

GÉNÉTIQUE. — Association entre l'amplification de séquences d'ADN, l'augmentation quantitative d'estérases et la résistance à des insecticides organophosphorés chez des Moustiques du complexe *Culex pipiens*, avec une note sur une amplification similaire chez *Musca domestica* L. Note de **Claude Mouchès, Didier Fournier, Michel Raymond, Michel Magnin, Jean-Baptiste Bergé, Nicole Pasteur et George P. Georghiou**, présentée par Constantin Vago.

Dans cette étude, nous donnons la première évidence directe de l'existence de fragments d'ADN amplifiés présents uniquement chez les Moustiques du complexe *Culex pipiens* résistants aux insecticides organophosphorés grâce à la production accrue d'estérases de détoxification. Nous montrons que le degré d'amplification de ces fragments varie dans le même sens que la quantité d'estérase, elle-même liée au taux de résistance. Nous concluons que les fragments d'ADN supplémentaires sont directement associés au phénomène de résistance et contiennent les gènes responsables de cette résistance.

GENETICS. — Specific amplified DNA sequences associated with organophosphate insecticide resistance in Mosquitoes of the *Culex pipiens* complex, with a note on similar amplification in the housefly, *Musca domestica* L.

Resistance to organophosphate (OP) insecticides in various populations of the *Culex pipiens* complex from France, California and East Africa has been shown to be due to detoxification by esterases which can be recognized by their ability to degrade naphthyl acetate substrates. In French *Cx. pipiens* L. and in Californian *Cx. quinquefasciatus* Say, these esterases are encoded by different genes (Est-3 and Est-2, respectively). In addition, esterase activities and degree of resistance in homozygous-resistant *Cx. quinquefasciatus* from California were found to occur at various levels, both characters roughly doubling from one level to the next. These observations were best explained by an amplification of the Est-2 gene (N. Pasteur, G.P. Georghiou and A. Iseki, Génét. Sél. Evol., 16, 1984, pp. 271-284).

In the present investigation, we have obtained direct evidence confirming this hypothesis by comparing [1] the quantity of detoxifying esterases and [2] the DNA amplified sequences in French *Cx. pipiens* strains (S54, OP-resistant due to esterase; MSE, OP/carbamate-resistant due to altered acetylcholinesterase; Bleuet, susceptible), and in Californian *Cx. quinquefasciatus* strains (TEM-R, Coachella and Willow, OP-resistant due to esterase; C-LAB susceptible).

Differences in the quantity of detoxifying esterases in the strains were estimated by measuring the staining intensity of these enzymes with Coomassie Blue after SDS electrophoresis (Fig. 1). The esterase encoded by Est-2 was observed in the three OP-resistant strains of *Cx. quinquefasciatus* (its quantity being highest in the most resistant TEM-R strain) but was absent from the susceptible C-LAB as well as from the three *Cx. pipiens* strains. The esterase encoded by Est-3 was found only in the S54 strain, its quantity being much lower than that of the esterase observed in OP-resistant *Cx. quinquefasciatus*. These results are commensurate with the degree of OP resistance in the strains (e.g. for temephos, 10 × in S54, 25 × to 67 × in Willow and Coachella, and 800 × in TEM-R).

The amplified DNA were identified from whole genomic DNA preparations using the method described by Roninson et al. (Nature, 309, 1984, pp. 626-628).

These were separated by 1% agarose electrophoresis and revealed by radioactivity (Fig. 2). Mosquitoes without the Est-2 and Est-3 enzymes (i.e. Bleuet, MSE and C-LAB) revealed DNA fragments which were identical on the basis of size (same electrophoretic mobility) and level of amplification (equal radioactivity). These fragments were also present in the strains possessing a detoxifying esterase, but these strains had also additional fragments. A single additional fragment of 3.7 kb (=kilobases) was found in S54 which possesses the Est-3 enzyme; its small amount of radioactivity indicates a low degree of amplification. Six additional fragments (7.5, 4, 3.5, 3, 2 and 1 kb) were observed in TEM-R, Coachella and Willow strains which possess the Est-2 enzyme, their degree of amplification being consistently higher in TEM-R than in the other two strains.

By the use of similar procedures, we have also shown the presence of amplified DNA sequences in a strain of the housefly that is resistant to OP insecticides due to a higher level of glutathione-S-transferase and possibly of esterase. Compared to a susceptible strain, the resistant strain was found to possess two sequences of 3.8 and 1.8 kb.

The results obtained with *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus* indicate that strains resistant to OP insecticides through the production of an increased quantity of detoxifying esterase possess specific amplified DNA sequences that are absent from strains in which such resistance mechanism is lacking. The degree of amplification varies in the same manner as the quantity of esterase produced, itself being related to the degree of resistance. It is concluded, therefore, that DNA amplification is responsible for the differences in esterase quantity and organophosphate resistance in the strains examined. To our knowledge, this is the first direct evidence of DNA amplification in insecticide-resistant insects.

INTRODUCTION. — La résistance aux insecticides organophosphorés dans le complexe *Culex pipiens* résulte souvent d'une augmentation des processus de détoxification par des

estérasas. Selon l'origine géographique des Moustiques considérés, deux locus peuvent être impliqués. Chez *Culex pipiens* L. du sud de la France (souche S54), c'est le locus *Est-3* qui code pour une estérase A' très active vis-à-vis de substrats chromogènes et qui est pratiquement absente dans les souches sensibles [1]. Chez un autre membre du complexe, *Culex quinquefasciatus* Say de Californie (souche TEM-R), c'est le locus *Est-2* qui code pour une estérase B à forte activité, absente des souches sensibles ([2], [3]). Enfin chez *Culex quinquefasciatus* de l'Est Africain, les deux locus sont exprimés chez les Insectes résistants [4].

Il a été suggéré que la forte activité estérasique acquise dans la souche résistante TEM-R serait due à une amplification du gène *Est-2*. Cette hypothèse est la mieux adaptée au phénomène d'acquisition de la résistance par palliers [5]. Ce modèle a également été proposé pour expliquer un phénomène comparable chez *Myzus persicae* [6] et il semble fréquent dans les cultures de cellules résistantes à diverses molécules xénobiotiques ([7], [8]). Jusqu'à présent, l'existence de ces amplifications n'a été prouvée que pour les gènes induisant une résistance dans les cultures cellulaires ([7], [8]). Nous montrons ici que les Moustiques du complexe *Culex pipiens*, devenus résistants à la suite d'une augmentation de la détoxification estérasique, possèdent des séquences d'ADN spécifiquement amplifiées. De plus, nous montrons que le degré d'amplification varie dans le même sens que la quantité de molécules estérasiques contenues dans les extraits.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — Cette étude a porté sur les souches décrites dans le tableau qui comprennent des *Culex pipiens* de France et des *Culex quinquefasciatus* de Californie ainsi que sur deux souches de *Musca domestica* (l'une sensible, l'autre résistante aux organophosphates [9]).

Les protéines ont été extraites en broyant à 4°C des Moustiques adultes dans un tampon imidazole 0,025 M, pH 7,4. Le broyat a été centrifugé 10 mn à 10000 g et les protéines du surnageant ont été analysées par électrophorèse selon la technique de Laemmli [10].

L'extraction de l'ADN a été faite suivant la méthode décrite par Mouchès et coll. [11]. Après digestion des ADN purifiés par les enzymes de restriction Eco RI ou Hind III, les fragments d'ADN amplifiés ont été identifiés après électrophorèse dans un gel contenant 1% d'agarose, selon la méthode décrite par Roninson et coll. [12].

RÉSULTATS. — L'étude de Pasteur et coll. [5] qui suggérait des variations dans le degré d'amplification du gène *Est-2*, était basée sur des observations de modifications de l'activité estérasique. Nous avons marqué ces estérasas par le diisopropylfluorophosphate tritié [13] ce qui nous a permis de les identifier après électrophorèse d'extraits bruts dans des conditions dénaturantes, et de comparer dans différentes souches leurs quantités après coloration au bleu de Coomassie.

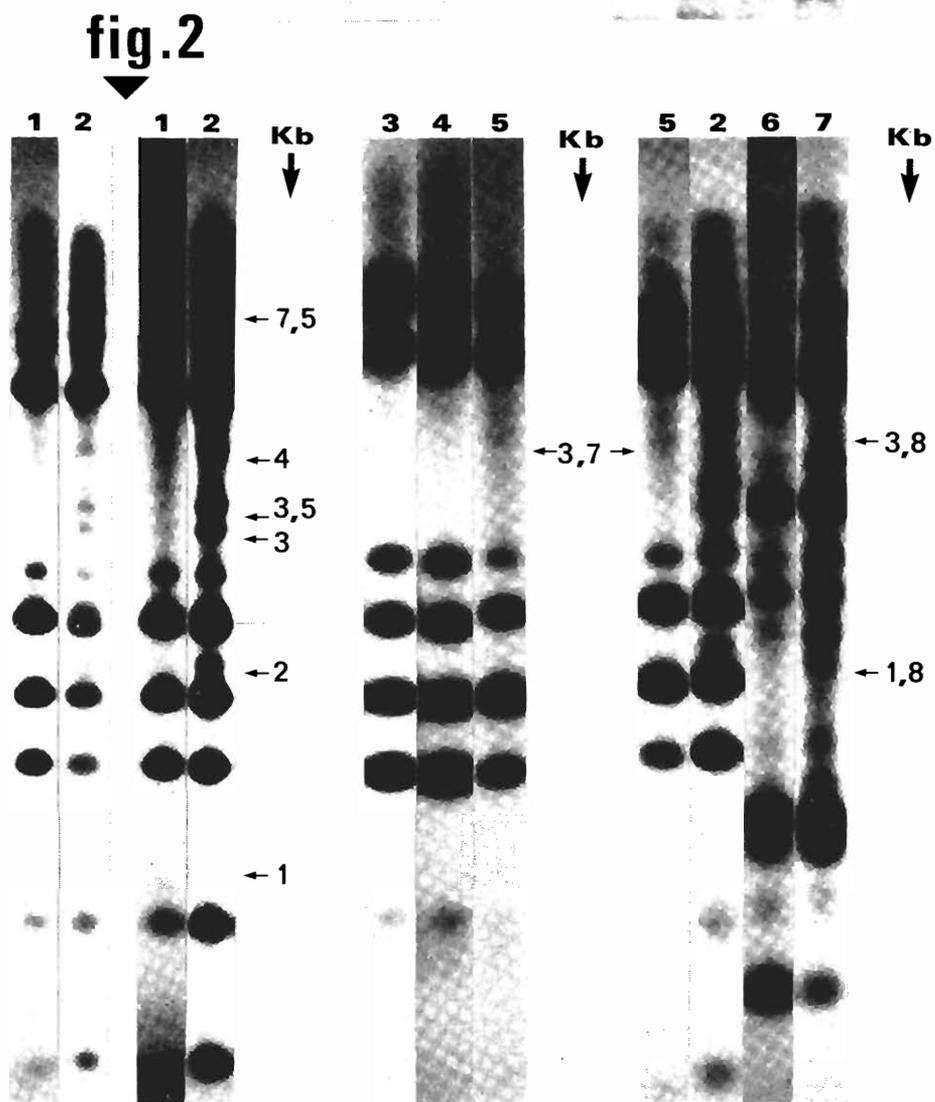
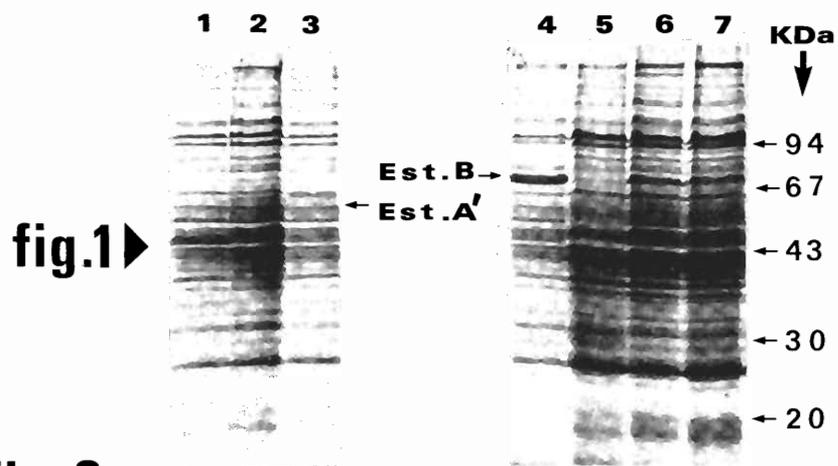
EXPLICATIONS DE LA PLANCHE I

Fig. 1. — Analyse des protéines des souches de *Cx. pipiens* L. et de *Cx. quinquefasciatus* Say par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque. 1, *Cx. pipiens*, souche Bleuet; 2, *Cx. pipiens*, souche MSE; 3, *Cx. pipiens*, souche S54; 4, *Cx. quinquefasciatus*, souche TEM-R; 5, *Cx. quinquefasciatus*, souche C-LAB; 6, *Cx. quinquefasciatus*, souche Coachella; 7, *Cx. quinquefasciatus*, souche Willow.

Fig. 1. — Polyacrylamide slab gel electrophoretic analysis of proteins obtained from *Cx. pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say strains. 1, *Cx. pipiens*, Bleuet; 2, *Cx. pipiens*, MSE; 3, *Cx. pipiens*, S54; 4, *Cx. quinquefasciatus*, TEM-R; 5, *Cx. quinquefasciatus*, C-LAB; 6, *Cx. quinquefasciatus*, Coachella; 7, *Cx. quinquefasciatus*, Willow.

Fig. 2. — Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments amplifiés obtenus après hydrolyse de l'ADN des Insectes par l'enzyme de restriction Eco RI. 1, *Cx. quinquefasciatus*, souche C-LAB; 2, *Cx. quinquefasciatus*, souche TEM-R; 3, *Cx. pipiens*, souche Bleuet; 4, *Cx. pipiens*, souche MSE; 5, *Cx. pipiens*, souche S54; 6, *M. domestica*, souche sensible; 7, *M. domestica*, souche résistante aux organophosphorés.

Fig. 2. — Agarose gel electrophoretic analysis of DNA amplified fragments obtained after genomic DNA hydrolysis by Eco RI restriction enzyme. 1, *Cx. quinquefasciatus*, C-LAB; 2, *Cx. quinquefasciatus*, TEM-R; 3, *Cx. pipiens*, Bleuet; 4, *Cx. pipiens*, MSE; 5, *Cx. pipiens*, S54; 6, *M. domestica*, organo-phosphate sensitive strains; 7, *M. domestica* organo-phosphate resistant strain.



TABLEAU

Caractéristiques de résistance des souches
de *Cx. pipiens* L. et de *Cx. quinquefasciatus* Say étudiées.

Characteristics of the Cx. pipiens L.
and Cx. quinquefasciatus Say strains studied in the present investigation.

Espèce	Souche	Résistance	Mécanisme de résistance
<i>Culex pipiens</i> (France)	Bleuet	Aucune	—
	MSE	OP, carbamates	AChE-R
	S54	OP	Estérase (<i>Est-3</i>)
<i>Culex quinquefasciatus</i> (Californie)	C-LAB	Aucune	—
	TEM-R	OP	Estérase (<i>Est-2</i>)
	Willow	OP	Estérase (<i>Est-2</i>)
	Coachella	OP	Estérase (<i>Est-2</i>)
	PRO-R	Carbamate	Oxydase

Sur la figure 1, nous voyons que la bande correspondant à l'estérase B présente une très forte intensité dans les trois souches de *Cx. quinquefasciatus* résistantes aux organophosphorés (TEM-R, Coachella et Willow) alors qu'elle est pratiquement invisible chez C-LAB qui est le témoin sensible de cette espèce, ainsi que chez les *Cx. pipiens* de France. Chez ces derniers, on observe une bande colorée qui correspond à l'estérase A' dans la souche S54, totalement absente des extraits de Bleuet et de MSE.

L'intensité de coloration des bandes révélées par le bleu de Coomassie est généralement bien corrélée à la quantité de protéines qu'elles contiennent. Comme tous les extraits étudiés contenaient la même quantité globale de protéines, les variations de l'intensité de la coloration des bandes correspondant aux estérases ont une signification quantitative. Ainsi, l'estérase B chez TEM-R est en quantité beaucoup plus élevée que l'estérase A' chez S54; ces données peuvent être mises en relation avec la différence des taux de résistance au téméphos existant entre ces deux souches ($\times 10$ chez S54 et $\times 800$ chez TEM-R). De même il est clair que la quantité d'estérase B est plus faible chez les Moustiques Coachella et Willow que chez les Moustiques TEM-R, ce qui est en accord avec leur plus faible taux de résistance ($\times 25$ et $\times 67$ respectivement).

Grâce à la technique d'analyse de l'ADN amplifié de Roninson et coll. [12], il a été possible de révéler l'existence de séquences amplifiées chez les Moustiques du complexe *Culex pipiens* et chez *Musca domestica* (fig. 2). Lorsque les préparations d'ADN sont hydrolysées par l'enzyme de restriction Eco RI, les bandes majeures d'ADN amplifié sont identiques dans toutes les souches de Moustiques ne possédant pas d'estérase à grande activité.

Dans les souches où soit l'estérase A', soit l'estérase B existent en quantité plus importante, on observe des fragments d'ADN amplifié supplémentaires. Chez TEM-R, ce sont six fragments d'une taille de sept et demi, quatre, trois et demi, trois, deux et une kilobases (kb) (fig. 2). Ces six fragments sont également amplifiés, mais à un degré moindre, dans les souches Willow et Coachella dans lesquelles la quantité d'estérase B est plus faible que dans TEM-R. Ils n'ont pu, par contre, être détectés ni dans les deux autres souches de *Cx. quinquefasciatus* californiennes sensibles aux organophosphorés [souche C-LAB (fig. 2) et souche PRO-R résistante aux carbamates], ni dans les trois souches de *Cx. pipiens* analysées.

Chez la souche S54, c'est une bande de 3,7 kb qui est faiblement amplifiée et qui est absente des deux autres souches de *Cx. pipiens*, Bleuet et MSE (fig. 2). Un fragment d'ADN amplifié supplémentaire de 1,5 kb est également mis en évidence dans la souche S54 après hydrolyse de l'ADN par l'enzyme de restriction Hind III.

Il est remarquable qu'entre deux souches de *Musca domestica*, l'une sensible, l'autre résistante à cause d'une plus grande production de glutathion-S-transférase ([14], [15]) et peut-être d'estérase [16], il existe le même type de différences qu'entre les souches de *Culex* : la souche résistante possède deux fragments d'ADN amplifié qui lui sont propres, l'un de 3,8 et l'autre de 1,8 kb (fig. 2).

DISCUSSION ET CONCLUSION. — La technique de Roninson et coll. [12], mise au point pour étudier le phénomène d'amplification dans les cultures de cellules devenues résistantes à certains médicaments, a pu être utilisée avec succès pour caractériser les séquences amplifiées du génome d'insectes entiers appartenant à trois espèces de Diptères (genres *Culex* et *Musca*).

Nous avons ainsi pu montrer que les « images » électrophorétiques des fragments d'ADN amplifiés majeurs sont les mêmes dans les souches de Moustiques Bleuet, MSE,

PRO-R et C-LAB, que ces dernières appartiennent à l'espèce *pipiens* ou à l'espèce *quinquefasciatus*. Ces séquences sont donc caractéristiques d'un groupe d'espèces qui d'ailleurs sont taxinomiquement très proches [17].

Les différences existant au niveau de l'ADN amplifié dans les souches du complexe *Culex pipiens* sont associées à l'existence d'un mécanisme de détoxification caractérisé par une production accrue d'estérase (estérase A' dans le cas de la souche S54, estérase B dans le cas des souches TEM-R, Willow et Coachella). Il est remarquable que ces différences sont toujours dans le sens d'une augmentation de séquences : pour S54 c'est l'existence d'une séquence supplémentaire de 3,7 kb, pour TEM-R, Coachella et Willow, d'une série de séquences supplémentaires allant de 7,5 à 1 kb, et pour la souche résistante de *Musca domestica* par rapport à la souche sensible de deux séquences de 3,8 et 1,8 kb.

En outre, la quantité d'estérase observée dans la souche S54 est assez faible, moyenne dans les souches Willow et Coachella, élevée dans la souche TEM-R. La même relation se retrouve au niveau des séquences d'ADN supplémentaires propres à ces souches, alors que les séquences communes aux deux espèces de *Culex* (i. e. celles que l'on retrouve dans les souches de Bleuet, MSE, PRO-R et C-LAB) ne varient pas.

Ces observations suggèrent que les fragments d'ADN supplémentaires sont directement associés au phénomène de résistance et contiennent très probablement les gènes d'estérases responsables de la résistance. Cette interprétation est en accord avec les données physiologiques, biochimiques et génétiques que nous possédons sur les souches résistantes S54 et TEM-R⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Ces recherches ont été subventionnées par l'I.N.R.A., l'I.N.S.E.R.M. (contrat n° 841019) et par une convention entre le N.S.F. (contrat n° 84.13822) et le C.N.R.S.

Remise le 30 septembre 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] N. PASTEUR, A. ISEKI et G. P. GEORGHIOU, *Biochem. Genet.*, 19, 1981, p. 909-919.
- [2] G. P. GEORGHIOU et N. PASTEUR, *J. Econ. Entomol.*, 71, 1978, p. 201-205.
- [3] G. P. GEORGHIOU, N. PASTEUR et M. K. HAWLEY, *J. Econ. Entomol.*, 73, 1980, p. 301-305.
- [4] C. F. CURTIS et N. PASTEUR, *Bull. Ent. Res.*, 71, 1981, p. 153-161.
- [5] N. PASTEUR, G. P. GEORGHIOU et A. ISEKI, *Génét. Sél. Evol.*, 16, (3), 1984, p. 271-284.
- [6] A. L. DEVONSHIRE et R. M. SAWICKI, *Nature*, 280, 1979, p. 140-141.
- [7] R. T. SCHIMKE, *Gene amplification*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [8] M. FOX, *Nature*, 307, 1984, p. 212-213.
- [9] This resistant strain was kindly provided by Prof. N. Motoyama.
- [10] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680-685.
- [11] C. MOUCHES, T. CANDRESSE, G. BARROSO, C. SAILLARD, H. WROBLEWSKI et J. M. BOVE, *J. Bacteriol.*, 1985 (sous presse).
- [12] I. B. RONINSON, H. T. ABELSON, D. E. HOUSMAN, N. HOWELL et A. VARSHAVSKY, *Nature*, 309, 1984, p. 626-628.
- [13] J. DE JERSEY, J. NOLAN, P. A. DAVEY et P. W. RIDDLEF, *Pest. Biochem. Physiol.*, 23, 1985, p. 349-357.
- [14] A. G. CLARK et W. C. DAUTERMAN, *Pest. Biochem. Physiol.*, 17, 1982, p. 307-314.
- [15] A. G. CLARK, N. A. SHAMAAN, W. C. DAUTERMAN et T. HAYAOKA, *Pest. Biochem. Physiol.*, 22, 1984, p. 51-59.
- [16] L. R. KAO, N. MOTOYAMA et W. C. DAUTERMAN, *Pest. Biochem. Physiol.*, 23, 1985, p. 228-239.
- [17] A. R. BARR, *Recent developments in the genetics of Insect disease vectors*, Stipes Publ. Co., Champaign, Illinois, 1982, p. 551-572.

C. M., D. F. et J.-B. B. : Institut national de la Recherche agronomique,
123, boulevard Francis-Meilland, B. P. n° 2078, 06606 Antibes;

M. R., M. M. et N. P. : Laboratoire de Génétique, Institut des Sciences de l'Évolution,
Université de Montpellier-II, place Eugène-Bataillon, 34060 Montpellier;

M. R. et G. P. G. : Department of Entomology,
University of California, Riverside, 92521 Californie.