)**:315-320.
32. Brogdon WG, McAllister JC: **Insecticide resistance and vector control.** *Emerg Infectious Diseases* 1998, **4(4)**:605-613.
33. Vontas JG, Small GJ, Hemingway J: **Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*.** *Biochem J* 2001, **357(Pt 1)**:65-72.
34. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J: **Insect glutathione transferases and insecticide resistance.** *Insect Mol Biol* 2005, **14(1)**:3-8.
35. Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H: **Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2005, **35(8)**:861-871.
36. Rajatileka S, Black WC, Saavedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, Ranson H: **Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*.** *Acta Trop* 2008, **108(1)**:54-57.
37. Donnelly MJ, Corbel V, Weetman D, Wilding CS, Williamson MS, Black Wt: **Does *kdr* genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes?** *Trends Parasitol* 2009, **25(5)**:213-219.
38. Anthony N, Rocheleau T, Mocelin G, Lee HJ, Ffrench-Constant R: **Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow-fever mosquito *Aedes aegypti*.** *FEBS Letters* 1995, **368(3)**:461-465.
39. Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A, Weill M: **A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase I confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37(1)**:41-47.
40. Bourguet D, Capela R, Raymond M: **An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Portugal.** *J Econ Entomol* 1996, **89(5)**:1060-1066.
41. Paul A, Harrington LC, Scott JG: **Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** *J Med Entomol* 2006, **43(1)**:55-60.
42. Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, Sealfon SC: **Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30(10)**:e48.
43. Nikou D, Ranson H, Hemingway J: **An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*.** *Gene* 2003, **318**:91-102.
44. McLaughlin LA, Niazi U, Bibby J, David JP, Vontas J, Hemingway J, Ranson H, Sutcliffe MJ, Paine MJ: **Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2.** *Insect Mol Biol* 2008, **17(2)**:125-135.
45. Chiu TL, Wen ZM, Rupasinghe SG, Schuler MA: **Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105(26)**:8855-8860.
46. Müller P, Chouaibou M, Pignatelli P, Etang J, Walker ED, Donnelly MJ, Simard F, Ranson H: **Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon.** *Mol Ecol* 2008, **17(4)**:1145-1155.
47. Ding Y, Hawkes N, Meredith J, Eggleston P, Hemingway J, Ranson H: **Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress.** *Biochem J* 2005, **387(Pt 3)**:879-888.
48. Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J: **Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*.** *Biochem J* 2003, **373(Pt 3)**:957-963.
49. Wei SH, Clark AG, Syvanen M: **Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2001, **31(12)**:1145-1153.
50. Vaughan A, Hemingway J: **Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mos-**

- quito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem* 1995, **270**(28):17044-17049.
51. Mourya DT, Hemingway J, Leake CJ: **Changes in enzymes titers with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance.** *Med Vet Entomol* 1993, **7**:11-16.
 52. Bisset JA, Rodriguez MM, Hemingway J, Diaz C, Small GJ, Ortiz E: **Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms.** *Med Vet Entomol* 1991, **5**(2):223-228.
 53. Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N: **An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*.** *Royal-Society Discussion Meeting on Insecticide Resistance - from Mechanisms to Management: Apr 08-09 1998; London, England* 1998:1707-1711.
 54. Boyer S, David JP, Rey D, Lemperiere G, Ravanel P: **Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities.** *Environ Toxicol Chem* 2006, **25**(2):470-476.
 55. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ, et al.: **The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**(6):617-622.
 56. Bocquene G, Franco A: **Pesticide contamination of the coastline of Martinique.** *Marine Poll Bull* 2005, **51**(5-7):612-619.
 57. Hardstone MC, Leichter CA, Scott JG: **Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monoxygenase detoxification, in mosquitoes.** *J Evol Biol* 2009, **22**(2):416-423.
 58. WHO: **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.** Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13, Geneva, Switzerland, World Health Organization; 2005.
 59. WHO: **Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets.** Document WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/3, Geneva, Switzerland, World Health Organization; 2006.
 60. Abbott W: **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** *J Econ Entomol* 1925, **18**:265-267.
 61. Finney DJ: **Probit analysis.** Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
 62. Raymond M: **PROBIT software.** CNRS UMII, Licence L93019 Avenir, France 1993.
 63. De Sousa G, Cuany A, Brun A, Amichot M, Rhamani R, Bergé JB: **A microfluorimetric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individuals *Drosophila melanogaster* abdomens: Interest for screening resistance in insect populations.** *An Biochem* 1995, **229**:86-91.
 64. Habig H, Pabst MJ, Jacoby WB: **Gluthatione S-transferases: The first step in mercapturic acid formation.** *J Biol Chem* 1974, **249**:7130.
 65. Van Asperen K: **A study of housefly esterases by means of sensitive colorimetric methode.** *J Insect Physiol* 1962, **8**:401-408.
 66. Cleveland WS, Devlin SJ: **Locally Weighted Regression - An approach to regression-Analysis by local fitting.** *J Am Stat Assoc* 1988, **83**(403):596-610.
 67. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *J Royal Stat Soc B* 1995, **57**:289-300.
 68. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucl Acids Res* 2001, **29**(9):6.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Publication VII

Running title

Insecticide resistance in *Aedes aegypti*

Title

Insecticide Resistance in the Dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique (French West Indies): Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors.

Authors

Sébastien Marcombe¹, Romain Blanc Mathieu², Nicolas Pocquet¹, Muhammad-Asam Riaz², Rodolphe Poupardin², Serge Sélior³, Frédéric Darriet¹, Stéphane Reynaud², André Yébakima³, Vincent Corbel⁴, Jean-Philippe David² and Fabrice Chandre¹

Addresses

¹ Institut de Recherche pour le Développement, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France. Phone : +33 (0)4 67 04 32 21, Fax : +33 (0)4 67 54 20 44.

E-mail: sebastien.marcombe@ird.fr, frederic.darriet@ird.fr, fabrice.chandre@ird.fr

² Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR 5553 CNRS-Université de Grenoble, Equipe Perturbations Environnementales et Xénobiotiques, Domaine Universitaire de Saint-Martin d'Hères. 2233, rue de la piscine Bât D Biologie, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France. Phone: +33 (0)4 76 51 44 59, Fax: +33 (0)4 76 51 44 63.

E-mail : romain.blanc-mathieu@live.fr, rodolphe.poupardin@e.ujf-grenoble.fr, muhammad-asam.riaz@e.ujf-grenoble.fr, stephane.reynaud@ujf-grenoble.fr, jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

³ Centre de la démoustication, BP 679 Avenue Pasteur, 97200 Fort de France, Martinique. Phone : +33 (0)5 96 59 85 44, Fax: +33 (0)5 96 70 26 46.

E-mail: selior@cg972.fr, Yebakima@cg972.fr

⁴ Institut de Recherche pour le Développement, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 01 BP 4414 RP, Cotonou, Benin. Phone : (229) 21 05 41 41, Fax: (229) 21 37 49 81.

E-mail: vincent.corbel@ird.fr

Corresponding authors

Sébastien Marcombe, sebastien.marcombe@ird.fr, Fabrice Chandre, fabrice.chandre@ird.fr

Abstract

Dengue is a serious public health problem in Martinique Island (French West Indies). Vector control by the use of insecticides is largely implemented to reduce the virus transmission by *Aedes aegypti*. Unfortunately insecticide resistance has already been observed on the Island and recently showed to significantly reduce the efficacy of vector control interventions. In this study we investigated the distribution of resistance and the underlying mechanisms in 9 *Ae. aegypti* populations. Statistical multifactorial approach was used to investigate the correlations between insecticide resistance levels, associated mechanisms and environmental factors characterizing the mosquito populations. Bioassays revealed high levels of resistance to temephos and deltamethrin and susceptibility to Bti in the 9 populations tested. Biochemical assays showed elevated detoxification enzyme activities of monooxygenases, carboxylesterases and glutathione S-transferases in most of the populations. Molecular screening for common insecticide target-site mutations, revealed the presence of the “knock-down resistance” V1016I *kdr* mutation at high frequency (>87%). Real time quantitative RT-PCR showed the potential involvement of several candidate detoxification genes in insecticide resistance. Principal Component Analysis (PCA) performed with variables characterizing *Ae. aegypti* from Martinique permitted to underline potential links existing between resistance distribution and other variables such as agriculture practices, vector control interventions and urbanization. Insecticide resistance is widespread but not homogeneously distributed across Martinique. The influence of environmental and operational factors on the evolution of the resistance and mechanisms are discussed. These results provide valuable information for vector control management.

Key words:

Aedes aegypti, Martinique, Dengue, Insecticide Resistance, Detoxification enzymes, Vector Control.

1. Introduction

Dengue fever is a major public health problem in Martinique Island (French-West-Indies) and occurs in an endemo-epidemic pattern (San Martin et al. 2010). The last decade saw a dramatic resurgence of the virus with 5 major dengue outbreaks and more than 111,000 reported cases (INVS 2010). As there is still no specific treatment and efficient vaccine available, vector control against *Aedes aegypti* remains the main solution to prevent dengue transmission. Environmental management, educational programs and mechanic elimination of the breeding habitats are continuously implemented but currently, the use of chemical and biological agents are the main methods for reducing the incidence of the disease.

Unfortunately vector control programs are facing operational challenges with the emergence and development of insecticide resistance in dengue vectors, especially *Ae. aegypti* (Ranson et al. 2010). In Martinique, resistance to organophosphates (OP) and pyrethroids (PYR) has been reported since the 1980s and 1990s respectively (Rosine 1999; Yébakima 1991), but recent findings showed that this resistance can strongly reduce the efficacy of vector control interventions (Marcombe et al. 2009a). A molecular study conducted by (Marcombe et al. 2009b) showed the involvement of both metabolic and target site based resistance mechanisms in a wild population of Martinique (Vauclin) strongly resistant to OPs and PYRs. Biochemical assays revealed significant elevated activities of cytochrome P450 monooxygenases (P450s), glutathione S-transferases (GSTs) and carboxy/cholinesterases (CCEs) at both larval and adult stages. Microarray and quantitative RT-qPCR experiments showed a significant constitutive over-transcription of multiple detoxification genes at both larval and adult stages. Sequencing of the voltage-gated sodium channel showed high allelic frequency (71%) of the “knockdown resistance” (Kdr) mutation (V1016I) in this Martinique population which confers resistance to DDT and PYRs (Bregues et al. 2003; Saavedra-Rodriguez et al. 2007).

The massive use of different insecticides families for vector control since the 1950s has probably contributed to select for insecticide resistance in mosquitoes (Brown 1986). In Martinique island, the OP temephos (Abate®) was used for decades for larval control (abandoned in 2009 to respect the recent European biocide legislation, 1998) and now *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti, Vectobac®) is the only insecticide used for such application. Space spraying treatments with vehicle-mounted or portable thermal fogger (aerial or inside pulverization, respectively) are implemented during inter-epidemic periods (i.e. when high entomological indices are reported) and during outbreaks to rapidly kill infected adult mosquitoes (Corriveau et al. 2003). DDT and several OPs (e.g., malathion, fenitrothion) were used since the 1950s but there was a switch to PYRs in the early 1990s (Yébakima, 1991) because of their rapid knockdown action and low mammalian toxicity (WHO 2006c). Currently deltamethrin (K-Othrine 15/5®) and to a lesser extend synergized natural pyrethrins (AquaPy®) are used for the control of adult mosquitoes. In addition, Martinique is an island with intensive agriculture practice (mainly sugar cane and bananas) where huge amount of pesticides have been applied for crop protection. Pesticides used in agriculture include organochlorines (OCs), OPs and carbamates. Recently, Bocquené and Franco (2005) reported the widespread contamination of rivers and soils in Martinique with pesticides and particularly with high levels of the OCs chlordecone and lindane. The constant exposure of the mosquito populations to these pesticides associated with the increasing urbanization may have led to the selection of particular detoxification genes and to an increased tolerance to pesticides (David et al. 2010; Djouaka et al. 2008; Poupardin et al. 2008; Riaz et al. 2009).

In this study we investigated the insecticide resistance level and the associated molecular mechanisms in 9 *Ae. aegypti* populations collected in several ecological settings in Martinique island. A statistical multifactorial approach was adopted to investigate the possible

relationship between resistance levels, associated mechanisms and environmental factors such as agriculture, pollution and urbanization in Martinique populations.

2. Material and methods

2.1. Mosquito strains and populations

Two laboratory strains originating from French Polynesia (Bora-Bora) and Benin (SBE) and nine field-caught populations were used in the study. The 2 laboratory strains are susceptible to all insecticides and have been used as reference strains for resistance assays and as outgroups in order to gain comparative power and compensate for genetic diversity for gene expression analyses. *Ae. aegypti* was collected from individual houses as larvae or pupae in 9 localities of Martinique in February 2009 (Figure 1). Populations were constituted from between 10 and 20 larval collection sites that were domestic breeding habitats. Mosquitoes from the same locality were pooled at the laboratory and larvae and adults obtained from the F1 progeny were used for bioassays, biochemical and molecular studies. The populations chosen covered most of the island ecotypes (coastal, mountainous, rural, urban). We also sampled populations from various mosquito habitats (urban, near agriculture, heavily treated, less treated, etc...)

2.2. Larval and adult bioassays

Larval and adult bioassays were performed following WHO protocols (WHO 2005; WHO 2006a). Larval bioassays were carried out using the organophosphate temephos (97.3%; Pestanal[®] Sigma-Aldrich, Riedel-de Haën, Germany) and the formulation of Bti Vectobac[®] 12AS (1.2%, 1200 ITU/mg). Bioassays were performed using late third and early fourth-instar larvae of each population. Four replicates per concentration and 5 to 8

concentrations in the activity range of each insecticide were used ($n = 100$). Larval mortality was recorded after 24h of insecticide exposure.

Adult female mosquitoes of each population were used for the tarsal contact with treated filter papers in comparison with the Bora-Bora strain as described in Marcombe et al. (2009a). Tests were run using filter papers treated with deltamethrin (0.05%) (100% [w/w]; AgrEVO, Herts, United Kingdom). Five batches of 20 non-blood fed females (2-5 days old; $n = 100$) were exposed to the insecticide during 60 minutes to estimate the knockdown effect (KD) of deltamethrin on each strain. Mortality was recorded 24 hours after the contact.

Larval and adult mortality levels were corrected by the Abbott's formula (Abbott 1925) in case of control mortality $> 5\%$, and mortality data were analysed by the log-probit method of Finney (Finney 1971) using the Probit software of Raymond et al. (1995). Lethal concentrations (LC_{50} and LC_{95} for larvae) and knock-down time (KDT_{50} and KDT_{95} for adults) were calculated together with their 95% confidence intervals (95% CI). Adult mortality after 24h exposure to deltamethrin was also recorded for each population. Populations from Martinique were considered as having different susceptibility to a given pesticide compared to the susceptible Bora-Bora strain when the ratio between their $LC_{50/95}$ or $KDT_{50/95}$ (resistance ratio: $RR_{50/95}$) had confidence limits excluding the value of 1.

2.3. Biochemical assays

P450 monooxygenases (P450s) level, carboxy/cholineesterases (CCEs) activities and Glutathione S-transferases (GSTs) activities were assayed from single 3 days-old F1 females ($n = 47$) according to the microplate methods described by Hemingway (WHO 1998) and Brogdon (1997). Total protein quantification of each mosquito homogenates was performed using the Bio-Rad protein reagent kit with bovine serum albumin as the standard protein (Bradford, 1976) in order to normalize enzyme activity levels by protein content. Statistical

comparisons of detoxification enzyme levels between the susceptible strain Bora-Bora and other populations were assessed by using Mann Whitney's tests with Statistica software using a P value threshold of 0.05.

2.4. Kdr genotyping

Total DNA of single female mosquitoes of each strain and Martinique populations (n = 32) was extracted using a CTAB protocol (Rogers and Bendich, 1988). The region of the gene encoding the sodium channel where most kdr mutations have been described (Bregues et al. 2003; Rajatileka et al. 2008; Soderlund and Knipple 2003) was amplified by PCR using Aed3 (5' ACTACATCGAGAATGTGGATCG 3') and Aed2A (5' TTGTTGGTGTTCGTTGTCGGCCGTCGG 3') primers. This region covers exons 21 and 22 of the sodium channel gene allowing to detect the following Kdr mutations: I1011M, I1011V, V1016I and V1016G. After purification of the PCR products using the AMPure kit (Agencourt, Beverly, MA, USA), the BigDye terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) was used with the same primers for sequencing. Sequence reactions were purified using the CleanSEQ kit (Agencourt) and were then sequenced on an ABI Prism 3130xl analyzer (Applied Biosystems). The SeqScape software was used for sequence analysis. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the exact probability test (Rousset and Raymond 1997).

2.5. Enzymatic phenotyping of Ache1

The phenotypes of the acetylcholine esterase AChE1, encoded by the ace-1 gene, were investigated in each population (n = 24) using the previously described TDP test (Alout et al. 2009) adapted for *Ae. aegypti* with dichlorvos and propoxur concentrations of $3 \cdot 10^{-4}$ M and

4.10⁻⁴M respectively. The TDP test allows to discriminate all possible phenotypes containing the G119S, F290V and wild-type (susceptible) alleles.

2.6. Constitutive transcription level of candidate detoxification genes

Transcription levels of 6 P450s (CYP genes), 2 P450-cofactors, the cytochrome-P450-reductase (CPR gene) and the cytochrome b5 (CytB5 gene), 1 CCE (CCEae3A) and 3 GSTs genes were measured by real-time quantitative RT-qPCR in larvae and adult females of the 2 susceptible strains and the 9 field-caught populations. These genes were chosen because of their putative involvement in metabolic resistance to chemical insecticides (David et al. 2010; Lumjuan et al. 2005; Marcombe et al. 2009b; Poupardin et al. 2008; Strode et al. 2008). Different batches of eggs from each strain/population were used to obtain 3 biological replicates of F1 individuals grown in standard insectary conditions. For each biological replicate, thirty 4th stage larvae or thirty 4-6 days-old adult females were collected alive for RNA extraction using Trizol (Invitrogene). RNA extractions, reverse transcriptions and quantitative PCR analyses were performed as described in Marcombe et al (2009b). Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method taking into account PCR efficiency and using the genes encoding the ribosomal protein L8 (AeRPL8, GenBank accession number DQ440262) and R7 (AeRPS7 GenBank accession number EAT38624.1) for normalization. Results were expressed as mean transcription ratios (\pm SE) between larvae or adults of the different populations and the susceptible Bora-Bora strain. A gene was considered as constitutively overtranscribed in Martinique populations when its transcription level was at least 2-fold greater than in the susceptible strains.

2.7. Relationship between insecticide resistance, transcription level of candidate genes and environmental factors

Potential relationship between insecticide resistance levels, gene transcription levels, Kdr mutation frequency and environmental factors characterizing each population were investigated through principal component analysis (PCA) across the 9 population of Martinique populations. Only candidate genes found over-transcribed in at least one population at any life stage were considered. The variables used and their respective 'names' were as follow: mean gene transcription ratio versus Bora-Bora strain ('Gene_Lv' for larvae or 'Gene_Ad' for adults), larval resistance to temephos ('RR₅₀ tem'), adult resistance to deltamethrin knock down effect ('RR₅₀ delta'), % adult surviving 24h after deltamethrin exposure ('Alive 24h delta'), kdr mutation frequency ('V1016I'), insecticide pressure, agriculture and urbanization. Insecticides pressure was represented by two variables obtained from data provided by the vector control unit of Martinique. The first variable ('Pulv') represents the number of outdoor deltamethrin pulverizations made routinely between 2006 and 2009 in each population area. The second variable ('Int') represents the number of specific interventions because of high entomological indices or dengue cases between 2006 and 2009, corresponding to larval treatment with Bti or temephos and deltamethrin pulverizations. The environment was described by five variables chosen for their putative role in the selection of insecticide resistance: sugar cane cultures ('Sug'), bananas cultures ('Ban'), other agricultural crops ('Agri'), organochlorine pollution ('OCPs Risk', mainly chlordecone and lindane as described in Bocquene and Franco, 2005) and urbanization ('Urb'). Each environmental variable is expressed as the percentage of land surface of interest present in a circle of 2.5 km beam around each sampled sites. This percentage was obtained by pixel measurement using the software MESURIM. PCAs were performed using R software (2008). As variables were not of the same scale, they were standardized (mean = 0 and standard deviation = 1) to avoid any distortion. Because no environmental variables were available for

the susceptible strains, PCA was only performed on data from the 9 Martinique populations (see supplementary table 1 for all variables used for PCA).

3. Results

3.1. Larval and adult bioassays

Bioassays showed that the 9 populations of Martinique were resistant to temephos and deltamethrin in comparison with the laboratory susceptible Bora-Bora strain and the susceptible strain SBE originating from Benin (Table1). For temephos, RR_{50} ranged from 13-fold (SJOS) to 36-fold (GMRN) and RR_{95} ranged from 26-fold (SJOS) to 153-fold (VCLN). WHO tube tests with 0.05% deltamethrin on adult mosquitoes showed resistance to knockdown effect with RR_{50} ranging from 3.71-fold for RSAL population to 6.71-fold for SAN population). Mortality after 24h deltamethrin exposure ranged from only 19 % for AJPB population to 90 % for the RSAL population while mortality in the susceptible strains reached 100%. For Bti, all Martinique populations showed low RRs comparatively to the susceptible Bora-Bora strain (maximum RR_{50} of 2.26-fold), indicating that all populations tested were mostly susceptible to Bti.

3.2. Detoxification enzyme levels

Detoxification enzyme levels were estimated for each population at the adult stage (Table 2). For all enzyme families, activities measured in the susceptible strain from Benin (SBE) were lower than in the susceptible Bora-Bora. P450s level were significantly higher than in the Bora-Bora strain (Mann-Whitney's test) in all Martinique populations except RSAL. In comparison with the Bora-Bora strain, α -CCEs activities were significantly higher for SJOS, VCLN and SAN populations while β -CCEs activity was only significantly higher in

the SAN population. GSTs activities were significantly elevated in AJPB, SPIER, VCLN, RSAL and SAN populations in comparison with Bora-Bora strain.

3.3. Kdr genotyping

Sequencing of the voltage-gated sodium channel gene from single mosquitoes revealed the presence of the Kdr mutation at position 1016 (GTA to ATA) leading to the replacement of a valine by an isoleucine (V1016I) at a high allelic frequency for all of Martinique populations ($f[R]$ ranged from 0.87 to 0.97, Table 3). All the populations were at Hardy-Weinberg equilibrium (Exact test, $P > 0.05$). No other Kdr resistant allele was detected in these populations. No Kdr mutation was found in the two susceptible strains Bora-Bora and SBE.

3.4. Enzymatic phenotyping of AChE1

All populations from Martinique showed similar percentages of AChE inhibition with dichlorvos and propoxur compared to the susceptible Bora-Bora strain excepted for RSAL and VCLN (only for dichlorvos for this latter). However the differences were not strong enough to suspect the presence of insensitive AChE in the populations tested (Table 4).

3.5. Constitutive transcription level of candidate detoxification genes

Transcription profiles of twelve candidate detoxification genes potentially involved in metabolic resistance to insecticides were compared between susceptible strains and Martinique populations at the larval and adult stages. Genes with transcription ratio over 2-fold were considered significantly over-transcribed. In larvae (Figure 2), the P450 genes CYP6Z6 and CYP6Z8 were both over-transcribed in 6 populations of Martinique (GRMN, SJOS, LAM, FDF, VCLN and SAN) compared to the susceptible strains Bora-Bora and SBE

(Figure 2A). The gene CYP6M11 was slightly over-transcribed in the GRMN population comparatively to susceptible strains. CYP9M9 was over-transcribed in SPIER, GRMN, LAM, FDF Martinique populations but also in the susceptible strain SBE. Among other genes (Figure 2B), the P450 co-factor CPR appeared slightly over-transcribed in the AJPB, SJOS, VCLN, RSAL and SAN populations compared to susceptible strains. The esterase gene CCEae3A was over-transcribed in all Martinique populations. Among GST genes, GSTE2 and GSTE7 were both over-transcribed in SPIER, GRMN, LAM and FDF populations with a higher over-transcription of GSTE2 (up to 7-fold).

In adults, 4 different P450 genes were found over-transcribed in Martinique populations (Figure 3A). Both CYP6Z6 and CYP6Z8 were over-transcribed in SPIER, LAM, RSAL, SAN and AJPB, GRMN, SJOS, LAM, FDF, VCLN respectively. CYP9J22 was over-transcribed in all Martinique populations except FDF while CYP9M9 was over-transcribed in AJPB, GRMN, SJOS, FDF and SAN. No significant differences of transcription level were observed for CYP6M6 and CYP6M11 compared to the susceptible strains. Among the two P450-cofactor genes, only CPR was found over-transcribed in the GRMN, SJOS, FDF, RSAL and SAN populations (Figure 3B). As in larvae, the CCEae3A gene was over-transcribed in all Martinique populations. Among GSTs, GSTE2 was found over-transcribed more than 2-fold in all Martinique populations whereas GSTE7 was over transcribed in four populations only (AJPB, GRMN, LAM and FDF).

3.6. Relationship between insecticide resistance, transcription levels of candidate genes and environmental factors

Principal Component Analysis (PCAs) was performed on all Martinique populations with 29 variables including insecticide resistance levels, larval and adult transcription ratios of candidate genes and environmental variables. Relations among variables across all Martinique

populations are presented in Figure 4 and detailed results are shown in supplementary table 2. The first three PCA axes resumed 63 % of the starting information with 24 %, 22 % and 17 % respectively. Larval resistance to temephos was mainly represented on the two first PCA axes and strongly positively correlated to sugar cane culture and larval over-transcription of CCEae3A, CYP6M11, CYP9M9. Larval resistance to temephos was negatively correlated to adult deltamethrin resistance. Adult deltamethrin resistance was mainly represented by the second PCA axis and positively correlated to urbanization, deltamethrin pulverization and the adult over-transcription of CYP9M9, GSTE7 but negatively correlated to agriculture, sugar cane culture and the adult over-transcription of CYP6Z6 and CCEae3A. Deltamethrin pulverization was positively correlated with Kdr mutation frequency. Variables related to agriculture were mainly represented by the second and third PCA axes and positively correlated together. Sugar cane culture and in a lesser extent other agriculture variables were positively correlated to temephos resistance but not to deltamethrin resistance. Finally, one should note that several groups of genes showed a strong correlation of their transcription levels across the three first PCA axes such as CYP6Z6, CYP6Z8, GSTE7 and GSTE2 in larvae; CCEae3A, CYP6M11 and CYP9M9 in larvae; CPR and CYP9J22 in larvae or CYP9M9 and GSTE7 in adults.

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate insecticide resistance level and mechanisms of 9 *Ae. aegypti* populations collected in Martinique (French West Indies) and the possible relationship between environmental factors and resistance.

Toxicological results showed that all *Ae. aegypti* populations of Martinique were resistant to the organophosphate temephos and the pyrethroid deltamethrin but mostly

susceptible to the bio-larvicide Bti . For Bti, although a slight resistance to Bti toxins could not be excluded (Paris et al. 2010b), the significant resistant ratios (RRs) measured for Martinique populations compared to the susceptible laboratory strain Bora-Bora may underline a different genetic background between field populations and laboratory strains. As Bti remains the main insecticide available for larval treatments, the low level of resistance even after many years of use is encouraging. This low resistance level is due to the association of the different Bti toxins that slows down the selection of resistance in natural populations (Tilquin et al. 2008). However, resistance to whole Bti mixture has been reported in *Culex pipiens* populations from New-York (Paul et al. 2005) and suspected in *Aedes rusticus* in France (Paris et al. 2010a). Furthermore, considerable resistance to individual Bti toxin has been obtained in laboratory after selecting *Ae. aegypti* larvae with field-collected leaf litter containing Bti toxins (Bonin et al. 2009; Paris et al. 2010a), indicating the necessity to regularly monitor the *Ae. aegypti* susceptibility to Bti in the Caribbean.

Among target-site mutations conferring resistance to chemical insecticides, only the V1016I Kdr mutation was found in Martinique populations, confirming the results previously obtained by Saavedra-Rodriguez et al. (2007) in South America and Caribbean. High frequency of the V1016I Kdr mutation was observed among the 9 populations, indicating that deltamethrin resistance is partly associated with target site mutation. Donnelly et al. (2009) pointed out a strong causal relationship between Kdr genotype and susceptibility to DDT and pyrethroids in many mosquito species, including *Ae. aegypti*. Saavedra-Rodriguez et al. (2008) showed the beneficial effect of the V1016I Kdr mutation regarding knock-down time, recovery and survival rate of *Ae. aegypti* adults exposed to pyrethroids. Our study revealed a wide range of survival rates after deltamethrin exposure (20% to 90%) while the V1016I Kdr mutation was almost fixed in all sampled populations ($f \geq 0.87$), suggesting that other resistance mechanisms are involved in Martinique. One should note that a novel mutation in

the sodium channel gene (mutation F1552C) linked to permethrin resistance has been recently found in *Ae. aegypti* in Thailand (Yanola et al. 2010) suggesting that other undiscovered target site mutations might also contribute to pyrethroid resistance.

Enzymatic phenotyping of AChE1 did not allow demonstrating the presence the G119S and F290V mutations in organophosphate resistance in Martinique. However, the RSAL population presented a slightly lower inhibition rates for dichlorvos and propoxur compared to other populations. The sequencing of the *Ace.1* gene in this population should confirm the absence of this mutation in Martinique. Unless other mutations are present elsewhere in this gene, our results showed that organophosphate resistance is mainly due to metabolic mechanisms. However, the monitoring of *Ace.1* resistant alleles in the Caribbean remains important since a recent study suggested the presence of insensitive AChE in a carbamate resistant *Ae. aegypti* population from Cuba (Bisset et al. 2006).

By quantitative trait loci (QTL) mapping, Saavedra-Rodriguez et al. (2008) also confirmed that genes coding for detoxification enzymes play a significant role in pyrethroid resistance in *Ae. aegypti*. Biochemical assays on adults showed that deltamethrin resistance seemed to be associated with higher P450 levels confirming previous results obtained by Marcombe et al. (2009b) on a single Martinique population. In the present study, the 9 populations tested showed significantly higher P450s activities except in the RSAL population which was also the less resistant to deltamethrin. Five populations also showed higher GST activities compared to the susceptible Bora-Bora strain. As observed by Rodriguez et al. in Cuba (2005), GST detoxification enzymes may be involved in deltamethrin resistance in Martinique, although no *Ae. aegypti* GST has yet been shown to metabolize pyrethroids or their metabolites. Four populations presented higher activities of α -CCEs (Table 2) which have been previously involved in organophosphate resistance (Hemingway et al. 2004). Elevated esterase activities were also observed by Marcombe et al.

(2009b) who showed higher activities of CCEs and in a lesser extent P450s in *Ae. aegypti* larvae from Martinique.

At the molecular level, metabolic resistance of Martinique populations through over-expression of detoxification enzymes was investigated by quantitative RT-PCR on 12 candidate genes. Our results showed that several candidate genes were over-transcribed in Martinique populations comparatively to the susceptible strains. Among them, CYP6Z6, CYP6Z8, GSTE7 and CPR seemed to be over-transcribed to a similar extent at both life stages, while others showed a more pronounced over-transcription in adults (CYP9J22 and CCEae3A) or larvae (GSTE2). Such life-stage specific over-transcription patterns suggest that particular enzymes might be more specifically involved in resistance to chemical insecticides during a particular life stage (Paul et al. 2006; Poupardin et al. 2010).

Over-transcription of genes encoding P450s has been frequently associated with metabolic-based insecticide resistance in insects (Feyereisen, 2006). In mosquitoes, the CYP6Z subfamily has been previously associated with response to pyrethroid, carbamate and organochlorine insecticides (Chiu et al. 2008; David et al. 2005; McLaughlin et al. 2008; Muller et al. 2007). In *Ae. aegypti*, CYP6Z9 has been found 4-fold over-transcribed in a permethrin-resistant strain collected in Northern Thailand (Strode et al. 2008) and CYP6Z8 was also identified as inducible by permethrin and other pollutants (Poupardin et al. 2008; Riaz et al. 2009). The over-transcription of CYP6Z6 and CYP6Z8 in most Martinique populations confirms the possible involvement of *Ae. aegypti* CYP6Zs in insecticide resistance in Martinique. However, the final demonstration of their capacity to metabolize chemical insecticides requires further investigations. The P450 gene CYP9M9 was found over-transcribed in several Martinique populations at both life stages. This gene was found to be inducible by permethrin, temephos and others pollutants (David et al. 2010; Poupardin et

al. 2008). However, in the present study, CYP9M9 was also over-transcribed in larvae of the susceptible strain SBE from Benin and showed important variations between populations, suggesting that this gene may not have a major role in resistance. Conversely, the repeated over-transcription of CYP9J22 in adults is in agreement with results obtained by Marcombe et al. (2009b) and suggests a significant role of this gene in resistance. Recently, the capacity of other *Ae. aegypti* CYP9Js to metabolize pyrethroids was validated by heterologous expression followed by in-vitro insecticide metabolism assays (M. Paine, personal communication), confirming the involvement of this P450 subfamily in insecticide resistance in *Ae. aegypti*. Finally, Lycett et al. (2006) showed that the silencing of the P450 electron donor cytochrome P450 reductase (CPR) causes an increased susceptibility to permethrin in *An. gambiae*. Therefore, the recurrent elevated transcription level of the CPR gene at both life stages supports the major role of the P450 detoxification system in metabolic resistance mechanisms in Martinique.

The over-transcription of the gene GSTE2 is of particular interest since the associated enzyme has been shown to metabolize DDT in *An. gambiae* and *Ae. aegypti* (Lumjuan et al. 2005; Ortelli et al. 2003). GSTE2 was also found over-transcribed in a DDT- and pyrethroid-resistant strain from Thailand (Lumjuan et al. 2005). The intensive use of DDT and other organochlorines may be at the origin of the selection of the constitutive over-transcription of GSTE2 in Martinique. The gene GSTE7 was also found over-transcribed in several Martinique populations, and in several pyrethroid resistant *Ae. aegypti* strain from Thailand (Strode et al. 2008). Recent studies performed in our laboratory showed that this enzyme show a GSH conjugation activity and is able to bind several insecticides and pollutants such as DDT, pyrethroids and temephos (A. Chandor-Proust and J.P. David personal communication).

The esterase gene CCEae3A was constitutively over-transcribed in all Martinique populations at both life stages and highly correlated with temephos resistance. The massive use of

temephos during decades in Martinique may have selected for a CCE based metabolic resistance and particularly for the CCEae3A gene. Further work on the phenotypic expression of this candidate gene in *Aedes* would be required as esterases are known to play an important role in OPs resistance in mosquitoes (Hemingway and Karunaratne 1998; Oakeshott et al. 2005; Raymond et al. 1998).

The principal component analysis of 29 variables characterizing the 9 populations of Martinique underlined potential relationships between variables. Negative correlation between resistance to temephos and to deltamethrin suggests not only the absence of cross-resistance between the two insecticides but also that both resistances are submitted to different selection pressures in Martinique. The absence of correlation between deltamethrin resistance and agriculture variables may indicate that agricultural pesticides do not play a major role on adult deltamethrin resistance in Martinique or eventually that this impact is too homogenous across populations to be highlighted by our analysis. A significant relationship appeared between urbanization, deltamethrin pulverization and Kdr mutation frequency possibly associated to the selection pressure applied in urban zones by deltamethrin treatments. Recent studies (Marcombe et al unpublished) showed a surprising strong genetic differentiation of the *Aedes* populations of Martinique island. Larval or adult treatments especially in urban zone may have an influence on the resistance selection, the effective population size (bottleneck) and on the population structure. However, the correlation between Kdr mutation frequency and deltamethrin resistance was not so significant, confirming that metabolic resistance mechanisms play a significant role in deltamethrin resistance and that other sources of selection exist like household insecticides. The agriculture and sugar cane culture variables were correlated with larval resistance to temephos suggesting a potential role of agriculture in the selection of organophosphate resistance in Martinique. Many studies showed that

agricultural practices such as cotton or vegetable culture may have an essential role in the selection for DDT and pyrethroid resistance, especially for the main malaria vector *Anopheles gambiae* in Africa (Akogbeto et al. 2005; Corbel et al. 2007; Diabate et al. 2002). The fact that *Ae. aegypti* is mainly associated to urban and peri-urban environments explain the lesser impact of agricultural practices on this resistance pattern.

From the present study, it could be hypothesized that deltamethrin resistance in Martinique results from the combination of the presence of the V1016I Kdr mutation and the over-production of detoxification enzymes such as with CYP6Zs and GSTs participating in phase I and phase II detoxification steps respectively. At the larval stage an interesting positive correlation was observed between CCEae3A transcription level and temephos resistance, confirming the potential role of this gene in metabolic resistance of this insecticide. However, such correlation was also observed with the P450 genes CYP6M11 and CYP9M9 suggesting that multiple detoxification enzyme families may be involved in temephos resistance.

5. Conclusion

This study showed that resistance to chemical insecticides is multiple and widely distributed among *Ae. aegypti* Martinique populations.

Several detoxification genes such as P450s belonging to the CYP6Z, CYP9J or CYP6M subfamilies, epsilon GSTs or the esterase CCEae3A represent good candidates for further functional validation. Although it cannot be excluded that other genes are involved in insecticide resistance, gene silencing and heterologous expression approaches will provide more evidences of their potential role in metabolic resistance.

The role of environmental factors such as agriculture in *Ae. aegypti* resistance to insecticide in Martinique was preliminarily investigated through a multivariate analysis. Additional population genetic and genomic studies are currently performed on *Ae. aegypti* Martinique populations. These studies should bring more information about the genetic structure of Martinique populations and eventually point out specific genetic region under selection. A better understanding of the genetic basis of insecticide resistance is essential to optimize vector control strategies.

References

- Abbott, W (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265-267.
- Akogbeto, MC, Djouaka, R and Noukpo, H (2005) Use of agricultural insecticides in Benin. *Bull Soc Pathol Exot* 98: 400-5.
- Alout, H, Labbe, P, Berthomieu, A, Pasteur, N and Weill, M (2009) Multiple duplications of the rare ace-1 mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 884-91.
- Bisset, J, Rodriguez, MM and Fernandez, D (2006) Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *J Med Entomol* 43: 1185-9.
- Bocquene, G and Franco, A (2005) Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Mar Pollut Bull* 51: 612-9.
- Bonin, A, Paris, M, Tetreau, G, David, JP and 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) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Bregues, C, Hawkes, NJ, Chandre, F, McCarroll, L, Duchon, S, Guillet, P, Manguin, S, Morgan, JC and Hemingway, J (2003) Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94.
- Brogdon, WG, McAllister, JC and Vulule, J (1997) Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc* 13: 233-7.
- Brown, AWA (1986) Insecticide Resistance Mosquitoes: A Pragmatic Review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 123-140.
- Chiu, TL, Wen, Z, Rupasinghe, SG and Schuler, MA (2008) Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8855-60.
- Corbel, V, N'Guessan, R, Bregues, C, Chandre, F, Djogbenou, L, Martin, T, Akogbeto, M, Hougard, JM and Rowland, M (2007) Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* 101: 207-16.
- Corriveau, R, Philippon, B and Yebakima, A (2003) La Dengue dans les Départements Français d'Amérique. Comment Optimiser la Lutte Contre cette maladie? IRD Édition Paris: Expertise Collégiale.
- David, JP, Coissac, E, Melodelima, C, Poupardin, R, Riaz, MA, Chandor-Proust, A and Reynaud, S (2010) Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 11: 216.
- David, JP, Strode, C, Vontas, J, Nikou, D, Vaughan, A, Pignatelli, PM, Louis, C, Hemingway, J and Ranson, H (2005) The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly

- specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4080-4.
- Diabate, A, Baldet, T, Chandre, F, Akoobeto, M, Guiguemde, TR, Darriet, F, Brengues, C, Guillet, P, Hemingway, J, Small, GJ and Hougard, JM (2002) The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 67: 617-22.
- Djouaka, RF, Bakare, AA, Coulibaly, ON, Akogbeto, MC, Ranson, H, Hemingway, J and Strode, C (2008) Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9: 538.
- Donnelly, MJ, Corbel, V, Weetman, D, Wilding, CS, Williamson, MS and Black, WCt (2009) Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? *Trends Parasitol* 25: 213-9.
- European Commission Environment Biocidal Products (1998) Directive 98/8/EC. Available at <http://ec.europa.eu/environment/biocides/>.
- Feyereisen, R (2006) Evolution of insect P450. *Biochem Soc Trans* 34: 1252-5.
- Finney, DJ (1971) Probit analysis. Cambridge: Cambridge University Press;.
- Hemingway, J, Hawkes, NJ, McCarroll, L and Ranson, H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-65.
- Hemingway, J and Karunaratne, SH (1998) Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
- INVS (2010) Surveillance de la dengue en Martinique. http://www.invs.sante.fr/surveillance/dengue/peh_martinique.html.
- Lumjuan, N, McCarroll, L, Prapanthadara, LA, Hemingway, J and Ranson, H (2005) Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 861-71.
- Lycett, GJ, McLaughlin, LA, Ranson, H, Hemingway, J, Kafatos, FC, Loukeris, TG and Paine, MJ (2006) *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Mol Biol* 15: 321-7.
- Marcombe, S, Carron, A, Darriet, F, Etienne, M, Agnew, P, Tolosa, M, Yp-Tcha, MM, Lagneau, C, Yebakima, A and Corbel, V (2009a) Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *Am J Trop Med Hyg* 80: 745-51.
- Marcombe, S, Poupardin, R, Darriet, F, Reynaud, S, Bonnet, J, Strode, C, Brengues, C, Yebakima, A, Ranson, H, Corbel, V and David, JP (2009b) 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.
- 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 Mol Biol* 17: 125-35.
- Muller, P, Donnelly, MJ and Ranson, H (2007) Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics* 8: 36.

- Oakeshott, JG, Johnson, RM, Berenbaum, MR, Ranson, H, Cristino, AS and Claudianos, C (2005) Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 1: 147-63.
- Ortelli, F, Rossiter, LC, Vontas, J, Ranson, H and Hemingway, J (2003) Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J* 373: 957-63.
- Paris, M, Boyer, S, Bonin, A, Collado, A, David, JP and Despres, L (2010a) Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment. *Mol Ecol* 19: 325-37.
- Paris, M, Tetreau, G, Laurent, F, Lelu, M, Despres, L and David, JP (2010b) Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Manag Sci*.
- Paul, A, Harrington, LC and Scott, JG (2006) Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 43: 55-60.
- Paul, A, Harrington, LC, Zhang, L and Scott, JG (2005) Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 305-9.
- 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 Biochem Mol Biol* 38: 540-51.
- Poupardin, R, Riaz, MA, Vontas, J, David, JP and Reynaud, S (2010) Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 19: 185-93.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rajatileka, S, Black, WC, Saavedra-Rodriguez, K, Trongtokit, Y, Apiwathnasorn, C, McCall, PJ and Ranson, H (2008) Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Tropica* 108: 54-7.
- Ranson, H, Burhani, J, Lumjuan, N and Black, WC (2010) Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal*; 1(1).
- Raymond, M (1995) PROBIT software. CNRS UMII, Licence L93019 Avenix, 1993, France
- Raymond, M, Chevillon, C, Guillemaud, T, Lenormand, T and Pasteur, N (1998) An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1707-11.
- 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. *Aquat Toxicol* 93: 61-9.
- Rodriguez, MM, Bisset, JA, De Armas, Y and Ramos, F (2005) Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 437-45.
- Rogers, SO and Bendich, AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual*. A6:1-10.

- Rosine, J (1999) Resistance d'*Aedes aegypti* et de *Culex pipiens quinquefasciatus* aux insecticide organophosphorés, biologique et aux pyréthrinoides en Martinique et en Guadeloupe. Diplôme d'Etudes Approfondies. Univ. Pierre et Marie Curie (Paris VI): 51.
- Rousset, F and Raymond, M (1997) Statistical analyses of population genetic data: new tools, old concepts. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 313-317.
- Saavedra-Rodriguez, K, Strode, C, Flores Suarez, A, Fernandez Salas, I, Ranson, H, Hemingway, J and Black, WCt (2008) Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 180: 1137-52.
- Saavedra-Rodriguez, K, Urdaneta-Marquez, L, Rajatileka, S, Moulton, M, Flores, AE, Fernandez-Salas, I, Bisset, J, Rodriguez, M, McCall, PJ, Donnelly, MJ, Ranson, H, Hemingway, J and Black, WCt (2007) A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 16: 785-98.
- San Martin, JL, Brathwaite, O, Zambrano, B, Solorzano, JO, Bouckennooghe, A, Dayan, GH and Guzman, MG (2010) The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 82: 128-35.
- Soderlund, DM and Knipple, DC (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-77.
- Strode, C, Wondji, CS, David, JP, Hawkes, NJ, Lumjuan, N, Nelson, DR, Drane, DR, Karunaratne, SH, Hemingway, J, Black, WCt and Ranson, H (2008) Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 113-23.
- Tilquin, M, Paris, M, Reynaud, S, Despres, L, Ravanel, P, Geremia, RA and Gury, J (2008) Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS One* 3: e3432.
- WHO (1998) Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). Document WHO/CDS/CPC/MAL/98.6. World Health Organization, Geneva, Switzerland.: 42.
- WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13, Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- WHO (2006a) Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). Document WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDDP/2006.3 Geneva: World Health Organization.
- WHO (2006b) Report of the Nineth WHOPES Working Goup Meeting, WHO/HQ, Geneva, 5-9 December 2005. Review of Dimilin GR and DT, Vectobac DT, Aqua K-Othrine, Aqua Reslin Super. Document WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2. Geneva: World Health Organization.
- WHO (2006c) Report of the Scientific Working Group on Dengue. Document WHO/TDR/SWG/08. Geneva: World Health Organization.
- Yanola, J, Somboon, P, Walton, C, Nachaiwieng, W and Prapanthadara, L-a (2010) A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 127-131.
- Yébakima, A (1991) Recherche sur *Aedes aegypti* et *Culex pipiens* en Martinique. Ecologie Larvaire, Résistance aux Insecticides, Application à la Lutte. *Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences*, Université Montpellier II: 210.

Tables

Table 1: Resistance status of *Aedes aegypti* populations of Martinique to Bti, temephos (larvae) and deltamethrin (adults).

Insecticides Strains	Bti		Temephos		Deltamethrin		Mortality (24h)
	RR ₅₀ (ci RR ₅₀)	RR ₉₅ (ci RR ₉₅)	RR ₅₀ (ci RR ₅₀)	RR ₉₅ (ci RR ₉₅)	RR ₅₀ (ci RR ₅₀)	RR ₉₅ (ci RR ₉₅)	
Bora ¹	□	□	□	□	□	□	100%
SBE ¹	1,30 (1,26 - 1,29)	1,79 (1,58 - 1,83)	0,87 (0,84 - 0,87)	0,92 (0,92 - 0,95)	0,91 (1 - 0,92)	0,78 (0,81 - 0,7)	100%
AJPB	1,63 (1,58 - 1,71)	1,6 (1,37 - 1,97)	14,69 (13,33 - 16,67)	54,41 (42,5 - 73,75)	5,86 (5,21 - 6,93)	10,29 (8,15 - 15,81)	19%
SPIER	1,42 (1,46 - 1,41)	1,2 (1,19 - 1,3)	13,13 (12 - 15,15)	53,73 (41,61 - 74,53)	4 (3,86 - 4,21)	5,76 (5,3 - 6,86)	70%
GRMN	1,87 (1,91 - 1,89)	2,21 (2,03 - 2,66)	35,94 (29,67 - 44,85)	149,49 (102,32 - 216,56)	5,36 (4,86 - 6,14)	6,95 (5,9 - 9,62)	64%
SJOS	1,02 (0,89 - 1,18)	0,73 (0,57 - 0,96)	12,81 (10,67 - 16,06)	26,27 (16,25 - 42,34)	5,79 (5,21 - 7)	8,48 (6,8 - 13,38)	29%
LAM	1,87 (1,77 - 2,03)	1,9 (1,42 - 2,66)	31,56 (28,33 - 35,76)	138,64 (112,68 - 176,25)	5,64 (5 - 6,79)	8,05 (6,45 - 12,81)	55%
FDF	1,81 (1,74 - 1,92)	1,95 (1,55 - 2,58)	14,69 (13,67 - 16,36)	35,76 (29,64 - 45)	6,43 (5,5 - 8,64)	9,43 (7 - 18,19)	23%
VCLN	1,27 (1,28 - 1,27)	1,16 (1,13 - 1,26)	27,5 (24,67 - 31,52)	152,88 (116,79 - 211,41)	5,71 (5,14 - 6,79)	7,14 (5,95 - 10,52)	20%
RSAL	1,4 (1,42 - 1,39)	1,2 (1,18 - 1,3)	28,75 (26,33 - 32,73)	81,69 (64,82 - 110)	3,71 (3,57 - 3,79)	4,76 (4,25 - 4,71)	90%
SAN	2,26 (2,32 - 2,29)	2,34 (2,12 - 2,88)	19,06 (17,67 - 21,52)	55,93 (45 - 72,66)	6,71 (5,71 - 8,57)	12,19 (9,05 - 21,52)	42%

¹ Susceptible reference strains. LC₅₀ and LC₉₅ in mg/liter for the Bora strain were 0.062 and 0.14 with Bti, 0.0032 and 0.0059 with temephos. KDT₅₀ and KDT₉₅ were 14 and 21min with deltamethrin. ci: confidence interval.

Table 2: Detoxification enzyme activities in adults of the populations of Martinique and the laboratory strains: cytochrome P450 monooxygenases (P450s; nmol P450U/mg protein),

Esterase (α and β -CCEs; α/β -Naphtol/min/mg protein) and Glutathione-S-transferases (GSTs; GSH/min/mg protein).

Strain	n	P450 (\pm sd)	Esterases α (\pm sd)	Esterases β (\pm sd)	GST (\pm sd)
Bora ¹	47	0,039 (\pm 0,0046)	0,108 (\pm 0,0153)	0,077 (\pm 0,0169)	0,02 (\pm 0,0485)
SBE ¹	47	0,028 (\pm 0,0032) *	0,081 (\pm 0,0092) *	0,071 (\pm 0,0131)	0,015 (\pm 0,0902)
AJPB	47	0,054 (\pm 0,0059) *	0,11 (\pm 0,0095)	0,081 (\pm 0,0138)	0,072 (\pm 0,0406) *
SPIER	47	0,053 (\pm 0,0112) *	0,104 (\pm 0,0263)	0,074 (\pm 0,0195)	0,037 (\pm 0,0429) *
GRMN	47	0,043 (\pm 0,0049) *	0,103 (\pm 0,0144)	0,061 (\pm 0,0145)	-
SJOS	47	0,045 (\pm 0,007) *	0,146 (\pm 0,0308) *	0,085 (\pm 0,0211)	-
LAM	47	0,056 (\pm 0,0062) *	0,111 (\pm 0,0139)	0,074 (\pm 0,0153)	0,021 (\pm 0,0559)
FDF	47	0,05 (\pm 0,0044) *	0,114 (\pm 0,0118)	0,073 (\pm 0,0129)	0,039 (\pm 0,0498)
VCLN	47	0,054 (\pm 0,0081) *	0,12 (\pm 0,0189) *	0,072 (\pm 0,0148)	0,038 (\pm 0,0492) *
RSAL	47	0,04 (\pm 0,0087)	0,104 (\pm 0,0227)	0,064 (\pm 0,0173)	0,064 (\pm 0,0452) *
SAN	47	0,053 (\pm 0,0079) *	0,125 (\pm 0,0127) *	0,098 (\pm 0,0188) *	0,051 (\pm 0,0463) *

¹ Susceptible reference strains. *: Values significantly different in field-caught populations comparatively to the Bora laboratory strain (Mann and Whitney's test, $p < 0.05$). sd: standard deviation.

Table 3: Frequency of the V1016I kdr mutation in the populations of Martinique and the two reference strains.

Strain	n	RR	RS	SS	R frequency
Bora ¹	31	0	0	31	0,00
SBE ¹	31	0	0	31	0,00
AJPB	32	25	7	0	0,89
SPIER	31	24	6	1	0,87
GRMN	32	26	6	0	0,91
SJOS	32	24	8	0	0,88
LAM	31	29	2	0	0,97
FDF	32	28	4	0	0,94
VCLN	32	26	6	0	0,91
RSAL	32	25	7	0	0,89
SAN	32	27	5	0	0,92

¹ Susceptible reference strains; n: number of females tested; RR: number of homozygous resistant individuals; SS: number of homozygous susceptible individuals; RS: number of heterozygous individuals; R frequency: Resistance allele frequency in the population.

Table 4: Mean percentage of the AChE inhibition by dichlorvos and propoxur in the laboratory strains and the populations of Martinique.

Strain	n	dichlorvos	± sd	propoxur	± sd
Bora ¹	80	74,99	7,09	80,13	4,45
SBE ¹	24	70,77	3,44	76,48	2,91
AJPB	24	76,95	4,26	80,99	3,02
SPIER	24	83,74	7,24	83,67	4,22
GRMN	24	73,95	5,68	81,99	4,26
SJOS	24	77,21	7,70	82,43	4,70
LAM	24	80,05	3,60	82,42	3,73
FDL	24	77,54	4,61	82,56	3,27
VCLN	24	71,20*	3,97	82,23	4,97
RSAL	24	65,52*	3,75	75,20*	3,03
SAN	24	76,80	3,59	82,74	3,50

¹ Susceptible reference strains. *: Values significantly lower in field populations comparatively to Bora strain (Mann and Whitney's test, $p < 0.05$). sd: standard deviation.

Legends of figures

Figure 1. Location of *Ae. aegypti* populations sampling sites in Martinique. The samplings were made in the communities of Ajoupa-Bouillon, Saint Pierre, Gros Morne, Saint Joseph, Lamentin, Fort de France, Vauclin, Rivière Salée and Saint Anne respectively named AJPB, SPIER, GRMN, SJOS, LAM, FDF, VCLN, RSAL and SAN

Figure 2. Larval transcription levels of (A) 6 cytochrome-P450-monoxygenases and (B) 2 P450-cofactors, 3 GST and 1 CCE genes estimated in the populations of Martinique and the susceptible SBE reference strain relative to the susceptible Bora-Bora strain. Transcription ratio obtained from real-time quantitative RT-PCR experiments were normalized with the 2 housekeeping genes *AeRPL8* and *AeRPS7* and shown as mean value (\pm SD) over 3 independent biological replicates.

Figure 3. Adult transcription levels of (A) 6 cytochrome-P450-monoxygenases and (B) 2 P450-cofactors, 3 GST and 1 CCE genes estimated in the populations of Martinique and the susceptible SBE reference strain relative to the susceptible Bora-Bora strain. Transcription ratio obtained from real-time quantitative RT-PCR experiments were normalized with the 2 housekeeping genes *AeRPL8* and *AeRPS7* and shown as mean value (\pm SD) over 3 independent biological replicates.

Figure 4. Graphical representation of the 29 variables on the three first axes of the principal component analysis (PCA). Percent of starting information represented by each PCA axis are indicated. Variables related to insecticide resistance levels and environment are shown in bold. V1016I: % V1016I Kdr mutation; RR₅₀ delta: RR₅₀ to deltamethrin knock down effect; Alive 24h delta: % alive adult mosquitoes 24 hours after deltamethrin exposure ; RR₅₀ tem:

larval RR₅₀ to temephos; Pulv: deltamethrin pulverization events from 2006 to 2009; Int: Insecticide treatments intervention events from 2006 to 2009; Urb, Agri, Ban, Sug: % land surface of urbanization, agriculture, bananas and sugar culture respectively around each population; OCPs Risk: organochlorine pollution (mainly chlordecone and lindane).

Figure 1

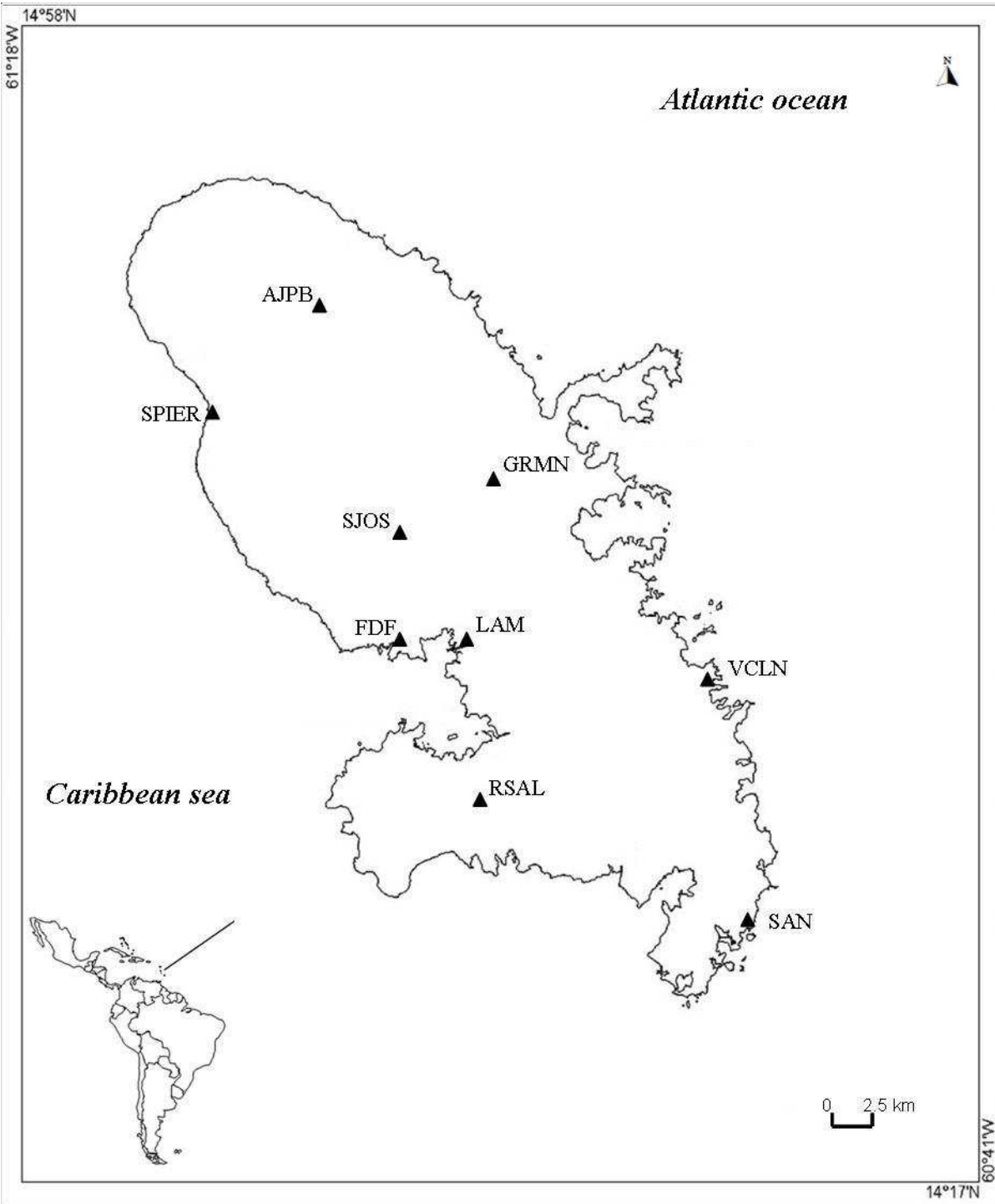


Figure 2

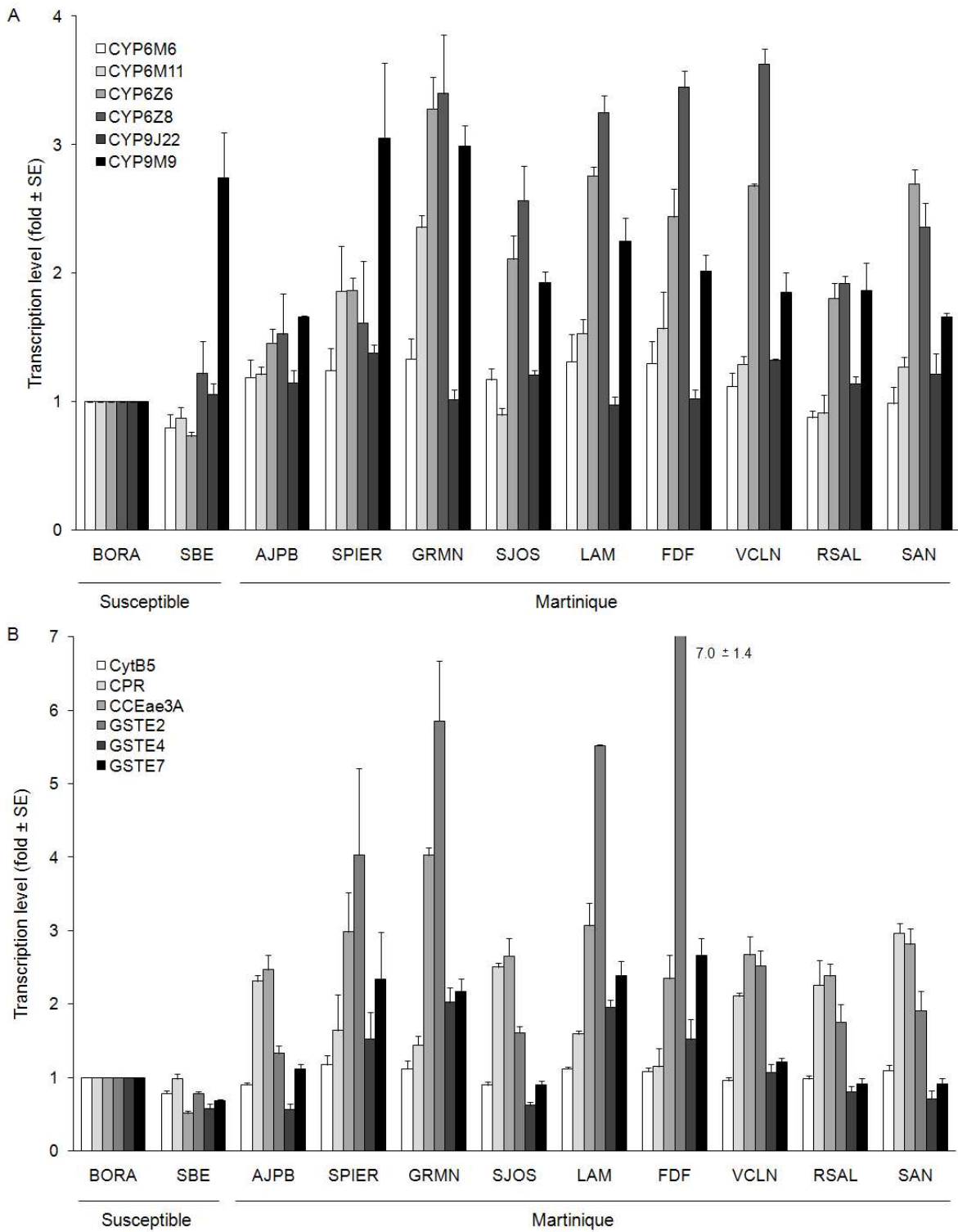
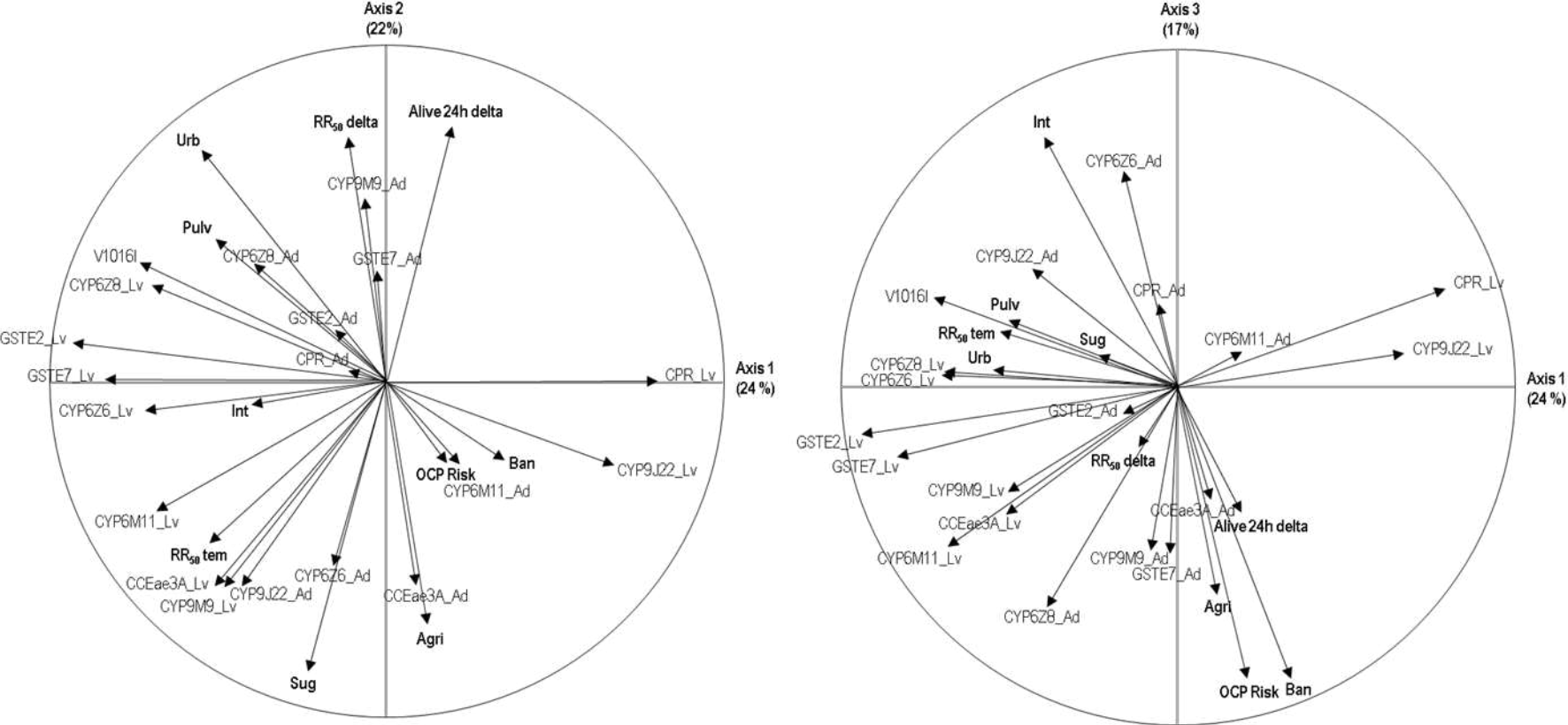


Figure 4



Chapitre IV : Validation fonctionnelle

Parmi les différentes approches de validation fonctionnelle, l'utilisation de la technique d'ARN interférent (ARNi) peut permettre de valider l'implication d'un gène donné dans l'augmentation de tolérance/résistance des larves vis-à-vis des insecticides chimiques. En effet, la technique ARNi, reposant sur un mécanisme naturel de régulation de l'expression des gènes (Ecker et Davis 1986), est largement utilisée pour étudier la fonction des gènes chez la plupart des organismes vivants. La Figure 31 montre le mécanisme par lequel cette technique permet d'inhiber l'expression d'un gène de façon spécifique et post-transcriptionnelle chez un organisme. La technique ARNi nécessite l'introduction d'un ARN double brins (ARNdb) dont la séquence est spécifique de l'ARN messager à dégrader (Fire et al. 1998). La comparaison du phénotype des individus traités par ARNi en avec celui des individus non traités permet par la suite de déterminer la fonction du gène.

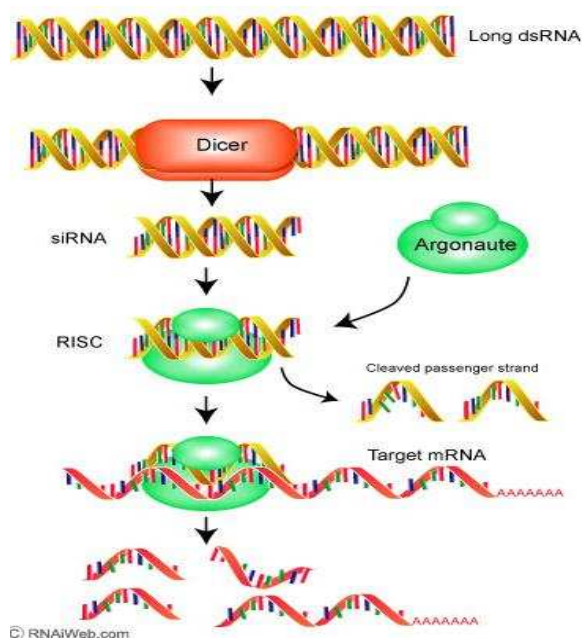


Figure 31 : Principe de l'ARN interférent : De longs ARN doubles brins sont introduit dans le modèle biologique étudié. Là ils sont digérés en petits ARN interférents par une Ribonucléase de type III (Dicer). Un ensemble de protéines appelé Argonaute va « sélectionner » les petits ARN interférents le complexe formé (complexe RISC) va induire le silence des ARN. Ce complexe est responsable de la dégradation des ARN messagers possédant une séquence homologue au petit ARN interférent. L'ARN messager est dégradé, la protéine n'est pas traduite : l'expression du gène est stoppée. Pour résumer, ce mécanisme permet de diminuer l'expression d'un gène de façon spécifique et post-transcriptionnelle dans tout l'organisme ou la cellule par l'introduction d'ARN double brins (ARNdb) dont la séquence est spécifique des ARN messagers à dégrader (Napoli et al. 1990, Fire et al. 1998).

Cependant, le moyen utilisé pour introduire les ARN doubles brins peut être un facteur limitant pour utiliser cette technique chez les insectes (Walshe et al. 2009). Une méthode couramment utilisée chez les insectes consiste à injecter des ARN doubles brins grâce à une

micro-seringue. Cette technique a montré son efficacité à travers de nombreuses études (Tabunoki et al. 2004, Lynch et Desplan 2006, Jaubert-Possamai et al. 2007), mais l'injection possède le défaut d'être une méthode invasive qui génère souvent un stress et une mortalité élevée chez les individus injectés. Walshe et al., en 2009 ont montré, chez la mouche tsé-tsé *Glossina morsitans morsitans*, que l'ingestion était aussi efficace que l'injection pour inhiber l'expression d'un gène de la réponse immune (TsetseEP) exprimé dans le canal alimentaire. Cette technique par ingestion s'est également montrée efficace dans d'autres études. Ainsi, l'incorporation des ARN double brins dans la nourriture de plusieurs espèces de coléoptères a permis de supprimer l'expression de gènes impliqués dans la croissance ou la survie, tels que des ATPase vacuolaires (Baum et al. 2007). L'expression in planta d'ARNdb ingérés par *Helicoverpa armigera* a permis d'inhiber l'expression d'un CYP impliqué dans la tolérance au gossypol (Mao et al. 2007). Plus récemment, (Bautista et al. 2009) ont réussi à inhiber l'expression de CYP6BG1 par ingestion d'ARNdb et ainsi démontrer son rôle dans la résistance à la perméthrine chez le lépidoptère *Plutella xylostella*.

Chez les moustiques, cette approche a été utilisée essentiellement par injection d'ARNdb chez des adultes. Chez *An. gambiae* par exemple, la diminution drastique de l'expression de la NADPH cytochrome P450 réductase (CPR) dans les oenocytes et de manière moindre dans l'épithélium de l'intestin a conduit à une diminution de la tolérance des adultes vis-à-vis de la perméthrine (Lycett et al. 2006). Chez *Ae. aegypti*, l'extinction de l'expression du gène *per* (Period clock gene, gène impliqué dans les rythmes circadiens) a conduit à une diminution de la tolérance des moustiques vis-à-vis de la perméthrine (Yang et al. 2010). Beaucoup moins d'études ont tenté d'inhiber l'expression de gènes chez les larves de moustiques. Cependant, il a été montré par injection d'ARNdb que la diminution de l'expression du gène *AeSCP-2* (codant pour une protéine impliquée dans le transport des stéroïdes chez les larves d'*Ae. aegypti* entraînait un défaut du développement de l'adulte et une diminution de la viabilité des œufs (Blitzer et al. 2005). Plusieurs gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des insecticides ont été identifiés au cours de cette thèse chez les larves d'*Ae. aegypti*. La plupart de ces gènes codent pour des CYPs (CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6N12, CYP6M11). Pour confirmer la fonction de ces gènes, nous avons donc tenté d'utiliser la technique de l'ARN interférent couplée à des bioessais sur des larves de moustiques. L'intérêt de cette technique est de pouvoir supprimer l'expression d'un gène et ensuite d'observer les effets au niveau du phénotype. Ainsi, si la sur-expression d'un gène de détoxification permet aux larves d'acquérir une tolérance accrue à un insecticide donné, alors

son 'silencing' par ARN interférent pourrait ou devrait avoir pour conséquence de réduire cette tolérance, permettant ainsi de démontrer son rôle dans la résistance à l'insecticide. Différentes méthodes par injection ou ingestion ont été testées au cours de ma thèse pour ces expérimentations (Figure 32).

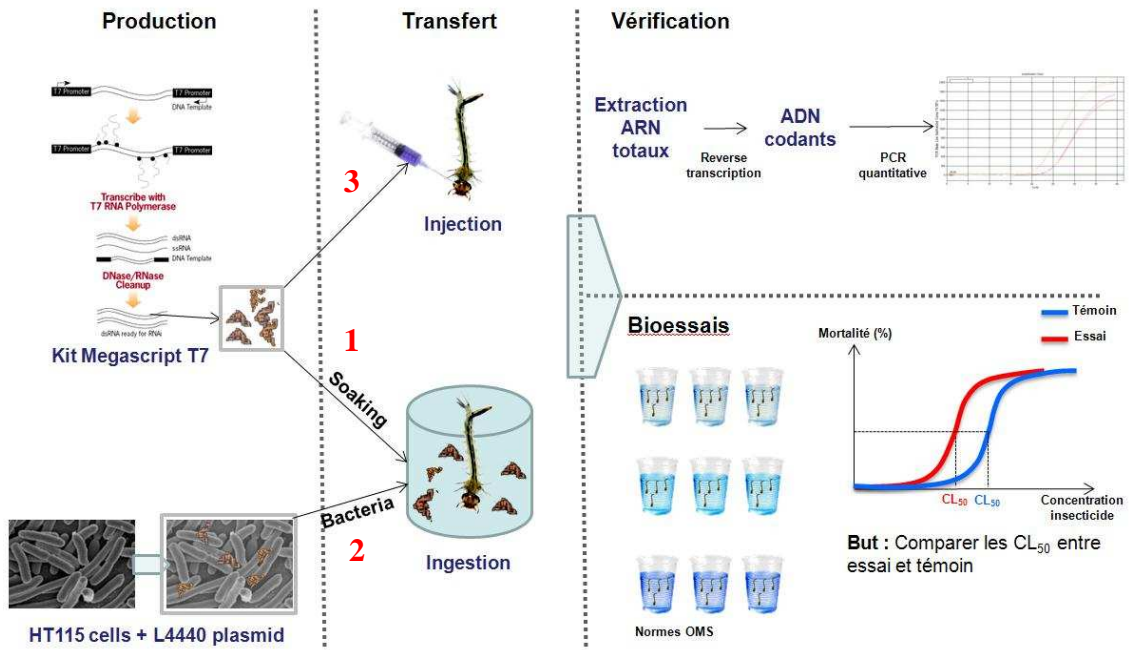


Figure 32 : Approche expérimentale utilisée pour l'inhibition post-transcriptionnelle (« silencing ») de gènes CYPs chez les larves d'*Aedes aegypti* : 1. « Silencing » par ingestion d'ARN double brins. 2. « Silencing » par ingestion de bactéries synthétisant les ARN double brins. 3. Silencing par injection d'ARN double brins.

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre au point les méthodes d'extinction de gènes par ingestion d'ARNdb sur larves d'*Ae. aegypti* (méthodes 1 et 2, Figure 32) car elles sont non invasives, moins stressantes pour les larves et plus simples à mettre en place que la méthode par injection. Cependant, elles n'ont encore jamais été mises au point chez les larves de moustiques. Nous avons donc également testé la méthode par injection d'ARNdb, (méthode 3, Figure 32) qui avait déjà montré son efficacité sur moustiques adultes mais aussi sur larves.

I/ Approche par ingestion d'ARN double brins

Les ARNs double brins utilisés pour l'ingestion par les larves de moustiques ont été synthétisés soit *in vitro* à l'aide d'une ARN polymérase et d'un kit commercial soit *in vivo* dans des bactéries dans lesquelles un plasmide d'expression des ARNs double brins a été incorporé.

1/ Production *in vitro* des ARNs double brins

Cette méthode a consisté à synthétiser les ARNs double brins (ARNdb) à partir d'un kit commercial (Megascript T7, Ambion) (Figure 33). Plusieurs CYPs (CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6M11, CYP6N12) ont été séquencés par Emilie Guittard et Chantal Dauphin-Villemant (Université Pierre et Marie Curie) puis clonés dans un vecteur d'expression pIB/V5-His. En parallèle, nous avons obtenus de l'organisme Addgene (MA, USA) un plasmide d'expression des ARNdb du gène codant pour la protéine fluorescente GFP (« Green Fluorescent Protein »), non présente chez les insectes afin qu'il serve de témoin négatif (injection d'ARNdb sans cible chez le moustique). La matrice ADN double brin nécessaire pour la transcription *in vitro* des ARNdb par l'ARN polymérase T7 a été obtenue par PCR avec des amorces spécifiques. Un contrôle par migration sur gel d'agarose à 1% a permis de contrôler la présence des ARNs double brins synthétisés. Des larves d'*Ae. aegypti* de stade II/III sont ensuite placées dans une solution d'ARNdb du gène CYP étudié ou GFP (témoin) pendant 16 heures (80 larves de stade II/III pour 50 μ l de solution d'ARNdb concentrée à 500 ng/ μ l). Elles sont ensuite transférées dans de l'eau sans ARNdb avec de la nourriture et 24 heures après, les premiers lots de larves sont utilisés pour en extraire les ARN totaux (premier pas de temps) afin de vérifier l'extinction de l'expression du gène ciblé.

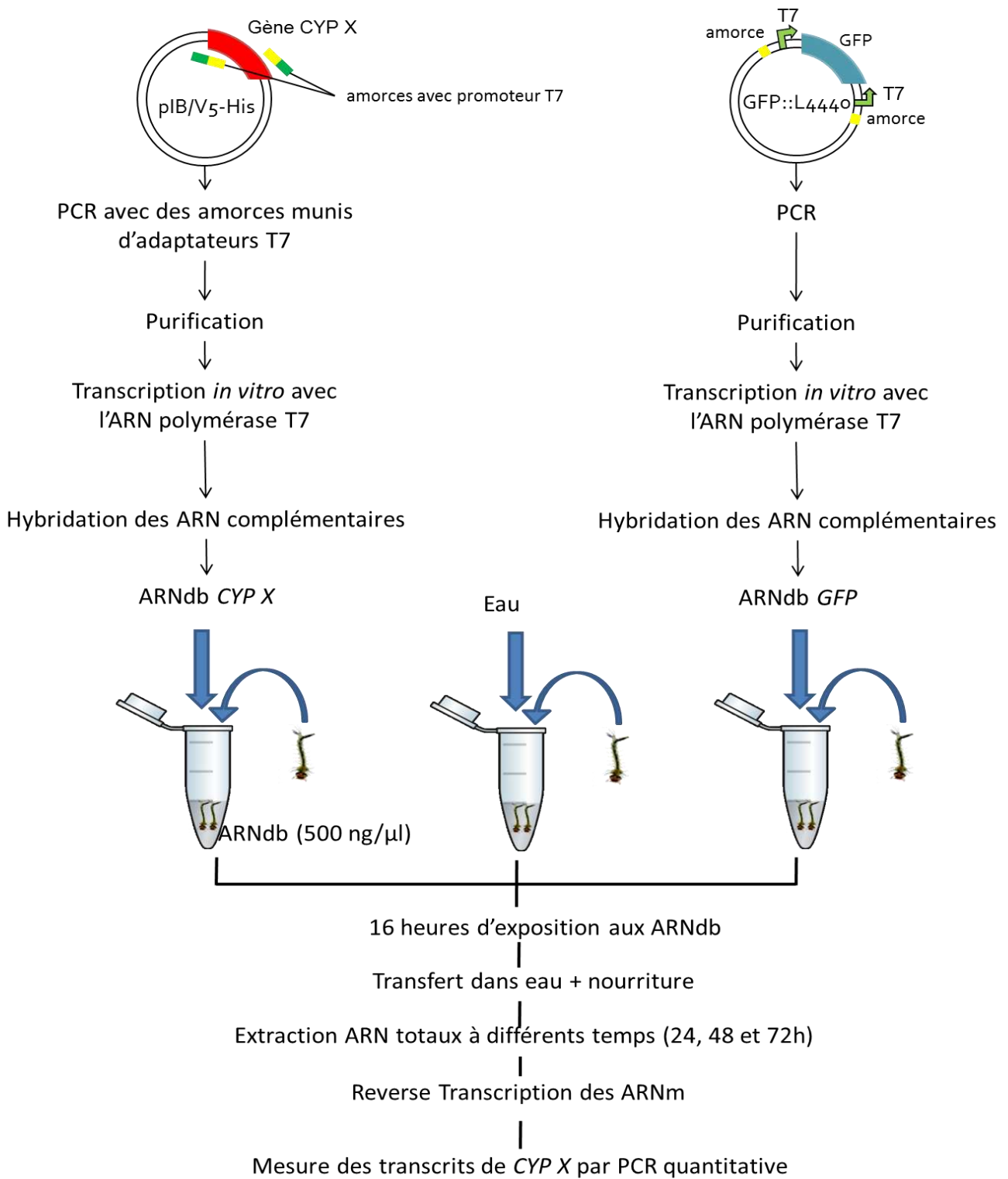


Figure 33 : Protocole de synthèse et d'ingestion d'ARN double brins à des larves de stades III puis vérification par PCR quantitative

Cette méthode a été testée sur les 3 CYPs CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6N12 mais ne nous a pas permis d'obtenir de **résultats concluants**. Pour CYP6Z8, des baisses de 30% à 50% de la quantité de transcrits ont pu être observées (Figure 34) mais ces résultats étaient **peu reproductibles** d'une expérimentation à l'autre et n'ont pas permis de dégager de différence significative en fonction du traitement (stage Romain Blanc-Mathieu, Master 1).

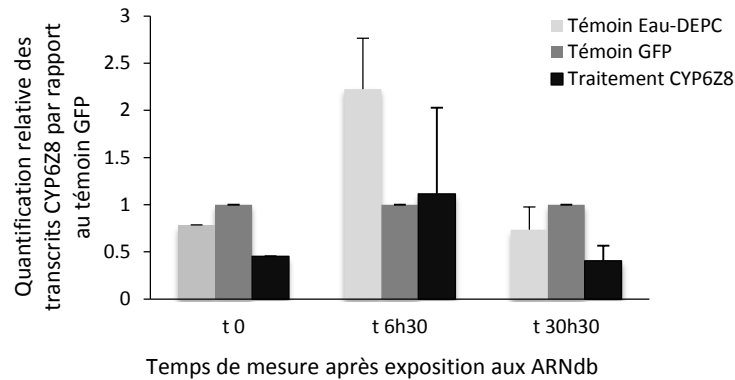


Figure 34: Quantification relative des transcrits CYP6Z8 (\pm erreur standard) chez des larves exposées 16 heures ou non aux ARNdb (500 ng/ μ L). Pour chaque temps, la quantité de transcrits est normalisée par rapport aux témoins GFP. Les mesures sont effectuées sur 3 temps : 0, 6h30 et 30h30 après exposition aux ARNdb.

Nous avons ensuite tenté d'optimiser cette approche en travaillant sur des larves plus jeunes (stade II précoce) avec plusieurs phase d'ingestion d'ARNdb **encapsulés dans un agent de transfection, la lipofectamine 2000** (Invitrogen) afin d'améliorer leur pénétration à travers les tissus larvaires. En effet, une étude récente a montré que la lipofectamine, qui déstructure les membranes et facilite le passage des ARNdb dans les cellules, améliore de façon significative la pénétration des ARNdb ingérés chez les insectes (Whyard et al. 2009). Dans notre cas, cette approche ne nous a pas permis d'améliorer l'efficacité de l'approche par ingestion des ARNdb dans les conditions testées.

2/ Production in vivo des ARNs double brins par des bactéries

Cette approche vise à faire produire les ARNs double brins par des bactéries (Figure 35). Ces bactéries sont issues d'une souche d'*Escherichia coli* (souche HT115(DE3)) résistante à la tétracycline et déficiente en RNase III, enzyme capable de dégrader les ARNdb. En outre, ces bactéries possèdent un gène codant pour une ARN T7 polymérase inducible par IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) permettant ainsi d'induire la production des ARNdb pendant leur culture.

Ces bactéries ont été transformées avec le plasmide L4440 contenant la portion de séquence complémentaire du gène ciblée. L'intérêt de ce vecteur est qu'il possède de part et d'autre du site multiple de clonage deux promoteurs T7, essentiels pour la transcription des ARNdb. Il possède également un gène de résistance à l'ampicilline qui permet de contrôler la bonne transformation des bactéries. Dans notre étude, nous avons choisi de cloner une séquence de 800 pb complémentaire de l'ADN complémentaire du gène CYP6Z8 dans le plasmide L4440 que nous avons ensuite transformé dans des bactéries HT115(DE3) selon le protocole de Kamath et al. (2003). Pour le témoin, nous avons transformé ces mêmes bactéries avec le plasmide L4440 contenant le gène GFP. Des PCR sur colonies isolées ont permis de contrôler la bonne transformation des bactéries avec les plasmides contenant les séquences CYP6Z8 ou GFP. Après mise en culture des bactéries transformées, la transcription des ARNdb est induite par ajout d'IPTG (0.8 M) dans le milieu. Quatre heures après, le milieu de culture est centrifugé et les culots bactériens sont resuspendus dans de l'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate) pour atteindre une DO_{600nm} de 0.350 (Dose maximale n'entraînant aucune mortalité chez les larves de moustiques). Les larves sont ensuite placées dans cette suspension bactérienne. Cette dose a été choisie car elle n'entraîne pas de mortalité chez les larves avec des bactéries non transformées.

Afin de vérifier la bonne production des ARNdb par les bactéries, les ARN totaux ont été extraits à partir de bactéries induites ou non à l'IPTG. La migration sur gel des ARN totaux issus des bactéries induites ou non permet de contrôler la production des ARNdb. Malgré cela, cette méthode testée sur CYP6Z8 ne permet pas d'obtenir de résultats chez les larves. **Aucune baisse significative des transcrits** de CYP6Z8 n'est observée pour les différents temps post-ingestion testés (jusqu'à 48 heures après la fin de l'ingestion des ARNdb).

Par la suite, nous avons émis l'hypothèse que cette absence d'effet pouvait être liée à un mauvais passage des ARNdb au travers de la paroi de l'intestin. La membrane péritrophique peut également constituer un frein au passage des ARNdb puisque chez les larves de moustiques, elle sépare le bol alimentaire de l'épithélium intestinal et protège aussi l'insecte des attaques bactériennes et parasitaires. Dans une étude (Edwards et Jacobs-Lorena 2000), la membrane péritrophique de larves d'*Ae. aegypti* et *An. gambiae* a pu être détruite en exposant les larves durant quelques heures au dithiothreitol (DTT), le DTT détruisant les ponts disulfures de ce réseau de protéines.

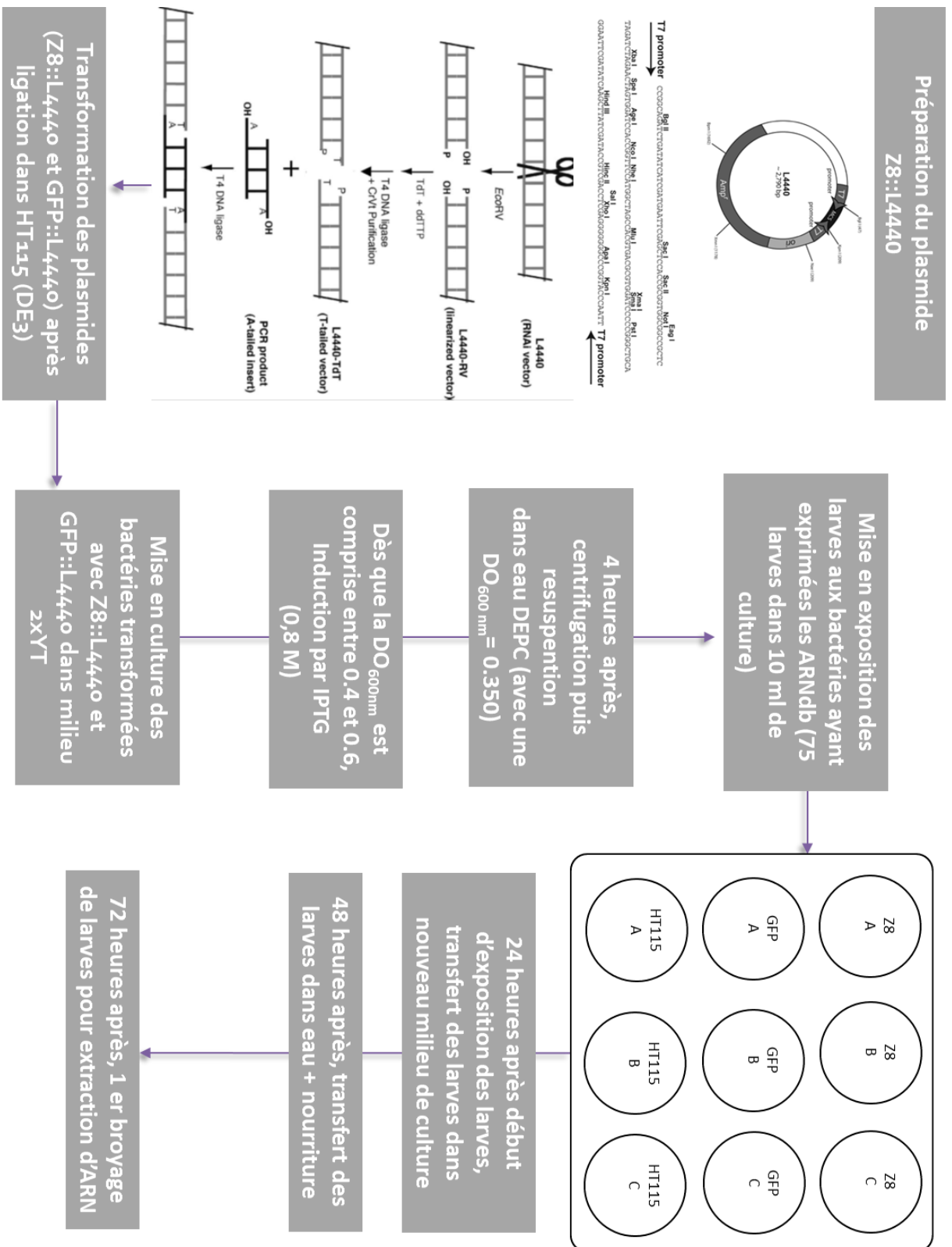


Figure 35: Approche globale d'utilisation de la technique de l'ARN interférent chez des larves d'*Aedes aegypti* par ingestion de bactéries exprimant des ARN double brins ciblant CYP6Z8 et GFP

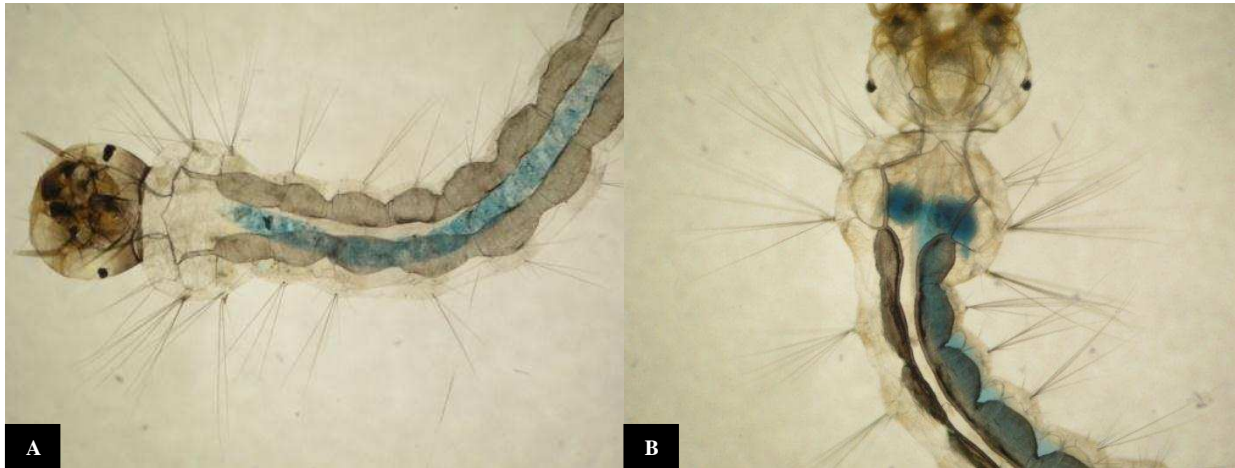


Figure 36: Destruction de la membrane périrrophique chez les larves d'*Aedes aegypti* par traitement au DDT. Coloration au bleu de dextran chez des larves non exposées au DDT (A) et exposées durant 16 heures à 7 mM de DDT (B). Remarquez la diffusion du colorant dans les tissus après exposition au DDT.

Nous avons donc traité les larves au DDT pendant 16 heures (Figure 36) avant leur mise en présence avec les bactéries produisant les ARNdb. Comme précédemment, **aucune baisse significative de la quantité de transcrits de CYP6Z8 n'est constatée** par RT-qPCR chez les larves traitées en comparaison des larves traitées avec les ARNdb GFP (Figure 37).

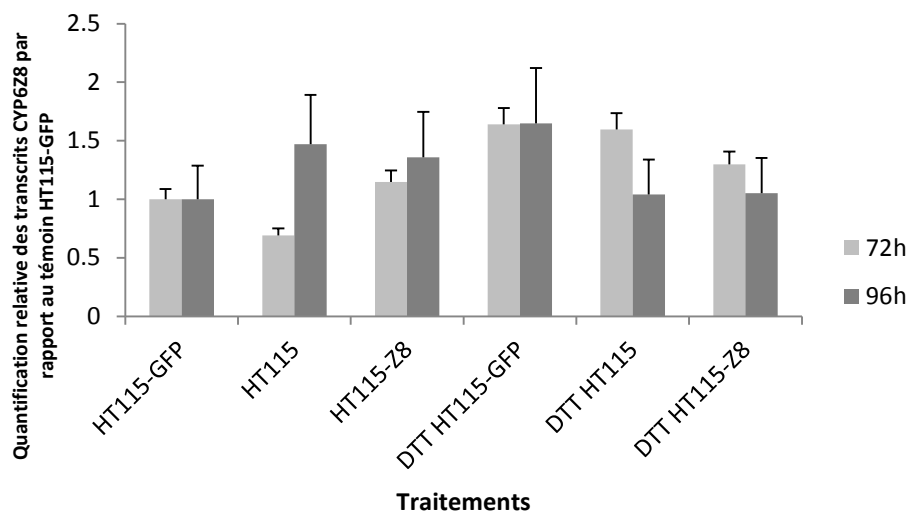


Figure 37: Quantification relative des transcrits CYP6Z8 72 et 96 heures après le début de l'exposition de larves d'*Ae. aegypti* (stades 2/3) à des bactéries exprimant des ARNdb (HT115-GFP et HT115-Z8) ou non (HT115). En parallèle, les mêmes traitements ont été appliqués sur des larves exposées préalablement au DDT. Les valeurs (\pm erreurs standards) sont normalisées par rapport au traitement GFP. Pour chaque traitement, trois réplicats de 30 larves ont été réalisés.

II/ Approche par injection d'ARNdb.

En parallèle, l'approche classique par injection a également été testée sur les larves au laboratoire avec les ARNdb précédemment synthétisés *in vitro* (kit Megascript T7, Ambion). Les injections ont été réalisées d'une part sur larves et d'autre part sur adultes afin de comparer les effets obtenus sur les différents stades de développement.

Ainsi, 36 nl d'ARNdb à 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ont été injectés (soit environ 250 ng d'ARN db) entre la tête et le thorax de larves d'*Ae. aegypti* à l'aide d'un microinjecteur Nanoject II (Drummond) (Figure 38). Un colorant alimentaire est ajouté aux ARNdb afin de s'assurer de la pénétration du mélange dans la larve. Après injection, les larves sont immédiatement transférées dans de l'eau claire. Le lendemain de l'injection, les larves sont nourries normalement et 24 heures après, les premiers lots de larves sont utilisés pour les extractions d'ARN totaux par la méthode au Trizol.

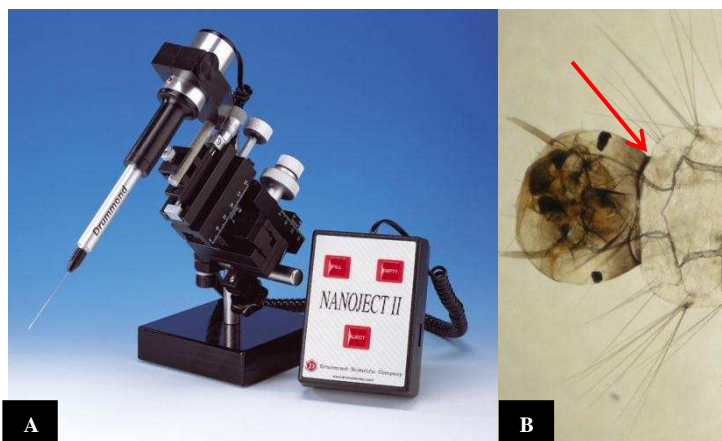


Figure 38: Microinjecteur Nanoject II (Drummond) (A) et zone d'injection des ARNdb chez les larves d'*Ae. aegypti* (B)

Pour les adultes, 69 nl d'ARNdb à 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (soit plus de 480 ng d'ARNdb) ont été injectés dans le thorax de femelles adultes âgées de 3 jours. Après injection, les femelles sont replacées en cage et 72 heures après, elles sont utilisées pour extraire les ARN totaux comme précédemment.

Après plusieurs expérimentations ciblant plusieurs gènes chez les larves (gènes testés : CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6M6 et CYP6M11), nos résultats ont montré de faibles diminutions de la quantité des transcrits CYP6Z8 et CYP6M6 48h après l'injection des ARNdb (Figure 39). Cependant, ces diminutions ne sont plus observées 72h après l'injection.

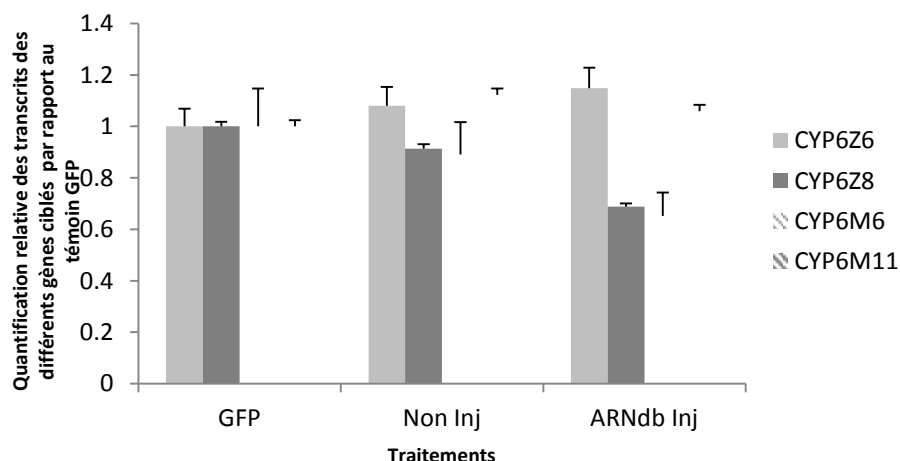


Figure 39: Quantification relative des transcrits de CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6M6 et CYP6M11 après injection d'ARNdb GFP ou d'ARNdb spécifiques des différents gènes ciblés. Un témoin comprenant des larves non injectées a également été utilisé. Les valeurs (\pm erreurs standards) sont normalisées par rapport au traitement GFP. Pour chaque traitement, au moins deux répliquats de 20 larves ont été réalisés.

En revanche, chez les adultes, deux gènes CYP6Z6 et CYP6Z8 ont été testés et une **baisse significative de plus de 85%** est observée en RT-qPCR pour le gène CYP6Z6 (Figure 40) tandis qu'un effet très limité a été observé pour le gène CYP6Z8.

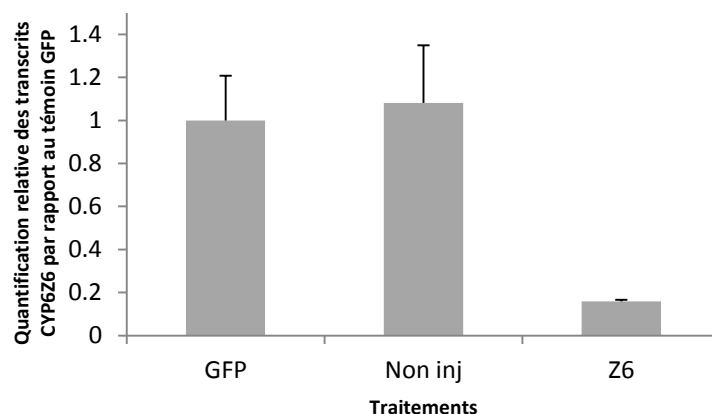


Figure 40: Quantification relative des transcrits CYP6Z6 72h après injection d'ARNdb GFP ou ARNdb CYP6Z6. Un témoin comprenant des adultes non injectés a également été utilisé. Les valeurs (\pm erreurs standards) sont normalisées par rapport au traitement GFP. Pour chaque traitement, deux répliquats de 15 adultes ont été réalisés.

En conclusion de ces expérimentations par ARN interférent (ARNi), seule l'injection d'ARNdb chez les adultes semble pouvoir être efficace et suffisamment reproductible pour valider le rôle des gènes étudiés. La faible efficacité des méthodes employées au niveau

larvaire peut s'expliquer par une mauvaise pénétration des ARNs double brins qui n'atteignent pas leur cible. Concernant les techniques d'injection et d'ingestion d'ARNdb, il semblerait que les ARNdb atteignent difficilement leur cible puisque au niveau larvaire, il n'a pas été possible d'affecter l'expression de CYP6Z6, alors que cela a été possible au niveau adulte avec les mêmes ARNs double brins. Les différentes mues larvaires entraînent des changements importants au niveau métabolique et au niveau de la transcription de nombreux gènes (Clements 1992), pouvant ainsi masquer ou diminuer l'efficacité des ARNdb. Cela expliquerait les faibles baisses observées qui ne sont pas maintenues au cours du temps (Pour CYP6Z8 et CYP6M6 sur larves). Une autre hypothèse évoquée est celle de la dégradation des ARNdb dans l'intestin des larves. En effet, un pH élevé peut favoriser l'hydrolyse chimique des ARNdb (Price et Gatehouse 2008). Or, chez les larves d'*Ae. aegypti*, le pH intestinal peut monter à plus de 12 (Clements 1992). Enfin, un mauvais design des ARNdb peut également permettre d'expliquer l'absence de résultats significatifs obtenus pour le gène CYP6Z8 chez les larves et chez les adultes. Cependant nos résultats démontrent que l'extinction du gène CYP6Z6, dont le patron d'expression est assez similaire, a été possible chez les adultes. Cette étude a souligné la difficulté de mettre au point la méthode d'ARN interférent chez les larves de moustiques. Les causes de l'inefficacité de cette méthode sont difficilement identifiables en raison de la multitude de facteurs impliqués (gène ciblé, design des ARNdb, quantités d'ARNdb à utiliser, durée d'exposition, etc...). Pour la suite des expérimentations ARNi sur larves, il serait judicieux de se focaliser sur le gène CYP6Z6, gène dont l'expression a pu être diminuée chez les adultes par injection.

Chapitre V : Discussion et perspectives

Les milieux aquatiques sont soumis à un apport continu de matériaux et de composés chimiques. Ces composés peuvent être d'origine naturelle, issus du fonctionnement de l'écosystème (dégradation de la matière organique, composés issus du métabolisme secondaire des plantes, etc.) ou d'origine anthropique, issus de l'agriculture (pesticides), industries chimiques (métaux lourds, HAPs, PCBs...) et autres activités diverses (médicaments, particules organiques). Les insectes aquatiques et notamment les larves de moustiques sont présent dans la plupart des milieux aquatiques d'eau douce stagnante. Afin de lutter contre les nuisances occasionnées par les moustiques, l'homme utilise depuis des dizaines d'années de nombreux insecticides chimiques. Cependant, ces traitements répétés et intensifs ont conduit à l'émergence de mécanismes de résistance chez les moustiques. Beaucoup d'études s'intéressent aux mécanismes de résistance des insectes aux insecticides. D'autres se sont focalisées sur l'adaptation des organismes aux perturbations environnementales telles que la pollution des milieux aquatiques. Par contre, peu d'études traitent des interactions entre les polluants rencontrés dans l'environnement et les mécanismes de résistance aux insecticides.

Dans ce contexte, ma thèse a cherché à étudier l'impact des xénobiotiques environnementaux sur la capacité des moustiques à tolérer ou résister aux insecticides chimiques. Pour répondre à cette question complexe, mon travail a porté sur deux niveaux temporels d'impact des polluants. Le premier a visé à étudier l'effet à court terme (1 seule génération) des polluants sur les moustiques. Autrement dit, comment certains xénobiotiques modifient le phénotype toxicologique des larves vis à vis des insecticides, et quels sont les mécanismes impliqués ? Le second a cherché à savoir comment les xénobiotiques environnementaux agissent sur les populations de moustiques à long terme (plusieurs générations), notamment sur la sélection des gènes impliqués dans la résistance aux insecticides. Dans l'ensemble de ce chapitre, le terme de plasticité phénotypique définira l'ensemble des réponses phénotypiques possibles à partir d'un même génotype (Ghalambor et al. 2007) tandis que le terme de résistance sera défini par une modification phénotypique héritée de génération en génération.

I/ Impact à court terme des xénobiotiques environnementaux

1/ Complexité des interactions entre les réponses aux xénobiotiques et aux insecticides

Pour comprendre les effets des xénobiotiques à court terme et afin de simplifier au maximum le système expérimental, les larves de moustiques ont été exposées ou non à des concentrations sublétales de polluants puis ensuite transférées dans de l'eau contenant uniquement l'insecticide utilisé pour les bioessais. Nous avons montré que l'exposition des larves à plusieurs xénobiotiques peut améliorer la tolérance des larves de moustiques vis-à-vis du même insecticide. Réciproquement, l'exposition des larves de moustiques à un xénobiotique donné peut augmenter leur tolérance vis-à-vis de plusieurs insecticides chimiques différents. De plus, l'augmentation de tolérance est directement liée à la **dose de xénobiotique** utilisée pour l'exposition ainsi qu'au **temps d'exposition**. Ainsi, pour une durée d'exposition donnée, la tolérance augmente avec la dose, jusqu'à une certaine limite. De même, pour une dose donnée, la tolérance augmente avec la durée d'exposition jusqu'à atteindre un maximum d'effet.

Dans cette thèse nous avons choisi de nous focaliser sur les interactions biotiques entre xénobiotiques environnementaux et insecticides chimiques au niveau de la réponse des moustiques à ces composés. Il serait aussi intéressant d'étudier les effets de **compétition ou de synergie** qui peuvent exister entre les xénobiotiques et les insecticides en réalisant les bioessais avec les insecticides en présence de xénobiotiques environnementaux. En effet, les milieux aquatiques dans lesquels se développent les moustiques constituent de véritables « zones puits » pour les xénobiotiques. Dans ce contexte, les traitements insecticides sont réalisés de manière concomitante à l'exposition aux polluants présents dans le milieu. Ainsi, dans l'hypothèse où un xénobiotique donné induit des enzymes capables de le métaboliser lui et l'insecticide utilisé pour le bioessais, alors on peut s'attendre à des phénomènes de compétition dans la métabolisation de l'insecticide et du xénobiotique entraînant des variations de tolérance des moustiques à l'insecticide. A l'opposé, on peut aussi s'attendre à des mécanismes de synergie entre xénobiotiques environnementaux et insecticides sous l'effet d'interactions chimiques entre molécules organiques différentes. Un autre résultat important, encore jamais démontré à notre connaissance, est le fait qu'exposer des larves de moustique à des xénobiotiques et notamment au HAP fluoranthène durant leur développement peut

augmenter la tolérance des moustiques adultes à certains insecticides. Ainsi, malgré les profonds changements métaboliques et physiologiques provoqués par le stade nymphal et la métamorphose (Clements 1992), il semblerait que les mécanismes entraînant l'augmentation de tolérance soient maintenus jusqu'au stade adulte (Figure 18, Chapitre II). Les expérimentations présentées dans cette thèse sont préliminaires et il serait intéressant de les poursuivre, afin notamment de mesurer les activités globales des enzymes de détoxification chez les adultes après exposition des larves aux polluants et aussi de vérifier si les mêmes gènes sont induits chez les larves et les adultes après exposition au fluoranthène. Le dosage de ce HAP chez les larves et les adultes après une exposition larvaire permettrait aussi de savoir si l'effet observé chez les adultes est uniquement la conséquence des changements métaboliques induits chez les larves ou bien si la pénétration du xénobiotique et son élimination métabolique se poursuit au stade adulte. En effet, une accumulation dans les tissus larvaires et adultes entrainerait le maintien de l'induction de certaines enzymes de détoxification et par conséquent le maintien de l'augmentation de tolérance à l'insecticide.

De manière plus globale, ces résultats soulignent l'importance de prendre en considération l'environnement chimique dans lequel grandissent les larves pour l'étude des niveaux de tolérance non seulement larvaire mais aussi adulte aux insecticides. Cela confirme aussi certaines observations de terrain montrant que les moustiques issus de zones agricoles ou plus généralement polluées par des composés organiques tolèrent mieux les insecticides (Akogbeto et al. 2006, Djouaka et al. 2007, Ranson et al. 2009, Yadouleton et al. 2009). Cependant, ces augmentations de tolérance/résistance aux insecticides observées sur le terrain peuvent également être le fait de la résistance croisée avec les pesticides utilisés en agriculture (effet à long terme des polluants).

2/ Mécanismes impliqués dans les interactions biotiques entre polluants et insecticides chez les moustiques

Par des approches biochimiques, nous avons montré que l'exposition des larves de moustiques à des doses sublétales de xénobiotiques augmente leurs activités globales P450s et GSTs. Grâce à une puce à ADN représentant les gènes de détoxification, nous avons pu montrer que l'expression de nombreux gènes, majoritairement des CYPs était induite suite à l'exposition des larves aux xénobiotiques. Ces résultats sont en accord avec un rôle potentiel des CYPs dans la protection des insectes contre les composés exogènes nocifs (Despres et al. 2007, Feyereisen 2005). Parmi ces CYPs potentiellement impliqués dans le métabolisme des

xénobiotiques, beaucoup appartiennent à la famille des CYP6 ce qui confirme l'implication de cette famille, fortement diversifiée chez les moustiques, dans l'adaptation aux xénobiotiques et insecticides (Feyereisen 2005). Par comparaison des séquences protéiques, nous avons également montré que certaines enzymes sont très proches de celles capables de métaboliser certains insecticides chez d'autres insectes. C'est le cas de CYP6Z6 et CYP6Z8 qui appartiennent à la même sous-famille que CYP6Z1 chez *An. gambiae* capable de métaboliser le DDT (Chiu et al. 2008) ou CYP6M11 et CYP6N12, proches de CYP6M2, enzyme surexprimée chez des souches d'*An. gambiae* résistantes aux pyréthrinoïdes (Djouaka et al. 2008). Récemment, CYP6M2 a également été montré capable de métaboliser la perméthrine (B. Stevenson, communication personnelle). Les gènes mis en évidence constituent d'autant plus de bons gènes candidats qu'ils sont préférentiellement transcrits dans des tissus souvent impliqués dans la détoxification de xénobiotiques, comme le canal alimentaire et les tubes de Malpighi (Chung et al. 2007, Yang et al. 2007). Les GSTe4 et GSTe7 (Publication II), sont quant à elles proches de GSTe2 chez *An. gambiae* capable de métaboliser le DDT (Ortelli et al. 2003). Elles ont aussi souvent été mises en évidence chez les populations de moustiques résistantes aux pyréthrinoïdes (Publications VI et VII, Strode et al., 2008).

Cependant, les CYPs et GSTs ne sont pas les seules familles d'enzymes impliquées dans la réponse des larves de moustiques à l'exposition aux xénobiotiques. Par une approche de « screening » de l'ensemble de transcriptome (Publication III), nous avons montré que l'exposition des larves de moustiques à de très faibles doses de certains xénobiotiques induit non seulement des gènes codant pour des enzymes de détoxification mais également des gènes codant pour des protéines cuticulaires. La formation de la cuticule peut en effet être influencée par des stress environnementaux (Zhang et al. 2008). En exposant des daphnies à un insecticide (carbamate) ou à un herbicide (acétanilide), une autre étude a montré que plusieurs gènes codant pour des protéines cuticulaires étaient induits (Pereira et al. 2010). De plus, la composition et l'épaisseur de la cuticule pouvant directement modifier la pénétration de l'insecticide dans l'organisme (Vontas et al. 2007, Djouaka et al. 2008), ces changements peuvent avoir des effets non négligeables sur la tolérance des moustiques aux insecticides. D'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress (stress oxydant, protéines de la chaîne de transport d'électrons mitochondrial...) sont induits par les xénobiotiques. Des réponses similaires liées au changement de l'environnement chimique ont été observées dans d'autres études (Williams et al. 2008). Certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans la production ou dans le catabolisme cellulaire comme, l'ATP

synthase, la NADPH déshydrogénase, les trypsines et lipases sont communément induits par de nombreux xénobiotiques, ce qui suggère une réponse globale au stress (Palmfeldt et al. 2009, Pereira et al. 2010). Cependant, une des difficultés majeures de cette étude aura été de différencier la réponse globale au stress et la réponse spécifique à l'exposition à certains xénobiotiques. De plus, la question de l'impact de la réponse globale au stress sur la tolérance des moustiques aux insecticides se pose. En effet, dans les études écotoxicologiques de terrain, il a été montré que la réponse globale au stress constituait un facteur déterminant dans la réponse des organismes aux stress chimiques. Ainsi, le stress global provoqué par l'exposition des larves de moustiques aux polluants pourrait augmenter de façon non spécifique la résistance des larves aux insecticides. Chez les nématodes par exemple, après application d'un stress thermique chez des individus exposés ou non à des xénobiotiques, l'intensité de la réponse en milieu pollué est supérieure (van der Wurff et al. 2007).

Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes d'induction/répression croisés entre xénobiotiques et montrent que les gènes de détoxification dont l'étude a été principalement abordée au cours de cette thèse ne constituent vraisemblablement qu'une partie des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse aux xénobiotiques. Nos résultats semblent aussi indiquer que la réponse adaptative des moustiques aux xénobiotiques (y compris aux insecticides chimiques) est le plus souvent d'origine multigénique et non la conséquence de la modification d'un seul locus.

Les gènes de détoxification constituent des familles géniques dont l'expression est régulée par de nombreux facteurs intrinsèques (sexe, système immunitaire, stade de développement, etc.) et extrinsèques (température, alimentation, environnement chimique etc.) (Feyereisen 2005). L'induction des enzymes de détoxification peut être la conséquence d'interactions complexes entre des facteurs de régulation trans et des éléments de régulation cis présents en amont ou au sein des gènes (Waxman 1999, Xu et al. 2005). Certaines séquences cis régulant l'expression des enzymes de détoxification ont été identifiées chez les insectes (McDonnell et al. 2004). Nous pouvons citer entre autres la séquence XRE (xenobiotic response element) sur laquelle se fixe le récepteur Ah des HAPs et de la dioxine (McDonnell et al. 2004, Brown et al. 2005) ou encore la séquence EcRE (ecdysone response element) sur laquelle se fixe le récepteur à l'hormone de mue chez la drosophile (Gilbert et al. 2002). Concernant les mécanismes de régulation impliqués dans l'induction des gènes de détoxification chez *Ae. aegypti*, nos études *in silico* ne nous ont pas permis de dégager de réponse claire. En effet, il est apparu difficile de trouver des corrélations entre la présence

d'éléments de régulation en amont des gènes et l'induction de ces gènes par les polluants ou insecticides (Publication I) ou bien d'autres facteurs comme les hormones ou le stress oxydant (Publication II). Afin de préciser le rôle des éléments de régulation dans la réponse des moustiques aux xénobiotiques et insecticides, d'autres expérimentations plus lourdes sont nécessaires. Par exemple, chez *D. melanogaster*, une étude a permis de situer la région où se trouvaient les éléments de régulation impliqués dans l'induction de deux gènes CYP6A2 et CYP6A8 (sur cellules d'insectes et drosophiles mutantes). En couplant le gène Luc codant pour la luciférase avec différentes portions des régions en amont de ces deux gènes, les auteurs ont montré que les éléments de régulation activés par la caféine se trouvaient dispersés dans les régions -983/-126 et -761/-109 pour CYP6A2 et CYP6A8. Dans ces régions se trouvent de nombreux sites de fixation pour la protéine activatrice I (AP1) et pour les protéines activatrices d'éléments de réponse AMP cyclique (CRE-BP) (Bhaskara et al. 2006). De façon similaire, des études approfondies des régions promotrices des gènes de détoxification chez *Ae. aegypti*, pourraient permettre d'identifier les éléments de régulation impliqués dans l'induction des gènes de détoxification par les xénobiotiques.

3/ L'environnement, un cocktail de molécules

Dans notre étude, dans le but de mieux comprendre les interactions entre différents xénobiotiques, seules des molécules isolées et substances actives d'insecticides ou herbicides ont été utilisées pour les pré-expositions et/ou les bioessais. Un pesticide commercial est généralement formé d'une ou plusieurs substances actives et d'adjuvants. La ou les matières actives confèrent la toxicité au pesticide mais sont difficilement utilisables en tant que telles. Les adjuvants d'origines chimiques très variées vont accroître l'efficacité (et donc le rendement) des substances actives, par exemple en améliorant la pénétration dans l'organisme ciblé. Cependant, des études ont montré que les formulations pouvaient parfois être plus toxiques pour les organismes non cibles que les substances actives seules (Schmuck et al. 1994). Un exemple est celui du glyphosate qui est un herbicide très utilisé dans le monde et souvent considéré comme « propre » d'un point de vue environnemental. Pourtant, plusieurs études mettent en avant depuis quelques années la nocivité de certaines formulations célèbres telles que le Round-up® et le Vision® sur les amphibiens notamment. Cette toxicité pour les organismes non cibles serait liée majoritairement à la présence dans la formulation d'un surfactant largement utilisé : la tallowamine polyéthoxylée (POEA) (Servizi et al. 1987, Mann

et Bidwell 1999, Relyea et Jones 2009). De même, il serait intéressant d'étudier l'impact de certains formulants sur la biologie des larves de moustiques notamment leur capacité à induire ou réprimer les enzymes de biotransformation.

D'autres molécules pourraient avoir un impact non négligeable sur la tolérance des moustiques aux insecticides. C'est notamment le cas des « safeners » (ou « plant antidotes »), souvent présents dans les formulations d'herbicides utilisées en agriculture. Les safeners représentent un groupe de composés chimiques très divers possédant la capacité d'induire la protection de la plante d'intérêt des dégâts causés par l'herbicide sans pour autant réduire l'efficacité de cet herbicide sur les mauvaises herbes ciblées. Le premier safener commercialisé a été le naphthalic anhydre en 1971 pour protéger les plants de maïs contre les herbicides de la famille des thiocarbamates (Abu-Qare et Duncan 2002). Cette protection de la plante contre l'herbicide passe par une induction de l'expression d'enzymes de détoxification (CYPs, GSTs, et autres) capables de métaboliser l'herbicide (Riechers et al. 2010). Le spectre d'induction des safeners étant généralement large, ils sont le plus souvent appliqués directement sur la plante ou près de la plante que l'on veut protéger par pelliculage des graines par exemple. Actuellement, à notre connaissance, il n'existe pas d'études traitant de pollution environnementale par les safeners. Cependant, si ces composés sont capables d'induire les enzymes de détoxification chez les plantes, il est probable qu'ils engendrent un effet comparable sur ces mêmes enzymes chez les insectes et par conséquent peuvent avoir un impact sur leur tolérance aux insecticides.

Enfin, nous n'avons utilisé dans notre étude que quelques molécules modèles avec des durées d'exposition relativement courtes. Dans certains environnements aquatiques, de très nombreux polluants peuvent être présents en mélange à des doses variables (Palma et al. 2010). Etant donné le fort impact démontré de quelques xénobiotiques seuls sur la tolérance des moustiques aux insecticides, la question de l'effet cumulatif de mélanges de différents polluants sur la capacité des larves à tolérer les insecticides est posée. De même, étudier l'effet d'une exposition aux polluants pendant tout le développement larvaire devrait aussi permettre de mieux appréhender les phénomènes susceptibles de se produire dans l'environnement naturel des moustiques. Ainsi, il serait possible de réaliser des expérimentations de terrain pour essayer d'appréhender ce phénomène dans des situations réelles. Par exemple, il serait intéressant de réaliser des prélèvements d'eaux provenant de gîtes larvaires pollués ou non et d'y transférer de jeunes larves de moustiques sensibles durant leur développement avant de tester leur tolérance aux différents types d'insecticides

chimiques par bioessais. Après une analyse chimique complète des polluants présents dans ces eaux, il devrait être possible de montrer que la présence de certains polluants ou de certaines combinaisons de polluants est susceptible de limiter l'effet des traitements insecticides. Des analyses moléculaires sur les moustiques issus de ces milieux permettraient alors d'identifier les mécanismes impliqués.

Au cours de cette première partie, l'impact des xénobiotiques sur la tolérance des moustiques a été abordé ainsi que les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués (effet à court terme). Les gîtes larvaires étant continuellement contaminés par des composés anthropogéniques, la question de leur impact sur le long terme se pose. En effet, plusieurs études de terrain ont souligné les rôles potentiels des polluants et pesticides utilisés en agriculture dans la sélection des mécanismes de résistances aux insecticides. En 2008, une étude a mis en évidence l'impact potentiel des pesticides utilisés dans les cultures de coton sur les niveaux de résistance aux pyréthrinoïdes et les mécanismes de résistance métabolique chez *An. arabiensis* au Cameroun (Muller et al. 2008a). Plus récemment, une autre étude a suggéré que les niveaux importants de résistances observés dans plusieurs populations d'*Anopheles* (échantillonnées dans trois pays africains) pouvaient s'expliquer par l'utilisation des pesticides en agriculture (Ranson et al. 2009). Cependant, cela reste des suppositions et l'impact des xénobiotiques environnementaux sur la sélection de mécanismes de résistance particuliers n'a pu être clairement démontré. Sur le terrain, un grand nombre de facteurs environnementaux peuvent influencer les processus de sélection et il est parfois difficile de dissocier les effets combinés de l'induction de certains gènes suite à l'exposition des larves à certains xénobiotiques (effet à court terme) et de la sélection de mécanismes de résistance particuliers (effet à long terme). Pour répondre à cette question, d'autres approches, notamment en conditions contrôlées de laboratoire sont nécessaires et sont discutées dans le paragraphe suivant.

II/ Impact des xénobiotiques environnementaux sur le long terme.

1/ Approche expérimentale en laboratoire

Afin de démontrer le rôle potentiel des contaminants chimiques environnementaux sur les mécanismes de résistance des populations de moustiques, nous avons utilisé une approche originale basée sur l'étude de trois souches d'*Ae. aegypti* apparentées, sélectionnées avec l'insecticide perméthrine et exposées ou non à différents xénobiotiques. Entre les trois souches résistantes à la perméthrine (Noexp-Perm, Fluo-Perm et Perm-Perm), les niveaux de résistance ne présentent pas de différences importantes. Grâce à l'utilisation d'une puce à ADN (Agilent Aedes chip 8x 15K) représentant plus de 14 200 gènes d'*Ae. aegypti*, nous avons montré que **l'exposition de larves de moustiques à des contaminants chimiques pouvait influencer la sélection de certains gènes par l'insecticide** (Publication V). En effet, un plus grand nombre de gènes différentiellement transcrits ont été identifiés chez les souches exposées à des doses sublétales de fluoranthène ou de perméthrine (souche Fluo-Perm et Perm-Perm) avant sélection. Un autre résultat intéressant est le plus grand nombre de gènes codant pour des enzymes de détoxification retrouvés sur-transcrits (surtout des CYPs) dans les souches Fluo-Perm et Perm-Perm confortant l'hypothèse de leur rôle dans l'adaptation des moustiques aux xénobiotiques. Parmi ces gènes, plusieurs sont aussi inductibles par les xénobiotiques comme CYP6M11, CYP6N12 et CYP6AG7 confirmant ainsi les interactions entre plasticité phénotypique (induction/répression) et sélection (sur- ou sous-expression constitutive). Les gènes CYP6M11 ainsi que CYP6AG7 sont également sur-transcrits dans au moins une souche d'*Ae. aegypti* résistante au pyréthrianoïde deltaméthrine et au téméphos (Publication VI) confirmant leur rôle potentiel dans la résistance métabolique.

Plusieurs UDP-GT sont aussi différemment transcrites chez les différentes souches sélectionnées avec la perméthrine. Ces enzymes de phase II sont également connues pour leur rôle dans la conjugaison des xénobiotiques (Kern et al. 1997). Enfin, de nombreux autres gènes codant pour d'autres enzymes telles que des deshydrogénases mais aussi des aldo-keto réductases sont sur-transcrits chez les souches sélectionnées. Ces résultats suggèrent que d'autres protéines et enzymes que celles classiquement dites « de détoxification » sont aussi susceptibles d'être impliquées dans la résistance des moustiques aux insecticides et que d'autres mécanismes que la métabolisation peuvent aussi contribuer à la tolérance à

l'insecticide (pénétration réduite, meilleure réponse au stress, séquestration par des enzymes telles que les hexamérines, etc.).

Afin de compléter cette étude de laboratoire, d'autres expérimentations pourraient être réalisées. Tout d'abord, la sélection de ces trois souches doit être poursuivie afin d'étudier si les écarts entre les niveaux de résistance des souches s'amplifient ou bien si l'exposition aux xénobiotiques n'a que peu d'effet sur le niveau de résistance. En effet, une question essentielle à laquelle nous n'avons pas pu répondre clairement pour le moment est de savoir si l'exposition des larves de moustiques à des contaminants environnementaux peut accélérer ou bien ralentir l'apparition de la résistance. Il serait aussi intéressant de savoir si la résistance se maintient chez les adultes étant donné que seules les larves ont été sélectionnées, et si oui, est-ce que ce sont les mêmes gènes qui sont différenciellement transcrits ? De la même manière, il me semble intéressant de tester la capacité de résistance de chaque souche à d'autres insecticides chimiques que la perméthrine (OPs, OCs, carbamates, néonicotinoïdes, autres pyréthrinoides) de manière à savoir si l'exposition aux xénobiotiques peut favoriser la sélection fortuite de gènes impliqués dans la résistance croisée à certains insecticides. Enfin, une dernière expérimentation pourrait consister à exposer ou non les larves des trois souches résistantes à certains polluants (fluoranthène et perméthrine) afin d'évaluer et de tenter de corréler le potentiel d'induction et de tolérance aux insecticides de chacune. Ce type d'expérimentations apportera aussi de nouvelles données sur la relation entre la capacité d'une enzyme de détoxification à être induite par un composé chimique et sa capacité à métaboliser ce même composé.

Afin de valider le rôle de certains gènes dans le métabolisme des pyréthrinoides, une caractérisation fonctionnelle plus approfondie est nécessaire. Les approches seront discutées dans la partie III de la discussion. Enfin, une dernière étude permettant de mieux caractériser les trois souches résistantes serait d'évaluer le coût de la résistance en mesurant entre autres la durée de vie des moustiques, les caractères morphologiques, la fécondité des femelles et le succès reproductif des mâles, etc.

2/ Validation sur le terrain

L'étude de plusieurs populations d'*Aedes aegypti* multi-résistantes à la deltaméthrine et au téméphos en Martinique (Publication VI et VII) a permis de mieux comprendre les

mécanismes de résistance. Ces populations présentent une forte fréquence de la mutation *kdr* couplée à de la résistance métabolique. Par ailleurs, l'intérêt particulier porté à ces populations de Martinique résidait dans les problèmes de pollutions aux pesticides présents sur cette île. Par exemple, dans certains cours d'eau, des concentrations jusqu'à 57 µg/L de Chlordécone, un organochloré désormais interdit, ont été trouvées (Bocquene et Franco 2005, Coat et al. 2006). Bien que les analyses en composante principale (ACP) n'aient pas montré de corrélations significatives entre la pollution aux organochlorées et les mécanismes de résistances, plusieurs CYPs comme CYP6M11 et CYP6Z8 sont sur-transcrits chez *Ae. aegypti* à la Martinique. Ces gènes figurent parmi nos gènes candidats potentiellement impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques. De plus, CYP6M11 est également sur-transcrit chez nos trois souches de laboratoire résistantes à la perméthrine, confortant son rôle potentiel dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez *Ae. aegypti*. Enfin, ces résultats semblent aussi confirmer que certains gènes de détoxification peuvent être induits par des xénobiotiques environnementaux et être impliqués dans le métabolisme des insecticides chimiques.

De manière globale, ces études de terrain en collaboration avec l'équipe du LIN de l'IRD Montpellier ont apporté de nombreux éléments à ce travail de thèse. Concernant l'impact potentiel des polluants (notamment organochlorés) sur les mécanismes de résistances des populations d'*Ae. aegypti*, elles montrent la complexité de travailler sur le terrain compte tenu du nombre de paramètres à prendre en compte et l'importance de combiner cette approche avec une étude en système simplifié en laboratoire.

III/ L'approche « gène candidat »: une stratégie pour identifier les gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques

1/ Une multitude de candidats potentiels

Afin de déterminer quels gènes répondaient potentiellement à l'exposition des larves aux xénobiotiques, des approches transcriptomiques ont été utilisées.

Les études de transcription de gènes s'inscrivent parfaitement dans l'identification des gènes impliqués dans la **réponse plastique** de plusieurs populations soumises ou non à des

changements environnementaux (Hoffmann et Willi 2008). Cependant, une des limites des approches à haut débit comme les puces à ADN ou la méthode de séquençage massif d'ADN complémentaires réside dans le grand nombre de gènes identifiés comme différentiellement transcrits. Toutes les inductions ou répressions de gènes ne sont pas forcément directement liées au changement des conditions environnementales (exposition à des polluants par exemple). Une étude a par exemple comparé les résultats de puces à ADN de plusieurs études traitant de l'impact d'un déficit en eau sur la biologie d'*Arabidopsis thaliana*. Sur les trois études, plus de 800 gènes étaient sur-transcrits mais finalement seulement 27 gènes étaient communément retrouvés dans les trois études (Bray 2004). Ce très faible nombre de gènes est sûrement lié aux conditions expérimentales qui n'étaient pas exactement identiques (conditions de maintenance des plantes, âge des plantes), ou bien à des génotypes utilisés différents. Néanmoins, elle met en évidence l'impact de la variation biologique sur la transcription des gènes et souligne clairement l'importance **de multiplier et croiser les expérimentations** afin de répondre à une question biologique donnée. L'autre limitation des approches à haut débit concerne l'analyse des résultats. Dans la publication IV par exemple, l'exposition de larves de moustiques à certains xénobiotiques comme le propoxur et l'imidaclopride modifie le niveau de transcription de 318 et 239 gènes respectivement (étude sur le transcriptome entier). Dans ces situations, une analyse uniquement gène par gène n'est pas concevable et d'autres approches sont utiles. Plusieurs outils existent pour hiérarchiser les jeux de données (« **clustering** ») permettant ainsi de dégager des **grands patrons de transcription** (Eisen et al. 1998, Laderas et McWeeney 2007). Les approches par clustering se basant uniquement sur des rapports de transcriptions, peuvent être complétées avec d'autres **approches plus fonctionnelles** comme l'étude des catégories fonctionnelles représentées par les termes GO (Gene Ontology) (Topalis et al. 2008). L'ontologie des gènes consiste à classer les gènes selon leur fonction probable dans trois grandes catégories GO (cellular component, biological process and molecular function) elles-mêmes subdivisées en sous-catégories hiérarchisées. Des outils statistiques permettent de mesurer l'enrichissement d'une ou plusieurs catégories parmi les gènes significativement sur- ou sous-transcrits par rapport à tous les gènes du jeu de données transcriptomique (Bauer et al. 2008, Huang et al. 2009). Dans notre cas, nous avons procédé à des analyses d'enrichissement en GO terms chez nos souches résistantes avec le logiciel « ontologizer » (Bauer et al. 2008) mais ces analyses sont forcément biaisées puisqu'une partie importante du génome d'*Ae. aegypti* n'est pas associée à des termes GO. De plus, nous avons remarqué que l'identification de termes GO sur-représentés à l'aide de ce logiciel pouvait être biaisé lorsque le nombre de gènes trouvés

différemment transcrits est faible (mauvaise gestion des tests de correction multiple). Aussi, il m'apparaît important de souligner qu'il convient de se méfier des annotations de génomes et des analyses statistiques automatisées sur les grands jeux de données.

Une autre approche intéressante serait de combiner nos résultats de transcriptomique avec d'autres approches telles que la **métabolomique**. Cette discipline récente s'intéresse à la caractérisation du métabolisme à l'échelle globale. En comparant par exemple des organismes exposés ou non à des xénobiotiques, il est possible de répertorier tous les métabolites présents dans les cellules, tissus, organes et fluides biologiques et d'avoir une vision globale du métabolisme et des mécanismes potentiellement impliqués (Kaddurah-Daouk et al. 2008). Cette approche peut utiliser différents outils tels que la chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse ou bien la résonance magnétique nucléaire. Bien sûr, de puissants outils de bioinformatiques sont aussi nécessaires pour traiter les données car la taille des jeux de données obtenus est importante. Une étude récente, s'est notamment intéressée aux interactions entre plantes et insectes en étudiant le métabolome chez l'insecte et sa plante hôte. Elle a mis en évidence de nouveaux composés bioactifs impliqués dans les interactions entre plantes et leurs herbivores (Jansen et al. 2009). Dans une autre étude, les approches transcriptomique et métabolomique ont été combinées afin de d'étudier la réponse de différentes souches de riz à l'infection par la bactérie *Xanthomonas oryzae*. Ce protocole s'est montré efficace pour l'étude approfondie de processus complexes tels que l'infection d'un organisme par un pathogène et l'immunité (Sana et al. 2010). Des outils statistiques permettant de corrélérer les données métabolomiques et transcriptomiques ont déjà été développés (Bylesjo et al. 2007)(Figure 41). En utilisant ces approches sur des moustiques exposés ou non à des xénobiotiques et insecticides, il serait alors possible d'obtenir une vision plus complète des mécanismes impliqués dans la réponse aux xénobiotiques chez les moustiques.

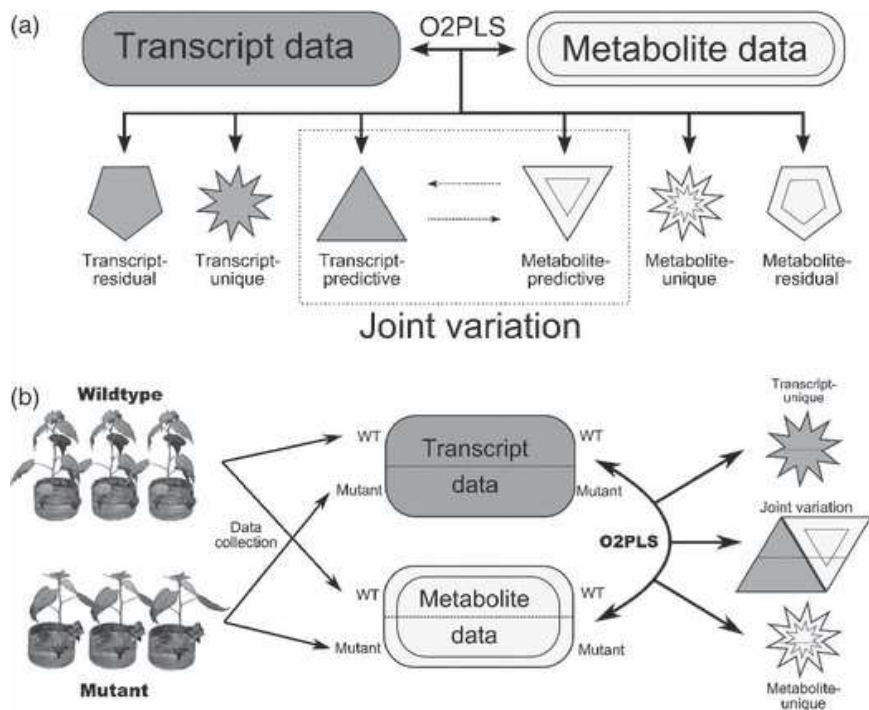


Figure 41: Exemple d'approche combinant transcriptomique et métabolomique d'après (Bylesjo et al. 2007)

Afin de détecter les **gènes potentiellement impliqués dans la résistance** à la perméthrine des trois souches Noexp-Perm, Fluo-Perm et Perm-Perm, une approche à haut débit par puces à ADN a également été utilisée. Cette approche a permis de détecter les gènes différemment transcrits par rapport à la souche non sélectionnée et potentiellement impliqués dans la résistance à la perméthrine. Cependant, elle ne permet pas de détecter la résistance liée à des mutations ou à la sélection d'allèles particuliers. Par exemple, une variation de la séquence protéique d'une enzyme de détoxification (mutation ou variation allélique) peut entraîner une meilleure métabolisation de l'insecticide sans qu'il y ait surexpression du gène pour autant. D'autres approches sont donc nécessaires telles que les approches QTL (quantitative trait loci) qui permettent de détecter les régions du génome dans lesquelles des changements adaptatifs ont pris place, incluant des changements génétiques et altérations protéiques (Hoffmann et Willi 2008). Ces approches sont relativement lourdes à réaliser mais apportent de nombreux éléments utiles à la compréhension des processus de sélection. Elles permettent également de détecter les résistances liées à des éléments transposables, séquences ADN capables de se déplacer, de se multiplier et de s'insérer dans d'autres régions du génome. Ainsi, chez la drosophile, la sur-transcription de *CYP6G1*, responsable de la résistance au DDT est liée à l'insertion d'un élément transposable en amont du gène (Schmidt et al. 2010).

Enfin, les études au niveau du transcriptome entier (niveau d'expression et variations de séquence des ARNm) par « RNA sequencing » sont en cours de développement au LECA. Pour cela, les ARN totaux issus des trois souches résistantes à la perméthrine ont aussi été utilisés pour réaliser des banques d'ADNc ensuite séquencées sur Genome Analyzer II solexa (plus de 60 millions de séquences de 75 pb obtenues par souche) et les résultats sont actuellement en cours d'analyse bioinformatique. Cette approche permettra de travailler sur l'ensemble du transcriptome tout en validant les résultats précédemment obtenus avec les puces à ADN. Cette approche devrait aussi permettre de s'affranchir un peu plus de l'annotation encore imparfaite du génome (localisation des gènes) et d'identifier d'autres mécanismes impliqués dans la régulation des gènes liés à la résistance aux insecticides et la réponse aux xénobiotiques (nouveaux gènes, transcrits alternatifs, ARN de régulation, variations alléliques...). Néanmoins, il faut noter que l'approche par « RNA sequencing » ne permet pas à l'heure actuelle de mesurer précisément les fréquences alléliques car celles-ci sont biaisées par les différences d'expression des ARN messagers correspondants.

2/ Validation fonctionnelle

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à développer différentes méthodes basées sur le principe de l'ARN interférent chez des larves de moustiques. L'intérêt de cette approche était de pouvoir inhiber spécifiquement l'expression d'un gène (un gène de détoxification par exemple) pour pouvoir tester par bioessais son rôle dans la tolérance à l'insecticide. Malheureusement, aucune de ces approches n'a été concluante et ce travail méthodologique reste inachevé. Considérant le grand nombre de paramètres (gène visé, localisation des transcrits, design des ARNdb, transport de ARNdb etc...) intervenant dans les processus mis en jeu, il nous apparaît aujourd'hui difficile d'identifier le ou les paramètres à optimiser. Cependant, la méthode de l'ARN interférent sur larves de moustiques au pu, à notre connaissance être appliquée dans deux études : l'une par injection d'ARNdb (Blitzer et al. 2005) et l'autre par ingestion d'ARNdb (Zhang et al. 2010). Dans la deuxième étude, des ARNdb couplés à des nanoparticules ont permis d'éteindre de plus de 60% les transcrits du gène AgCH1 codant pour la chitin synthase. Cette étude montre l'importance de concentrer les molécules d'ARNdb sur un support ingérable par les larves afin d'améliorer l'efficacité de la technique. L'autre solution envisageable est de travailler sur adultes où visiblement les expérimentations par ARN interférent sont plus simples à mettre en œuvre.

Une autre approche pouvant être utilisée pour démontrer l'implication des gènes dans la métabolisation des insecticides est l'expression hétérologue des enzymes de détoxification. Le principe global de la méthode est de produire l'enzyme codée par le gène candidat en système hétérologue et de mettre ensuite en présence l'enzyme avec le xénobiotique et de mesurer sa métabolisation. Cette caractérisation fonctionnelle comprend plusieurs étapes longues et délicates. Le gène est d'abord cloné dans un plasmide permettant l'expression de la protéine correspondante en système hétérologue (bactérie, levure ou bien cellules d'insectes) et sa surexpression grâce à un promoteur inductible. Les CYPs sont des enzymes membranaires qui pour leur fonctionnement ont besoin de cofacteurs (NADPH cytochrome P450 réductase entre autre), de NADPH, etc. La difficulté est donc de recréer un système enzymatique in-vitro fonctionnel comprenant ces éléments. Différents facteurs peuvent empêcher l'expression in vitro de la protéine. Le premier est la différence de codage des protéines selon les organismes : un biais au niveau des codons aboutit à la synthèse de protéines tronquées non fonctionnelles. L'absence de fonctionnalité peut également provenir d'une mauvaise conformation de la protéine, liée par exemple à un ancrage membranaire inadapté (Larbat et al. 2007, Larbat et al. 2009). Une fois la protéine produite et purifiée, des expériences de métabolisme de divers substrats potentiels de l'enzyme doivent être réalisées. Cependant, ces techniques sont relativement complexes notamment au niveau de leur mise au point (HPLC, spectrographe de masse). Cette approche est actuellement en cours de développement au LECA par Alexia Chandor-Proust qui cherche à exprimer en système levure différents CYPs comme CYP6Z6, CYP6Z8, CYP6M11, CYP6N12. L'expression de la glutathion S-tranfêrase GSTe7 a aussi été réalisée avec succès chez E. coli. Cette approche ne peut malheureusement s'appliquer qu'aux gènes susceptibles de métaboliser les insecticides. Les autres gènes candidats, qui pourraient intervenir de façon indirecte dans la métabolisation des insecticides ne peuvent être validés que par l'approche ARNi.

Ainsi ces deux approches sont complémentaires. En effet, l'utilisation de la technique de l'ARN interférent va permettre de dire si oui ou non, le gène code pour une protéine impliquée dans l'augmentation de tolérance à l'insecticide sans aucun à priori des mécanismes impliqués. L'approche par expression en système hétérologue permettra quant-à-elle de tester la capacité de différentes enzymes à métaboliser l'insecticide, sans pour autant démontrer leur importance relative dans le phénotype observé.

D'autres approches fonctionnelles, plus lourdes et nécessitant l'usage de souches transgéniques existent. Une première méthode consiste à créer une ligné transgénique où le

gène ciblé a été éteint ou altéré (« Gene knockout ») (Rong et Golic 2001) puis d'observer ensuite le phénotype pour déterminer la fonction. Une autre approche permet de contrôler l'expression du gène ciblé par l'intermédiaire du système UAS-GAL4. Ce système est largement utilisé chez la drosophile pour la surexpression ciblée de transgènes et permet ainsi de déterminer leur fonction. Grâce à cette méthode, il a été montré par exemple que la surexpression induite du gène CYP12A4 dans l'intestin et les tubes de Malpighi entraîne une amélioration de la tolérance vis-à-vis du lufenuron chez la drosophile (Bogwitz et al. 2005). De la même manière, des niveaux de résistance plus importants ont été trouvés dans des lignées de drosophile surexprimant CYP6G1 (pour DDT, nitenpyram et dicyclanil), CYP6G2 (pour nitenpyram et diazinon) et CYP12D1 (pour DDT et dicyclanil) (Daborn et al. 2007).

IV/ Conclusion

Dans leur environnement naturel, les larves de moustiques sont continuellement exposées à des xénobiotiques d'origine naturelle ou anthropique. Jusque-là, peu d'études se sont intéressées à leur impact potentiel sur la biologie des moustiques. Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer que l'exposition de larves de moustiques à des doses environnementales de polluants ou de résidus d'insecticides n'entraînant pas de mortalité pouvait modifier leur tolérance aux insecticides chimiques mais aussi entraîner des changements importants au niveau de la transcription de nombreux gènes dont certains codant pour des enzymes de détoxification.

A plus long terme, j'ai pu montrer que des expositions répétées à des polluants combinées à une sélection avec un insecticide pouvaient affecter la sélection des gènes notamment en favorisant la sélection de gènes potentiellement impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques.

Le recouplement de plusieurs approches aura permis de dégager plusieurs gènes candidats comme CYP6M11, CYP6N12 et CYP6Z8 potentiellement impliqués dans les interactions gènes environnement et le métabolisme des insecticides. La priorité pour la suite sera d'une part la caractérisation fonctionnelle de ces gènes candidats en combinant des approches par ARN interférent sur moustiques adultes couplées à des bioessais et d'autre part de mesurer le métabolisme des insecticides par ces enzymes exprimées en système hétérologue.

D'un point de vue fondamental et appliqué, cette thèse a permis une meilleure compréhension de l'impact de l'environnement chimique sur les mécanismes de résistance des populations de moustiques aux insecticides. Ces mécanismes sont illustrés dans la Figure 42. Cette étude aura d'une part confirmé le rôle de certaines familles enzymatiques comme les CYPs dans la protection de l'organisme vis-à-vis des xénobiotiques mais aussi dégagé de nombreux autres mécanismes pouvant être impliqués dans la réponse des moustiques à leur environnement chimique. Dans les milieux contaminés par des xénobiotiques, le phénotype observé chez les insectes est la **résultante de nombreuses composantes** liées d'une part à la **sélection** de certains processus (modification du génome) et d'autre part à la **plasticité phénotypique** des individus, ces deux processus d'adaptation interagissant l'un avec l'autre de façon complexe (Figure 42). Afin de compléter ces recherches majoritairement réalisées en

laboratoire, d'autres approches de validation sur le terrain sont nécessaires (utilisation de souches issues de zones polluées ou non, bioessais avec des eaux de terrain polluées, etc...). Ces travaux permettront d'apporter des réponses afin d'optimiser les traitements insecticides en milieux pollués permettant une meilleure gestion des populations de moustiques.

En raison de la complexité des questions biologiques posées dans cette thèse, des expérimentations à très haut débit étaient nécessaires. Les très grands jeux de données obtenus ont apporté de nombreuses réponses mais ont également soulevé de nombreux autres points d'interrogation. Le facteur limitant pour l'interprétation des résultats se situe aujourd'hui dans l'analyse des données et dans l'annotation incomplète des génomes. De plus, il est essentiel de varier les méthodes et les outils d'analyse de données afin d'extraire des jeux de données le plus de réponses possibles. L'avenir permettra aussi de combiner ces approches de transcriptomique avec d'autres approches de protéomique et de métabolomique.

Par l'originalité de son approche combinant environnement et biologie des moustiques ainsi que de par sa pluridisciplinarité, cette thèse aura été très enrichissante et passionnante. Ayant décidé de poursuivre dans ce domaine de recherche, je travaillerai au cours de mon futur post-doctorat à l'école de médecine tropicale de Liverpool (LSTM), sur la compréhension des mécanismes de résistances aux insecticides chez *An. gambiae*. Cela passera par le développement de nouveaux outils de criblage global mais aussi par la caractérisation fonctionnelle de gènes potentiellement impliqués dans la résistance des moustiques aux insecticides.

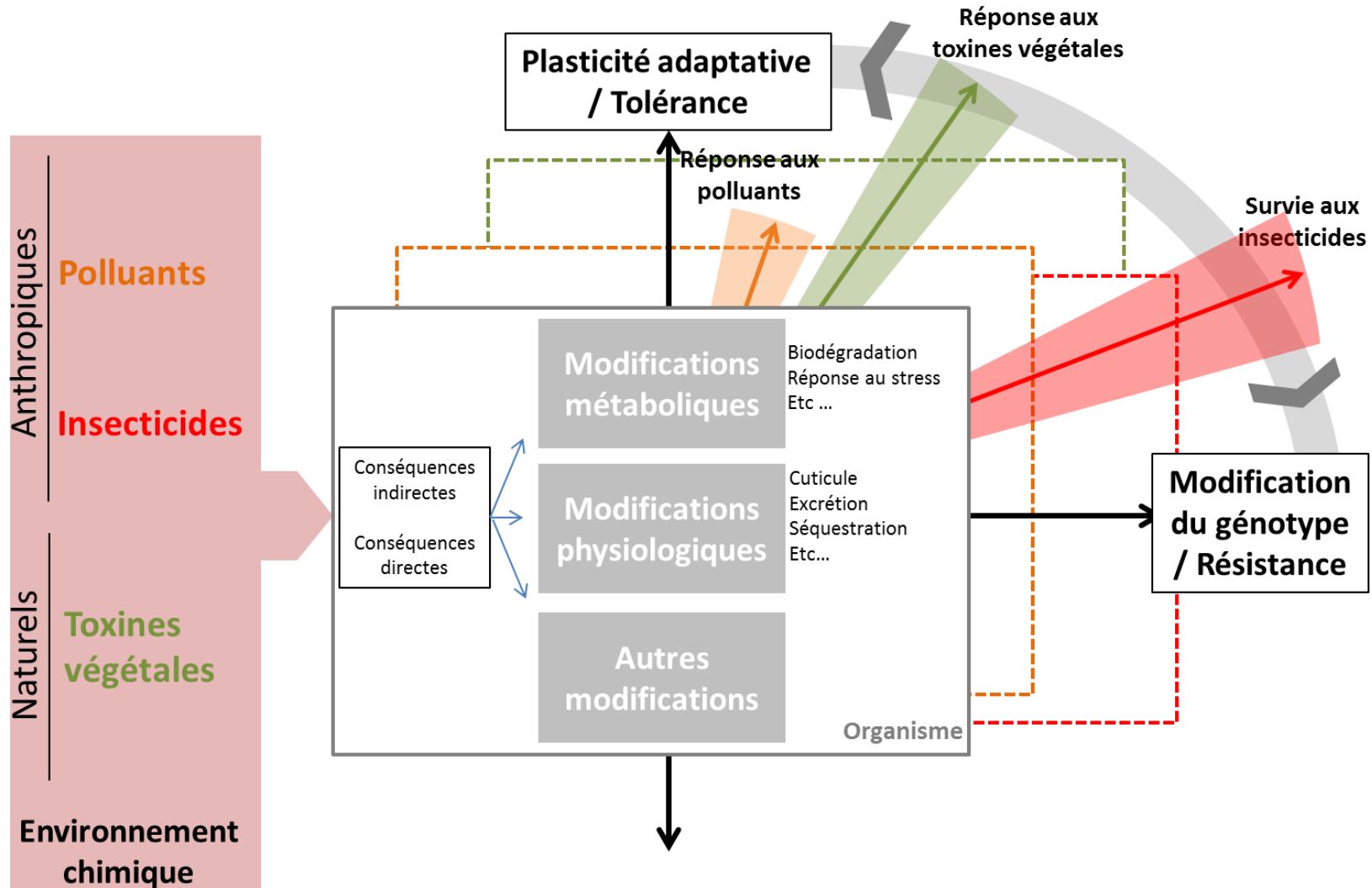


Figure 42 : Schéma de synthèse décrivant les mécanismes adaptatifs de la réponse des moustiques à la pression de l'environnement chimique. Le phénotype (= réponse) observé apparaît comme la résultante de deux grandes composantes que sont la plasticité phénotypique et la modification du génotype. Cette dernière est influencée par quatre forces majeures que sont la sélection, la mutation, la migration et la dérive génétique. Des interactions entre plasticité phénotypique et modification du génotype sont susceptibles de se produire dans les deux sens. Ainsi l'organisme, sous la pression de son environnement, va s'adapter en modifiant son phénotype et son génotype de façon à optimiser sa valeur adaptative au fil des générations.

- Abu-Qare, A. W. and H. J. Duncan. 2002. Herbicide safeners: uses, limitations, metabolism, and mechanisms of action. *Chemosphere* **48**:965-974.
- Akogbeto, M. C., R. F. Djouaka, and D. A. Kinde-Gazard. 2006. Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malaria Journal* **5**.
- Aldridge, W. N. 1953a. Serum esterases .1. 2 Types of esterase (a and b) hydrolysing para-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal* **53**:110-117.
- Aldridge, W. N. 1953b. Serum esterases .2. An enzyme hydrolysing diethyl para-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the a-esterase of mammalian sera. *Biochemical Journal* **53**:117-124.
- Aldridge, W. N. 1993. The esterases - Perspectives and problems. *Chemico-Biological Interactions* **87**:5-13.
- Amichot, M., A. Brun, A. Cuany, G. De Souza, T. Le Mouel, J. M. Bride, M. Babault, J. P. Salaun, R. Rahmani, and J. B. Berge. 1998. Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant, to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **121**:311-319.
- Andersen, J. F., J. G. Utermohlen, and R. Feyereisen. 1994. Expression of house fly CYP6A1 and nadph cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing p450 system. *Biochemistry* **33**:2171-2177.
- Anthony, N. M., E. A. Benner, J. J. Rauh, and D. B. Sattelle. 1991. GABA receptors of insects susceptible and resistant to cyclodiene insecticides. *Pesticide Science* **33**:223-230.
- Apperson, C. S. and G. P. Georghiou. 1975. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *Journal of Economic Entomology* **68**:153-157.
- Autorino, G. L., A. Battisti, V. Deubel, G. Ferrari, R. Forletta, A. Giovannini, R. Lelli, S. Murri, and M. T. Scicluna. 2002. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerging Infectious Diseases* **8**:1372-1378.
- Awolola, T. S., O. A. Oduola, C. Strobe, L. L. Koekemoer, B. Brooke, and H. Ranson. 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**:1139-1145.
- Ayad, H. and G. P. Georghiou. 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* Diptera Culicidae based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Journal of Economic Entomology* **68**:295-297.
- Backlund, M. and M. Ingelman-Sundberg. 2005. Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cellular Signalling* **17**:39-48.
- Baek, J. H., J. M. Clark, and S. H. Lee. 2010. Cross-strain comparison of cypermethrin-induced cytochrome P450 transcription under different induction conditions in diamondback moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **96**:43-50.

- Ballant, P. 2006. Rapport sur le suivi de la qualité de l'eau par rapport au paramètre "Produits Phytosanitaires". Conseil général des ponts et chaussées, Paris.
- Bass, C., I. Schroeder, A. Turberg, L. M. Field, and M. S. Williamson. 2004. Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera : Pulicidae). *Pest Management Science* **60**:1157-1162.
- Bassett, M. H., J. L. McCarthy, M. R. Waterman, and T. J. Sliter. 1997. Sequence and developmental expression of Cyp18, a member of a new cytochrome P450 family from *Drosophila*. *Molecular and Cellular Endocrinology* **131**:39-49.
- Bauer, S., S. Grossmann, M. Vingron, and P. N. Robinson. 2008. Ontologizer 2.0--a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinformatics* **24**:1650-1651.
- Baum, J. A., T. Bogaert, W. Clinton, G. R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn, and J. Roberts. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* **25**:1322-1326.
- Bautista, M. A. M., T. Miyata, K. Miura, and T. Tanaka. 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**:38-46.
- Benedict, M. Q., R. S. Levine, W. A. Hawley, and L. P. Lounibos. 2007. Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **7**:76-85.
- Berger, E. M. and E. B. Dubrovsky. 2005. Juvenile hormone molecular actions and interactions during development of *Drosophila melanogaster*. Pages 175-215 *Insect Hormones*, Vol 73. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.
- Bhaskara, S., E. D. Dean, V. Lam, and R. Ganguly. 2006. Induction of two cytochrome P450 genes, CYP6A2 and CYP6A8, of *Drosophila melanogaster* by caffeine in adult flies and in cell culture. *Gene* **377**:56-64.
- Bisset, J. A., M. M. Rodriguez, C. Diaz, E. Ortiz, M. C. Marquetti, and J. Hemingway. 1990. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) from Cuba. *Bulletin of Entomological Research* **80**:245-250.
- Blitzer, E. J., I. Vyazunova, and Q. Lan. 2005. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* **14**:301-307.
- Bocquene, G. and A. Franco. 2005. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Marine Pollution Bulletin* **51**:612-619.
- Bogwitz, M. R., H. Chung, L. Magoc, S. Rigby, W. Wong, M. O'Keefe, J. A. McKenzie, P. Batterham, and P. J. Daborn. 2005. CYP12A4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:12807-12812.
- Bonning, B. C. and J. Hemingway. 1991. The efficacy of acetylcholinesterase in organophosphorus and carbamate resistance in *Culex pipiens* l. from Italy. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **40**:143-148.

- Boyer, S., J. P. David, D. Rey, G. Lemperiere, and P. Ravanel. 2006. Response of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: Larval tolerance and detoxifying enzyme activities. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**:470-476.
- Brandt, A., M. Scharf, J. H. F. Pedra, G. Holmes, A. Dean, M. Kreitman, and B. R. Pittendrigh. 2002. Differential expression and induction of two *Drosophila* cytochrome P450 genes near the Rst(2)DDT locus. *Insect Molecular Biology* **11**:337-341.
- Brattsten, L. B., C. F. Wilkinson, and T. Eisner. 1977. Herbivore-plant interactions, mixed-function oxidases and secondary plant substances. *Science* **196**:1349-1352.
- Bray, E. A. 2004. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **55**:2331-2341.
- Brooke, B. D., R. H. Hunt, T. S. Matambo, L. L. Koekemoer, P. Van Wyk, and M. Coetzee. 2006. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Medical and Veterinary Entomology* **20**:294-299.
- Brown, A. W. A. 1978. *Ecology of Pesticides*. John Wiley & Sons, New-York.
- Brown, R. P., C. M. McDonnell, M. R. Berenbaum, and M. A. Schuler. 2005. Regulation of an insect cytochrome P450 monooxygenase gene (CYP6B1) by aryl hydrocarbon and xanthotoxin response cascades. *Gene* **358**:39-52.
- Bull, D. L. and C. J. Whitten. 1972. Factors influencing organophosphorus insecticide resistance in tobacco budworms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **20**:561-&.
- Burmester, T. 1999. Evolution and function of the insect hexamerins. *European Journal of Entomology* **96**:213-225.
- Bylesjo, M., D. Eriksson, M. Kusano, T. Moritz, and J. Trygg. 2007. Data integration in plant biology: the O2PLS method for combined modeling of transcript and metabolite data. *Plant Journal* **52**:1181-1191.
- Campbell, P. M., R. D. Newcomb, R. J. Russell, and J. G. Oakeshott. 1998. Two different amino acid substitutions in the ali esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**:139-150.
- Chandre, F., F. Darriet, M. Darder, A. Cuany, J. M. C. Doannio, N. Pasteur, and P. Guillet. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Medical and Veterinary Entomology* **12**:359-366.
- Chhabra, M., V. Mittal, D. Bhattacharya, U. V. S. Rana, and S. Lal. 2008. Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. *Indian Journal of Medical Microbiology* **26**:5-12.
- Chiu, T. L., Z. M. Wen, S. G. Rupasinghe, and M. A. Schuler. 2008. Comparative molecular modeling 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.
- Chung, H., M. R. Bogwitz, C. McCart, A. Andrianopoulos, R. H. Ffrench-Constant, P. Batterham, and P. J. Daborn. 2007. Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene CYP6G1. *Genetics* **175**:1071-1077.

- Claridge-Chang, A., H. Wijnen, F. Naef, C. Boothroyd, N. Rajewsky, and M. W. Young. 2001. Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* **32**:657-671.
- Clark, A. G. and N. A. Shamaan. 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the housefly is a Glutathione s-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**:249-261.
- Claudianos, C., H. Ranson, R. M. Johnson, S. Biswas, M. A. Schuler, M. R. Berenbaum, R. Feyereisen, and J. G. Oakeshott. 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology* **15**:615-636.
- Claudianos, C., R. J. Russell, and J. G. Oakeshott. 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**:675-686.
- Clements, A. N. 1992. *Biology Of Mosquitoes : Development, Nutrition And Reproduction* Chapman & Hall, London.
- Coat, S., G. Bocquene, and E. Godard. 2006. Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. *Aquatic Living Resources* **19**:181-187.
- Daborn, P. J., C. Lumb, A. Boey, W. Wong, R. H. Ffrench-Constant, and P. Batterham. 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**:512-519.
- Daborn, P. J., J. L. Yen, M. R. Bogwitz, G. Le Goff, E. Feil, S. Jeffers, N. Tijet, T. Perry, D. Heckel, P. Batterham, R. Feyereisen, T. G. Wilson, and R. H. ffrench-Constant. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* **297**:2253-2256.
- David, J. P., C. Strode, J. Vontas, D. Nikou, A. Vaughan, P. M. Pignatelli, C. Louis, J. Hemingway, and H. Ranson. 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:4080-4084.
- Delaunay, P., C. Jeannin, F. Schaffner, and P. Marty. 2009. News on the presence of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in metropolitan France. *Archives De Pediatrie* **16**:S66-S71.
- Desousa, G., A. Cuany, A. Brun, M. Amichot, R. Rahmani, and J. B. Berge. 1995. A microfluorometric method for measuring ethoxycoumarin-o-deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: Interest for screening resistance in insect populations. *Analytical Biochemistry* **229**:86-91.
- Despres, L., J. P. David, and C. Gallet. 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:298-307.
- Ding, Y. C., N. Hawkes, J. Meredith, P. Eggleston, J. Hemingway, and H. Ranson. 2005. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochemical Journal* **387**:879-888.
- Djouaka, R. F., A. A. Bakare, H. S. Bankole, J. M. C. Doannio, O. N. Coulibaly, H. Kossou, M. Tamo, H. I. Basene, O. K. Popoola, and M. C. Akogbeto. 2007. Does the spillage

- of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance? *Malaria Journal* **6**.
- Djouaka, R. F., A. A. Bakare, O. N. Coulibaly, M. C. Akogbeto, H. Ranson, J. Hemingway, and C. Strode. 2008. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *Bmc Genomics* **9**.
- Ecker, J. R. and R. W. Davis. 1986. Inhibition of gene-expression in plant-cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:5372-5376.
- Edwards, M. J. and M. Jacobs-Lorena. 2000. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology* **46**:1313-1320.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:14863-14868.
- Enayati, A. and J. Hemingway. 2010. Malaria Management: Past, Present, and Future. *Annual Review of Entomology* **55**:569-591.
- Enayati, A. A., H. Ranson, and J. Hemingway. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* **14**:3-8.
- Enserink, M. 2007. Infectious diseases - Chikungunya: No longer a Third World disease. *Science* **318**:1860-1861.
- Etienne, M. 2006. Thèse de doctorat: Etude de la bioécologie d'*Aedes aegypti* à la Martinique en relation avec l'épidémiologie de la dengue. Université Montpellier I, Montpellier.
- Faulde, M. K., G. Albiez, and O. Nehring. 2010. Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. *Parasitology Research* **106**:957-965.
- Fernandes, M. B., M. A. Sicre, A. Boireau, and J. Tronczynski. 1997. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* **34**:857-867.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology* **44**:507-533.
- Feyereisen, R. 2005. Insect Cytochrome P450 in: *Comprehensive Molecular Insect Science*. ed. L. I. Gilbert, K. Iatrou & S.S. Gill edition. Elsevier.
- ffrench-Constant, R. H., P. J. Daborn, and G. Le Goff. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics* **20**:163-170.
- ffrench-Constant, R. H., B. Pittendrigh, A. Vaughan, and N. Anthony. 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **353**:1685-1693.
- Ffrench-Constant, R. H., T. A. Rocheleau, J. C. Steichen, and A. E. Chalmers. 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* **363**:449 - 451.

- Fire, A., S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
- Fouchecourt, M. O. and J. L. Riviere. 1996. Activities of liver and lung cytochrome P450-dependent monooxygenases and antioxidant enzymes in laboratory and wild Norway rats exposed to reference and contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **30**:513-522.
- Frank, M. R. and J. C. Fogleman. 1992. Involvement of cytochrome-p450 in host-plant utilization by sonoran desert *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:11998-12002.
- Gabinaud, A., G. Vigo, J. Cousserans, M. Roux, N. Pasteur, and H. Croset. 1985. La mammophilie des populations de *Culex pipiens pipiens* L., 1758 dans le sud de la France; variations de ce caractère en fonction de la nature des biotopes de développement larvaire, des caractéristiques physico-chimiques de leurs eaux et des saisons. *Cahiers - ORSTOM. Entomologie médicale et parasitologie* **23**:123-132.
- Garfinkel, D. 1958. Studies on pig liver microsomes . Enzymes and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys* **77**:493-509.
- Ghalambor, C. K., J. K. McKay, S. P. Carroll, and D. N. Reznick. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* **21**:394-407.
- Gilbert, L. I., R. Rybczynski, and J. T. Warren. 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology* **47**:883-916.
- Goksoyr, A. and A. M. Husoy. 1998. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. . *EXS* **86**:165–202
- Gould, E. A. and S. Higgs. 2009. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**:109-121.
- Green, C. A., R. F. Gass, L. E. Munstermann, and V. Baimai. 1990. Population-genetic evidence for 2 species in *Anopheles minimus* in Thailand. *Medical and Veterinary Entomology* **4**:25-34.
- Guengerich, F. P. 1995. Cytochrome P450 proteins and potential utilization in biodegradation. *Environmental Health Perspectives* **103**:25-28.
- Gui, Z. Z., C. X. Hou, T. Liu, G. X. Qin, M. W. Li, and B. Jin. 2009. Effects of insect viruses and pesticides on Glutathione s-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. *Journal of Economic Entomology* **102**:1591-1598.
- Guittard, E., C. Blais, A. Maria, J. P. Parvy, S. Pasricha, C. Lumb, R. Lafont, P. J. Daborn, and C. Dauphin-Villemant. 2011. CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Developmental Biology* **349**:35-45.
- Guzov, V. M., G. C. Unnithan, A. A. Chernogolov, and R. Feyereisen. 1998. CYP12A1, a mitochondrial cytochrome P450 from the house fly. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **359**:231-240.

- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione s-transferases, first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**:7130-7139.
- Hamon, J. 1963. L'importance des changements de comportement chez les insectes. *Bull World Health Organ.* **29**:115-120.
- Hardstone, M. C., C. A. Leichter, and J. G. Scott. 2009. Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monoxygenase detoxification, in mosquitoes. *Journal of Evolutionary Biology* **22**:416-423.
- Harrison, T. L., A. R. Zangerl, M. A. Schuler, and M. R. Berenbaum. 2001. Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a hostplant allelochemical. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **48**:179-189.
- Hauerland, N. H. and W. S. Bowers. 1986. Binding of insecticides to lipophorin and arylphorin, 2 hemolymph-proteins of *Heliothis zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **3**:87-96.
- Hawkes, N. J. and J. Hemingway. 2002. Analysis of the promoters for the beta-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* **1574**:51-62.
- Hayes, J. D. and C. R. Wolf. 1990. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochemical Journal* **272**:281-295.
- Hemingway, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**:1009-1015.
- Hemingway, J., L. Field, and J. Vontas. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science* **298**:96-97.
- Hemingway, J., N. Hawkes, L. A. Prapanthadara, K. G. I. Jayawardenal, and H. Ranson. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **353**:1695-1699.
- Hemingway, J., N. J. Hawkes, L. McCarroll, and H. Ranson. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**:653-665.
- Hemingway, J. and S. Karunaratne. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* **12**:1-12.
- Hemingway, J. and H. Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* **45**:371-391.
- Hines, R. N. and D. G. McCarver. 2002. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: Phase I oxidative enzymes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **300**:355-360.
- Hoffmann, A. A. and Y. Willi. 2008. Detecting genetic responses to environmental change. *Nat Rev Genet* **9**:421-432.
- Holt, J. S. and H. M. Lebaron. 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology* **4**:141-149.

- Hosie, A. M., K. Aronstein, D. B. Sattelle, and R. H. ffrenchConstant. 1997. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in Neurosciences* **20**:578-583.
- Huang, D. W., B. T. Sherman, and R. A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**:44-57.
- Huang, F. F., C. L. Chai, Z. Zhang, Z. H. Liu, F. Y. Dai, C. Lu, and Z. H. Xiang. 2008. The UDP-glucosyltransferase multigene family in *Bombyx mori*. *Bmc Genomics* **9**.
- Huang, H. S., N. T. Hu, Y. E. Yao, C. Y. Wu, S. W. Chiang, and C. N. Sun. 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**:651-658.
- Hubalek, Z. and J. Halouzka. 1999. West Nile fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* **5**:643-650.
- Hunt, R. H., B. D. Brooke, C. Pillay, L. L. Koekemoer, and M. Coetzee. 2005. Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Medical and Veterinary Entomology* **19**:271-275.
- Jakoby, W. B. and D. M. Ziegler. 1990. The enzymes of detoxication. *Journal of Biological Chemistry* **265**:20715-20718.
- Jamroz, R. C., F. D. Guerrero, D. M. Kammlah, and S. E. Kunz. 1998. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**:1031-1037.
- Jansen, J. J., J. W. Allwood, E. Marsden-Edwards, W. H. van der Putten, R. Goodacre, and N. M. van Dam. 2009. Metabolomic analysis of the interaction between plants and herbivores. *Metabolomics* **5**:150-161.
- Jaubert-Possamai, S., G. Le Trionnaire, J. Bonhomme, G. K. Christophides, C. Rispe, and D. Tagu. 2007. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Bmc Biotechnology* **7**.
- Jayawardena, K. G. I., S. Karunaratne, A. J. Ketterman, and J. Hemingway. 1994. Determination of the role of elevated b(2)-esterase in insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) from studies on the purified enzyme. *Bulletin of Entomological Research* **84**:39-44.
- Kaddurah-Daouk, R., B. S. Kristal, and R. M. Weinshilboum. 2008. Metabolomics: A global biochemical approach to drug response and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**:653-683.
- Kamath, R. S. and J. Ahringer. 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**:313-321.
- Karunaratne, S., K. G. I. Jayawardena, J. Hemingway, and A. J. Ketterman. 1993. Characterization of a b-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal* **294**:575-579.
- Kasai, S. and J. G. Scott. 2000. Overexpression of cytochrome P450CYP6D1 is associated with monooxygenase mediated pyrethroid resistance in house flies from Georgia. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **68**:34-41.

- Kern, A., A. Bader, R. Pichlmayr, and K. F. Sewing. 1997. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochemical Pharmacology* **54**:761-772.
- Klingenberg, M. 1958. Pigments of liver microsomes. . *Arch. Biochem. Biophys.* **75**:376-386.
- Kostaropoulos, I., A. I. Papadopoulos, A. Metaxakis, E. Boukouvala, and E. Papadopoulou-Mourkidou. 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**:313-319.
- La Ruche, G., Y. Souares, A. Armengaud, F. Peloux-Petiot, P. Delaunay, P. Despres, A. Lenglet, F. Jourdain, I. Leparç-Goffart, F. Charlet, L. Ollier, K. Mantey, T. Mollet, J. P. Fournier, R. Torrents, K. Leitmeyer, P. Hilairret, H. Zeller, W. Van Bortel, D. Dejour-Salamanca, M. Grandadam, and M. Gastellu-Etchegorry. 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance* **15**:2-6.
- Labbé, R., S. Caveney, and C. Donly. 2011. Genetic analysis of the xenobiotic resistance-associated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*:no-no.
- Laderas, T. and S. McWeeney. 2007. Consensus framework for exploring microarray data using multiple clustering methods. *Omics-a Journal of Integrative Biology* **11**:116-128.
- Larbat, R., A. Hehn, J. Hans, S. Schneider, H. Jugde, B. Schneider, U. Matern, and F. Bourgaud. 2009. Isolation and functional characterization of CYP71AJ4 encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **284**:4776-4785.
- Larbat, R., S. Kellner, S. Specker, A. Hehn, E. Gontier, J. Hans, F. Bourgaud, and U. Matern. 2007. Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **282**:542-554.
- Le Goff, G., F. Hilliou, B. D. Siegfried, S. Boundy, E. Wajnberg, L. Sofer, P. Audant, R. H. Ffrench-Constant, and R. Feyereisen. 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**:674-682.
- Lee, S. H., J. S. Kang, J. S. Min, K. S. Yoon, J. P. Strycharz, R. Johnson, O. Mittapalli, V. M. Margam, W. Sun, H. M. Li, J. Xie, J. Wu, E. F. Kirkness, M. R. Berenbaum, B. R. Pittendrigh, and J. M. Clark. 2010. Decreased detoxification genes and genome size make the human body louse an efficient model to study xenobiotic metabolism. *Insect Molecular Biology* **19**:599-615.
- Lepoivre, P. 2003. *Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. De Boeck Université
- Li, X. C., M. A. Schuler, and M. R. Berenbaum. 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature* **419**:712-715.
- Li, Y., S. Baldauf, E. K. Lim, and D. J. Bowles. 2001. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**:4338-4343.
- Limon-Pacheco, J. and M. E. Gonsebatt. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **674**:137-147.

- Lindberg, R. L. P. and M. Negishi. 1989. Alteration of mouse cytochrome P450 C₁ substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature* **339**:632-634.
- Lindquist, A. W. and H. G. Wilson. 1948. Development of a strain of houseflies resistant to DDT. *Science* **107**:276-276.
- Liu, H., E. W. Cupp, A. G. Guo, and N. N. Liu. 2004. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *Journal of Medical Entomology* **41**:946-952.
- Liu, Z. Q., S. M. Valles, and K. Dong. 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**:991-997.
- Lounibos, L. P. 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* **47**:233-266.
- Lumjuan, N., L. McCarroll, L. A. Prapanthadara, J. Hemingway, and H. Ranson. 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.
- Luque, T. and D. R. O'Reilly. 2002. Functional and phylogenetic analyses of a putative *Drosophila melanogaster* UDP-glycosyltransferase gene. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**:1597-1604.
- Lycett, G. J., L. A. McLaughlin, H. Ranson, J. Hemingway, F. C. Kafatos, T. G. Loukeris, and M. J. I. Paine. 2006. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Molecular Biology* **15**:321-327.
- Lynch, J. A. and C. Desplan. 2006. A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nature Protocols* **1**:486-494.
- Ma, R. L., M. B. Cohen, M. R. Berenbaum, and M. A. Schuler. 1994. Black swallowtail (*Papilio polyxenes*) alleles encode cytochrome P450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **310**:332-340.
- Mackenzie, P. I., I. S. Owens, B. Burchell, K. W. Bock, A. Bairoch, A. Belanger, S. FournelGigleux, M. Green, D. W. Hum, T. Iyanagi, D. Lancet, P. Louisot, J. Magdalou, J. R. Chowdhury, J. K. Ritter, H. Schachter, T. R. Tephly, K. F. Tipton, and D. W. Nebert. 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**:255-269.
- Maire, A. 1983. Sélectivité des femelles de moustiques (Culicidae) pour leurs sites d'oviposition: Etat de la question. *Rev. Canadian Biol. Experimental* **42**:235-241.
- Malavige, G. N., S. Fernando, D. J. Fernando, and S. L. Seneviratne. 2004. Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal* **80**:588-601.
- Mann, R. M. and J. R. Bidwell. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **36**:193-199.
- Manohar, D., D. Gullipalli, and A. Dutta-Gupta. 2010. Ecdysteroid-mediated expression of hexamerin (arylphorin) in the rice moth, *Corcyra cephalonica*. *Journal of Insect Physiology* **56**:1224-1231.

- Mao, Y. B., W. J. Cai, J. W. Wang, G. J. Hong, X. Y. Tao, L. J. Wang, Y. P. Huang, and X. Y. Chen. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* **25**:1307-1313.
- Marie, S. and T. Cresteil. 1989. Phenobarbital inducible gene expression in developing rat-liver relationship to hepatocyte function. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1009**:221-228.
- Marquardt, W. C. 2005. *Biology of disease vectors*, second edition. Elsevier Academic Press.
- Martinez-Torres, D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Berge, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur, and D. Pauron. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* **7**:179-184.
- Martinez-Torres, D., C. Chevillon, A. Brun-Barale, J. B. Berge, N. Pasteur, and D. Pauron. 1999. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pesticide Science* **55**:1012-1020.
- McCarver, D. G. and R. N. Hines. 2002. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: Phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **300**:361-366.
- McDonnell, C. M., R. P. Brown, M. R. Berenbaum, and M. A. Schuler. 2004. Conserved regulatory elements in the promoters of two allelochemical-inducible cytochrome P450 genes differentially regulate transcription. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**:1129-1139.
- Mireji, P. O., J. Keating, A. Hassanali, C. M. Mbogo, H. Nyambaka, S. Kahindi, and J. C. Beier. 2008. Heavy metals in mosquito larval habitats in urban Kisumu and Malindi, Kenya, and their impact. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **70**:147-153.
- Mortensen, A. S. and A. Arukwe. 2007. Effects of 17 alpha-ethynylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* **85**:113-123.
- Mouches, C., N. Pasteur, J. B. Berge, O. Hyrien, M. Raymond, B. R. Desaintvincent, M. Desilvestri, and G. P. Georghiou. 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science* **233**:778-780.
- Muller, P., M. Chouaibou, P. Pignatelli, J. Etang, E. D. Walker, M. J. Donnelly, F. Simard, and H. Ranson. 2008a. Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Molecular Ecology* **17**:1145-1155.
- Muller, P., M. J. Donnelly, and H. Ranson. 2007. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *Bmc Genomics* **8**.
- Muller, P., E. Warr, B. J. Stevenson, P. M. Pignatelli, J. C. Morgan, A. Steven, A. E. Yawson, S. N. Mitchell, H. Ranson, J. Hemingway, M. J. I. Paine, and M. J. Donnelly. 2008b. Field caught permethrin resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *Plos Genetics* **4**.

- Murataliev, M. B., V. M. Guzov, F. A. Walker, and R. Feyereisen. 2008. P450 reductase and cytochrome b(5) interactions with cytochrome P450: Effects on house fly CYP6A1 catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**:1008-1015.
- Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**:279-289.
- Narbonne, J. F., J. E. Djomo, D. Ribera, V. Ferrier, and P. Garrigues. 1999. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **42**:1-8.
- Nebert, D. W., M. Adesnik, M. J. Coon, R. W. Estabrook, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson, B. Kemper, W. Levin, I. R. Phillips, R. Sato, and M. R. Waterman. 1987. The P450 gene superfamily recommended nomenclature. *DNA-a Journal of Molecular & Cellular Biology* **6**:1-11.
- Nelson, D. R., T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda, and D. W. Nebert. 1993. The P450 superfamily update on new sequences, gene-mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* **12**:1-51.
- Nene, V., J. R. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. J. Tu, B. Loftus, Z. Y. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. H. Ren, E. M. Zdobnov, N. F. Lobo, K. S. Campbell, S. E. Brown, M. F. Bonaldo, J. S. Zhu, S. P. Sinkins, D. G. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P. W. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R. V. Bruggner, J. Costas, M. R. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. deBruyn, D. DeCaprio, K. Eiglmeier, E. Eisenstadt, H. El-Dorry, W. M. Gelbart, S. L. Gomes, M. Hammond, L. I. Hannick, J. R. Hogan, M. H. Holmes, D. Jaffe, J. S. Johnston, R. C. Kennedy, H. Koo, S. Kravitz, E. V. Kriventseva, D. Kulp, K. LaButti, E. Lee, S. Li, D. D. Lovin, C. H. Mao, E. Mauceli, C. F. M. Menck, J. R. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A. L. Nascimento, H. F. Naveira, C. Nusbaum, S. O'Leary, J. Orvis, M. Pertea, H. Quesneville, K. R. Reidenbach, Y. H. Rogers, C. W. Roth, J. R. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E. O. Stinson, J. M. C. Tubio, J. P. VanZee, S. Verjovski-Almeida, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. D. Zeng, Q. Zhao, Y. M. Zhao, C. A. Hill, A. S. Raikhel, M. B. Soares, D. L. Knudson, N. H. Lee, J. Galagan, S. L. Salzberg, I. T. Paulsen, G. Dimopoulos, F. H. Collins, B. Birren, C. M. Fraser-Liggett, and D. W. Severson. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**:1718-1723.
- Nikou, D. 2003. Thèse de doctorat: Molecular analysis of multiple cytochrome P450s from the malaria vector *Anopheles gambiae*, Thèse soutenue à l'Ecole de Medecine Tropicale de Liverpool(LSTM).
- Nikou, D., H. Ranson, and J. Hemingway. 2003. An adult-specific CYP6P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* **318**:91-102.
- Niwa, R., T. Matsuda, T. Yoshiyama, T. Namiki, K. Mita, Y. Fujimoto, and H. Kataoka. 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* **279**:35942-35949.

- OMS. 2009a. World Health Organization global programme to eliminate Lymphatic filariasi. Organisme Mondial de la Santé, Genève.
- OMS. 2009b. World Malaria Report 2009. Organisme Mondial de la Santé, Geneva.
- Omura, T. and R. Sato. 1964. Carbon monoxide binding pigment of liver microsomes .i. evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry* **239**:2370-&.
- Ortelli, F., L. C. Rossiter, J. Vontas, H. Ranson, and J. Hemingway. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* **373**:957-963.
- Owen, J., B. A. Hedley, C. Svendsen, J. Wren, M. J. Jonker, P. K. Hankard, L. J. Lister, S. R. Sturzenbaum, A. J. Morgan, D. J. Spurgeon, M. L. Blaxter, and P. Kille. 2008. Transcriptome profiling of developmental and xenobiotic responses in a keystone soil animal, the oligochaete annelid *Lumbricus rubellus*. *Bmc Genomics* **9**:266.
- Palma, P., P. Alvarenga, V. Palma, C. Matos, R. M. Fernandes, A. Soares, and I. R. Barbosa. 2010. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research* **17**:703-716.
- Palmfeldt, J., S. Vang, V. Stenbroen, C. B. Pedersen, J. H. Christensen, P. Bross, and N. Gregersen. 2009. Mitochondrial proteomics on human fibroblasts for identification of metabolic imbalance and cellular stress. *Proteome Science* **7**.
- Patz, J. A., P. R. Epstein, T. A. Burke, and J. M. Balbus. 1996. Global climate change and emerging infectious diseases. *Jama-Journal of the American Medical Association* **275**:217-223.
- Peiris, H. T. R. and J. Hemingway. 1993. Characterization and inheritance of elevated esterases in organophosphorus and carbamate insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) from Sri-lanka. *Bulletin of Entomological Research* **83**:127-132.
- Pennetier, C. 2008. Thèse de doctorat: Interactions entre insecticides non-pyréthroïdes et répulsifs pour la lutte contre *Anopheles gambiae* : Mécanismes, efficacité et impact sur la sélection de la résistance. Université de Montpellier I, Thèse soutenue à Montpellier.
- Pereira, J. L., C. J. Hill, R. M. Sibly, V. N. Bolshakov, F. Goncalves, L. H. Heckmann, and A. Callaghan. 2010. Gene transcription in *Daphnia magna*: Effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. *Aquatic Toxicology* **97**:268-276.
- Perera, M. D. B., J. Hemingway, and S. Karunaratne. 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malaria Journal* **7**.
- Petersen, R. A., A. R. Zangerl, M. R. Berenbaum, and M. A. Schuler. 2001. Expression of CYP6B1 and CYP6B3 cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera : Papilionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**:679-690.
- Petrulis, J. R. and G. H. Perdew. 2002. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chemico-Biological Interactions* **141**:25-40.

- Petryk, A., J. T. Warren, G. Marques, M. P. Jarcho, L. I. Gilbert, J. Kahler, J. P. Parvy, Y. T. Li, C. Dauphin-Villemant, and M. B. O'Connor. 2003. Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:13773-13778.
- Pialoux, G., B. A. Gauzere, and M. Strobel. 2006. Chikungunya virus infection: review through an epidemic. *Medecine Et Maladies Infectieuses* **36**:253-263.
- Plapp, F. W. 1984. The genetic basis of insecticide resistance in the housefly: evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**:194-201.
- Plewka, A., M. Kaminski, and D. Plewka. 1997. The influence of age and some inducers on UDP-glucuronyltransferase activity. *Experimental Gerontology* **32**:305-313.
- Pondeville, E., A. Maria, J. C. Jacques, C. Bourguoin, and C. Dauphin-Villemant. 2008. Anopheles gambiae males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:19631-19636.
- Pozza, G. D. and G. Majori. 1992. 1st record of Aedes albopictus establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association* **8**:318-320.
- Prapanthadara, L. A., J. Hemingway, and A. J. Ketterman. 1993. Partial purification and characterization of Glutathione s-Transferases involved in DDT resistance from the mosquito Anopheles gambiae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **47**:119-133.
- Price, D. R. G. and J. A. Gatehouse. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology* **26**:393-400.
- Puinean, A. M., S. P. Foster, L. Oliphant, I. Denholm, L. M. Field, N. S. Millar, M. S. Williamson, and C. Bass. 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid Myzus persicae. *Plos Genetics* **6**.
- Radomska-Pandya, A., P. J. Czernik, J. M. Little, E. Battaglia, and P. I. Mackenzie. 1999. Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism Reviews* **31**:817-899.
- Ramade, F. 2007. Introduction à l'écotoxicologie – Fondements et applications. Éditions TEC & DOC, France.
- Ramphul, U., T. Boase, C. Bass, L. M. Okedi, M. J. Donnelly, and P. Muller. 2009. Insecticide resistance and its association with target-site mutations in natural populations of Anopheles gambiae from eastern Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**:1121-1126.
- Ranasinghe, C., M. Headlam, and A. A. Hobbs. 1997. Induction of the mRNA for CYP6B2, a pyrethroid inducible cytochrome P450, in Helicoverpa armigera (Hubner) by dietary monoterpenes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **34**:99-109.
- Ranson, H., H. Abdallah, A. Badolo, W. M. Guelbeogo, C. Kera-Hinzoumbe, E. Yangalbe-Kalnane, N. Sagnon, F. Simard, and M. Coetzee. 2009. Insecticide resistance in Anopheles gambiae: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malaria Journal* **8**.

- Ranson, H., C. Claudianos, F. Ortelli, C. Abgrall, J. Hemingway, M. V. Sharakhova, M. F. Unger, F. H. Collins, and R. Feyereisen. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* **298**:179-181.
- Ranson, H., L. Rossiter, F. Ortelli, B. Jensen, X. L. Wang, C. W. Roth, F. H. Collins, and J. Hemingway. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* **359**:295-304.
- Raymond, M., D. Fournier, J. M. Bride, A. Cuany, J. Berge, M. Magnin, and N. Pasteur. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* **79**:1452-1458.
- Raymond, M., N. Pasteur, D. Fournier, A. Cuany, J. Berge, and M. Magnin. 1985. Genetics of a propoxur insensitive acetylcholinesterase responsible for resistance in *Culex pipiens* I. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **300**:509-512.
- Relyea, R. A. and D. K. Jones. 2009. The toxicity of roundup original max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**:2004-2008.
- Rendic, S. and F. J. DiCarlo. 1997. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews* **29**:413-580.
- Resh, V. H. and R. T. Cardé. 2003. *The Encyclopedia of Insects*. Academic Press.
- Rewitz, K. F., R. Rybczynski, J. T. Warren, and L. I. Gilbert. 2006. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochemical Society Transactions* **34**:1256-1260.
- Rezza, G., L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, A. C. Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, C. Fortuna, S. Boros, F. Magurano, G. Silvi, P. Angelini, M. Dottori, M. G. Ciufolini, G. C. Majori, A. Cassone, and C. S. Grp. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* **370**:1840-1846.
- Ribeiro, C. A. O., Y. Vollaire, A. Sanchez-Chardi, and H. Roche. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology* **74**:53-69.
- Riechers, D. E., K. Kreuz, and Q. Zhang. 2010. Detoxification without Intoxication: Herbicide Safeners Activate Plant Defense Gene Expression. *Plant Physiology* **153**:3-13.
- Roche, H., Y. Vollaire, A. Persic, A. Buet, C. Oliveira-Ribeiro, E. Coulet, D. Banas, and F. Ramade. 2009. Organochlorines in the Vaccares Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France). *Environmental Pollution* **157**:2493-2506.
- Rong, Y. S. and K. G. Golic. 2001. A targeted gene knockout in *Drosophila*. *Genetics* **157**:1307-1312.
- Rosine, J. 1999. Resistance d'*Aedes aegypti* et de *Culex pipiens quinquefasciatus* aux insecticide organophosphorés, biologique et aux pyrèthrinoides en Martinique et en Guadeloupe. Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

- Ryan, G. F. 1970. Resistance of common groundsel to Simazine and Atrazine. *Weed Science* **18**:614-&.
- Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Reztantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, and J. Quackenbush. 2003. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**:374-+.
- Salinas, A. E. and M. G. Wong. 1999. Glutathione S-transferases - A review. *Current Medicinal Chemistry* **6**:279-309.
- Salvan, M. and J. Mouchet. 1994. *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* on the island of La Reunion. *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale* **74**:323-326.
- Sana, T. R., S. Fischer, G. Wohlgemuth, A. Katrekar, K. H. Jung, P. C. Ronald, and O. Fiehn. 2010. Metabolomic and transcriptomic analysis of the rice response to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Metabolomics* **6**:451-465.
- Schenkman, J. B. and I. Jansson. 2003. The many roles of cytochrome b(5). *Pharmacology & Therapeutics* **97**:139-152.
- Schmidt, J. M., R. T. Good, B. Appleton, J. Sherrard, G. C. Raymant, M. R. Bogwitz, J. Martin, P. J. Daborn, M. E. Goddard, P. Batterham, and C. Robin. 2010. Copy number variation and transposable elements feature in recent, ongoing adaptation at the CYP6G1 locus. *Plos Genetics* **6**.
- Schmuck, R., W. Pfuger, R. Grau, U. Holihn, and R. Fischer. 1994. Comparison of short-term aquatic toxicity formulation vs active ingredients of pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **26**:240-250.
- Schuler, T. H., D. Martinez-Torres, A. J. Thompson, I. Denholm, A. L. Devonshire, I. R. Duce, and M. S. Williamson. 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **59**:169-182.
- Schulz, R. 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: A review. *Journal of Environmental Quality* **33**:419-448.
- Scott, J. G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**:757-777.
- Serandour, J., J. Girel, S. Boyer, P. Ravanel, G. Lemperiere, and M. Raveton. 2007. How human practices have affected vector-borne diseases in the past: a study of malaria transmission in Alpine valleys. *Malaria Journal* **6**.
- Serandour, J., J. Willison, W. Thuiller, P. Ravanel, G. Lemperiere, and M. Raveton. 2010. Environmental drivers for *Coquillettidia* mosquito habitat selection: a method to highlight key field factors. *Hydrobiologia* **652**:377-388.
- Servizi, J. A., R. W. Gordon, and D. W. Martens. 1987. Acute toxicity of Garlon-4 and roundup herbicides to salmon, daphnia, and trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **39**:15-22.
- Sinegre, G., B. Gaven, J. L. Jullien, G. Vigo, and S. Karch. 1988. Activit e initiale et résiduelle de *Bacillus sphaericus* dans les gites larvaires a *Culex pipiens* du sud de la france.

- iv, Congrès sur la protection de la sante humaine et des cultures en milieu tropical, Marseille, France.
- Small, G. J. and J. Hemingway. 2000. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology* **9**:647-653.
- Strode, C., C. S. Wondji, J. P. David, N. J. Hawkes, N. Lumjuan, D. R. Nelson, D. R. Drane, S. Karunaratne, J. Hemingway, W. C. Black, and H. Ranson. 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**:113-123.
- Sutherland, T. D., G. C. Unnithan, J. F. Andersen, P. H. Evans, M. B. Murataliev, L. Z. Szabo, E. A. Mash, W. S. Bowers, and R. Feyereisen. 1998. A cytochrome P450 terpenoid hydroxylase linked to the suppression of insect juvenile hormone synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:12884-12889.
- Suwanchaichinda, C. and L. B. Brattsten. 2001. Effects of exposure to pesticides on carbaryl toxicity and cytochrome P450 activities in *Aedes albopictus* larvae (Diptera : Culicidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **70**:63-73.
- Suwanchaichinda, C. and L. B. Brattsten. 2002. Induction of microsomal cytochrome P450s by tire-leachate compounds, habitat components of *Aedes albopictus* mosquito larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **49**:71-79.
- Syvanen, M., Z. H. Zhou, J. Wharton, C. Goldsbury, and A. Clark. 1996. Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *Journal of Molecular Evolution* **43**:236-240.
- Tabunoki, H., S. Higurashi, O. Ninagi, H. Fujii, Y. Banno, M. Nozaki, M. Kitajima, N. Miura, S. Atsumi, K. Tsuchida, H. Maekawa, and R. Sato. 2004. A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Febs Letters* **567**:175-178.
- Takahashi, M. and K. Yasutomi. 1987. Insecticidal resistance of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera, Culicidae) in Japan: genetics and mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides. *Journal of Medical Entomology* **24**:595-603.
- Takken, W. and B. G. J. Knols. 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annual Review of Entomology* **44**:131-157.
- Tang, B., S. G. Wang, and F. Zhang. 2010. Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: Cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. *Bmc Molecular Biology* **11**.
- Theiler, M. and H. H. Smith. 1937. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *Journal of Experimental Medicine* **65**:787-800.
- Thompson, M., F. Shotkoski, and R. Ffrenchconstant. 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow-fever mosquito *Aedes aegypti*. Conservation of the gene and resistance-associated mutation with *Drosophila*. *Febs Letters* **325**:187-190.
- Tijet, N., C. Helvig, and R. Feyereisen. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* **262**:189-198.

- Topalis, P., D. Lawson, F. H. Collins, and C. Louis. 2008. How can ontologies help vector biology? *Trends in Parasitology* **24**:249-252.
- van der Oost, R., J. Beyer, and N. P. E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**:57-149.
- van der Wurff, A. W. G., S. A. E. Kools, M. E. Y. Boivin, P. J. van den Brink, H. H. M. van Megen, J. A. G. Riksen, A. Doroszuk, and J. E. Kammenga. 2007. Type of disturbance and ecological history determine structural stability. *Ecological Applications* **17**:190-202.
- Vanasperen, K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology* **8**:401-&.
- Vaughan, A., N. Hawkes, and J. Hemingway. 1997. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal* **325**:359-365.
- Vaughan, A., M. Rodriguez, and J. Hemingway. 1995. The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable b-esterases from the insecticide resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal* **305**:651-658.
- Vessey, D. A. and D. Zakim. 1974. Stimulation of microsomal uridine-diphosphate glucuronyltransferase by glucuronic acid-derivatives. *Biochemical Journal* **139**:243-249.
- Vontas, J., J. P. David, D. Nikou, J. Hemingway, G. K. Christophides, C. Louis, and H. Ranson. 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology* **16**:315-324.
- Vontas, J. G., G. J. Small, and J. Hemingway. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal* **357**:65-72.
- Vontas, J. G., G. J. Small, D. C. Nikou, H. Ranson, and J. Hemingway. 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.
- Vulule, J. M., R. F. Beach, F. K. Atieli, J. C. McAllister, W. G. Brogdon, J. M. Roberts, R. W. Mwangi, and W. A. Hawley. 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Medical and Veterinary Entomology* **13**:239-244.
- Wakabayashi, K., A. Tamura, H. Saito, Y. Onishi, and T. Ishikawa. 2006. Human ABC transporter ABCG2 in xenobiotic protection and redox biology. *Drug Metabolism Reviews* **38**:371-391.
- Walshe, D. P., S. M. Lehane, M. J. Lehane, and L. R. Haines. 2009. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology* **18**:11-19.
- Warren, J. T., A. Petryk, G. Marques, M. Jarcho, J. P. Parvy, C. Dauphin-Villemant, M. B. O'Connor, and L. I. Gilbert. 2002. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:11043-11048.

- Warren, J. T., A. Petryk, G. Marques, J. P. Parvy, T. Shinoda, K. Itoyama, J. Kobayashi, M. Jarcho, Y. T. Li, M. B. O'Connor, C. Dauphin-Villemant, and L. I. Gilbert. 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**:991-1010.
- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*. Scientific American books, Inc, New-York.
- Waxman, D. J. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**:11-23.
- Weill, M., G. Lutfalla, K. Mogensen, F. Chandre, A. Berthomieu, C. Berticat, N. Pasteur, A. Philips, P. Fort, and M. Raymond. 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* **423**:136-137.
- Wen, Z. M., L. P. Pan, M. R. Berenbaum, and M. A. Schuler. 2003. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**:937-947.
- Whyard, S., A. E. R. Downe, and V. K. Walker. 1995. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**:329-342.
- Whyard, S., A. D. Singh, and S. Wong. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**:824-832.
- Williams, T. D., A. Diab, F. Ortega, V. S. Sabine, R. E. Godfrey, F. Falciani, J. K. Chipman, and S. G. George. 2008. Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants. *Aquatic Toxicology* **90**:83-91.
- Willoughby, L., P. Batterham, and P. J. Daborn. 2007. Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. *Pest Management Science* **63**:803-808.
- Willoughby, L., H. Chung, C. Lumb, C. Robin, P. Batterham, and P. J. Daborn. 2006. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**:934-942.
- Wondji, C. S., H. Irving, J. Morgan, N. F. Lobo, F. H. Collins, R. H. Hunt, M. Coetzee, J. Hemingway, and H. Ranson. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Research* **19**:452-459.
- Wood, O. R., S. Hanrahan, M. Coetzee, L. L. Koekemoer, and B. D. Brooke. 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors* **3**.
- Xu, C. J., C. Y. T. Li, and A. N. T. Kong. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* **28**:249-268.
- Yadouleton, A. W. M., A. Asidi, R. F. Djouaka, J. Braïma, C. D. Agossou, and M. C. Akogbeto. 2009. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malaria Journal* **8**.

- Yang, J., C. McCart, D. J. Woods, S. Terhzaz, K. G. Greenwood, R. H. Ffrench-Constant, and J. A. T. Dow. 2007. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiological Genomics* **30**:223-231.
- Yang, Y. Y., Y. Liu, H. J. Teng, I. Sauman, F. Sehnal, and H. J. Lee. 2010. Circadian control of permethrin-resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* **56**:1219-1223.
- Yébakima, A. 1991. Thèse de Doctorat: Recherche sur *Aedes aegypti* et *Culex pipiens* en Martinique. Ecologie larvaire, Résistance aux Insecticides, Application à la Lutte. . Université Montpellier II.
- Zhang, J., C. Goyer, and Y. Pelletier. 2008. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Molecular Biology* **17**:209-216.
- Zhang, X., J. Zhang, and K. Y. Zhu. 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology* **19**:683-693.
- Zhou, X. J., C. F. Sheng, M. Li, H. Wan, D. Liu, and X. H. Qiu. 2010. Expression responses of nine cytochrome P450 genes to xenobiotics in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **97**:209-213.
- Zhu, F., R. Parthasarathy, H. Bai, K. Woithe, M. Kausmann, R. Nauen, D. A. Harrison, and S. R. Palli. 2010. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:8557-8562.
- Zhu, Y. C. and G. L. Snodgrass. 2003. Cytochrome P450 CYP6X1 cDNAs and mRNA expression levels in three strains of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera : Miridae) having different susceptibilities to pyrethroid insecticide. *Insect Molecular Biology* **12**:39-49.
- Ziegler, R., S. Whyard, A. E. R. Downe, G. R. Wyatt, and V. K. Walker. 1987. General esterase, malathion carboxylesterase, and malathion resistance in *Culex-tarsalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **28**:279-285.

ANNEXE 1

Préparation des papiers insecticides imprégnés de perméthrine :

- Découper des papiers filtres aux dimensions de 15 x 11 cm (Dimensions compatibles pour les tubes de test OMS)
- Préparer une solution de perméthrine à 3 mg/L dans de l'acétone 100%.
- Dans un tube falcon, mélanger 4 ml de solution de perméthrine à 3mg/L avec 8 ml d'huile d'olive et bien remuer pour mélanger.
- Rouler les papiers filtres découpés précédemment et les tremper dans le tube falcon pendant 5 minutes.
- Retirer les papiers et les laisser sécher sous hotte aspirante et à l'abris de la lumière pendant une journée.
- Conserver ensuite les papiers dans de l'aluminium à 4°C.

Les moustiques génèrent une nuisance importante et sont notamment contrôlés grâce à des traitements insecticides. Aujourd'hui, les gîtes où se développent leurs larves sont souvent pollués par des xénobiotiques environnementaux (hydrocarbures, pesticides, toxines naturelles...). Jusqu'à présent, l'impact de ces xénobiotiques sur la capacité des larves de moustiques à résister aux insecticides chimiques reste méconnu. Cette thèse vise à étudier la réponse des larves d'*Aedes aegypti* aux xénobiotiques environnementaux et leur impact sur leur capacité à résister aux insecticides chimiques.

Une première étude, sur le court terme (une seule génération), montre que des larves exposées pendant quelques heures à divers xénobiotiques présentent une tolérance accrue à différents insecticides chimiques. Grâce à plusieurs études de transcriptomique, nous avons montré que de nombreux gènes de détoxification, codant majoritairement pour des monooxygénases à cytochrome P450s (CYPs), étaient induits suite à cette exposition, suggérant leur rôle potentiel dans l'augmentation de tolérance des larves aux insecticides. Nous avons aussi montré que d'autres gènes répondaient à l'exposition des larves aux xénobiotiques tels que des gènes codant pour des protéines cuticulaires, transporteurs ABC, et de nombreuses enzymes, suggérant une réponse globale au stress. Cette capacité de réponse au stress chimique pourrait aussi être impliquée dans l'augmentation de tolérance des larves de moustiques aux insecticides. Nous avons pu montrer que parmi les gènes CYPs, certains candidats répondaient à l'exposition aux xénobiotiques et étaient majoritairement transcrits dans des tissus fortement impliqués dans la détoxification tels que les tubes de Malpighi et l'intestin. Globalement, cette première partie démontre l'impact des polluants environnementaux sur le métabolisme des moustiques et le lien potentiel avec leur tolérance aux insecticides. Enfin, ces travaux mettent évidence la complexité des interactions biotiques entre les xénobiotiques et les insecticides, notamment au niveau de la régulation de l'expression des gènes.

L'autre objectif de cette thèse a consisté à étudier l'effet à long terme (sur plusieurs générations) des xénobiotiques sur la sélection des mécanismes de résistance aux insecticides chez les moustiques. Pour cela, trois souches d'*Aedes aegypti* exposée ou non à des doses sub-létales de xénobiotiques, ont été sélectionnées au laboratoire avec l'insecticide chimique perméthrine. Après 10 générations de sélection, les trois souches présentent toutes une augmentation de résistance à l'insecticide. Grâce à une approche de transcriptomique par puce à ADN, nous avons montré que la présence de polluants ou résidus d'insecticides peut affecter la sélection de certains gènes par l'insecticide, notamment ceux codant pour les enzymes de détoxification.

En parallèle, la validation fonctionnelle du rôle de plusieurs gènes codants pour des CYPs dans la réponse aux insecticides a été initiée. Pour cela un travail méthodologique a été mené afin de tenter de mettre au point une approche par ARN interférant chez les larves de moustiques. Deux approches distinctes ont été testées : par ingestion ou bien par injection d'ARNs double brins.

D'une manière globale, cette thèse permettra de mieux comprendre l'impact de l'environnement sur la capacité des moustiques à résister aux insecticides afin d'optimiser les futures stratégies de lutte contre les vecteurs basées sur l'utilisation d'insecticides chimiques.

Mots-clés: Moustiques, résistance métabolique, monooxygénases à cytochrome P450, Glutathion S-transférases, Carboxylestérases, Transcriptomique, RT-qPCR, Bioessais, ARN interférant, Polluants.

Mosquitoes have a major impact on public health due to their capacity to transmit human diseases. To control them, insecticides have been heavily used since the 1950's leading to the emergence of insecticide resistance mechanisms which are now threatening vector control programs. Today, wetlands where mosquito larvae develop are frequently contaminated by environmental xenobiotics (e.g. residual insecticides, agrochemicals, pollutants and plant allelochemicals) and little is known about the impact of these molecules on the capacity of mosquitoes to resist insecticides. In this context, the aim of my thesis is to investigate the response of mosquito larvae to xenobiotic exposures and the impact of these molecules on their ability to resist insecticides.

First, the study of the 'short term' (single generation) effect of xenobiotics revealed that mosquito larvae exposed for few hours to sub-lethal doses of various xenobiotics can become more tolerant to several chemical insecticides. Thanks to different transcriptomic approaches, we showed that several detoxification genes, especially those encoding cytochrome P450 monooxygenases (CYPs), were induced by various xenobiotics which could explain the increased tolerance of mosquito larvae to insecticides. Other genes encoding cuticular proteins, ABC transporters and various enzymes also responded to xenobiotic exposures suggesting a global stress response to chemicals which can also have an impact on mosquito's tolerance to insecticides. We also demonstrated that several candidate P450s responding to various pollutants, are preferentially transcribed in gastric caeca, midgut and malpighian tubules, known to play an important role in xenobiotic metabolism. Overall, these studies evidenced the significant impact of environmental xenobiotics on mosquito larvae metabolism and consequences regarding their tolerance to chemical insecticides. These studies also revealed the complexity of biotic interactions between environmental xenobiotics and insecticides in mosquitoes, especially regarding the regulation of gene expression.

The other aim of my thesis was to investigate the 'long term' (across several generations) impact of xenobiotics on the selection of insecticide resistance mechanisms in mosquitoes. To achieve this, three strains of the mosquito *Aedes aegypti*, exposed or not to sublethal doses of pollutant or residual insecticide, were selected with the pyrethroid insecticide permethrin. After 10 generations of selection, the three strains showed an increased resistance to permethrin compared to the susceptible strain. Thanks to a microarray approach, we showed that the presence of pollutant or residual insecticide can affect the selection of multiple genes by the insecticide, especially those encoding detoxification enzymes.

In parallel, the functional validation of genes encoding candidate P450s potentially involved in insecticide resistance has been initiated. This included the development and testing of various interfering RNA methods for mosquito larvae based on the ingestion or injection of double stranded RNA.

Globally, this research work will provide a better understanding of the impact of environment on insecticide resistance mechanisms in mosquitoes and will provide new insights for optimizing the control of vectors with chemical insecticides.

Key-words: Mosquitoes, metabolic resistance, Cytochrome P450 monooxygenases, Glutathione S-transferases, Carboxylesterases, Transcriptomics, RT-qPCR, bioassays, Interfering RNA, pollutants.