

GÉNÉTIQUE. — *Le gène d'une acétylcholinestérase insensible au propoxur détermine la résistance de Culex pipiens L. à cet insecticide.* Note de Michel Raymond, Nicole Pasteur, Didier Fournier, André Cuany, Jean Bergé et Michel Magnin, présentée par Constantin Vago.

Une acétylcholinestérase insensible à l'action inhibitrice du propoxur (insecticide carbamate) a été trouvée dans une souche (MSE) du moustique *Culex pipiens L.* du sud de la France présentant une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphates. L'hérédité de ce caractère est mendélienne et probablement monofactorielle bien que des écarts (significatifs) aux proportions attendues aient été observés parmi les descendants des croisements retour. Le phénotype résistant étant toujours le moins fréquent, il est vraisemblable qu'il existe une mortalité préimaginale différentielle expliquant les ségrégations obtenues. Il est donc probable qu'un seul locus (*Ace*) détermine ce caractère, l'allèle *Ace<sup>S</sup>* codant une acétylcholinestérase sensible au propoxur et l'allèle *Ace<sup>R</sup>* codant une forme insensible au propoxur [15].

GENETICS. — Genetics of a propoxur insensitive acetylcholinesterase responsible for resistance in *Culex pipiens L.*

An acetylcholinesterase of the carbamate-resistant MSE strain isolated from a Southern France natural population was found to be inhibited by propoxur (carbamate) concentrations 10,000 times higher than those inhibiting the acetylcholinesterase of carbamate-susceptible strains Bleuet and S 54. These differences in inhibition properties were used to devise a test allowing to determine single mosquito phenotypes. Thus, it was shown that the insensitive acetylcholinesterase (R phenotype) is present in every MSE adult whereas the sensitive enzyme (S phenotype) is found in every Bleuet and S 54 mosquito. The offspring of R x S crosses displayed a single phenotype (RS) with intermediate inhibition properties. The offspring of all backcrosses (RS x R or RS x S) segregate in two distinct phenotypes (RS and R or RS and S, respectively). The proportions of these phenotypes are statistically different from the 1:1 ratio expected, the most sensitive phenotypes being always the most numerous. Since similar observations have been consistently reported in the literature (they are attributed to a lower fitness of resistant phenotypes in insecticide free conditions, which are conditions of preimaginal life in our test crosses), we conclude that acetylcholinesterase phenotypes are most probably controlled by two codominant alleles at a single locus (*Ace<sup>S</sup>* coding a propoxur-sensitive enzyme and *Ace<sup>R</sup>* coding a propoxur-insensitive enzyme).

INTRODUCTION. — Les insecticides organophosphorés, comme le chlorpyrifos, induisent l'inhibition de l'acétylcholinestérase des synapses, provoquant une paralysie générale et mortelle. La sélection de tout mécanisme qui retarde ou prévient cette inhibition est à l'origine des phénomènes de résistance. Dans le sud de la France, les premiers signes d'acquisition d'une résistance au chlorpyrifos chez le Moustique *Culex pipiens L.* sont apparus en 1972 et, en 1974-1975, cette résistance était principalement due à une estérase de détoxification (allèle *Est-3<sup>A</sup>* d'un gène unique montrant une activité particulièrement élevée vis-à-vis du naphthyl-acétate [1] et capable de dégrader le malathion [2]). Les Moustiques homozygotes pour l'allèle *Est-3<sup>A</sup>* (souche S 54) sont environ dix fois plus résistants que ceux des souches sensibles de référence.

Dès 1978, les taux de résistance rencontrés dans les populations naturelles n'étaient plus explicables par la seule homozygotie de l'allèle *Est-3<sup>A</sup>* [3]. L'existence probable d'un ou plusieurs nouveaux mécanismes de résistance a été confirmée par l'étude d'une souche « super-résistante » au chlorpyrifos isolée en 1979 : cette souche s'est révélée présenter une forte résistance croisée avec les carbamates [4] (ce qui n'était pas le cas de la souche S 54 isolée en 1975) indépendante de la présence ou de l'absence de l'allèle *Est-3<sup>A</sup>* [5].

En cherchant à identifier les nouveaux mécanismes de résistance, nous avons entrepris de comparer les activités et les constantes d'inhibition d'enzymes souvent impliqués dans les phénomènes de résistance vis-à-vis de divers insecticides. Nous avons constaté des différences importantes entre les souches sensibles et les souches résistantes aux carbamates en ce qui concerne l'acétylcholinestérase. Nous rapportons ici nos résultats et montrons que ces différences ont une hérédité mendélienne.

TABLEAU I

Activité de l'acétylcholinestérase (AChE) des souches étudiées  
et concentrations molaires de propoxur et d'ésérine inhibant 50 % de l'activité normale (=I<sub>50</sub>).  
*Acetylcholinesterase (AChE) observed in the strains  
and molar concentrations of propoxur and eserine inhibiting 50% of the normal activity.*

	MSE	S 54	Bleuet
Activité de l'AChE (DO/mn/Moustique). . . . .	0,104	0,156	0,147
	0,012 (°)	0,015 (°)	0,016 (°)
Inhibition :			
propoxur (I <sub>50</sub> ). . . . .	>3,0. 10 <sup>-3</sup>	9,71. 10 <sup>-8</sup>	1,79. 10 <sup>-7</sup>
rapport sur Bleuet. . . . .	>16 760 (°)	0,54	1
eserine (I <sub>50</sub> ). . . . .	9,2. 10 <sup>-8</sup>	4,4. 10 <sup>-8</sup>	1,2. 10 <sup>-8</sup>
rapport sur Bleuet. . . . .	7,65	3,66	1

(°) Erreur standard;

(°) Sous-estimation due au seuil de solubilité du propoxur dans l'eau (9. 10<sup>-3</sup> M).

TABLEAU II

Phénotypes de l'AChE observés dans la descendance de divers croisements (femelles × males). Les croisements F1 réciproques S 54 × MSE et MSE × Bleuet n'ont pas pu être analysés car stériles (en préparation). L'écart par rapport à une ségrégation attendue suivant le rapport 1 : 1 est significatif à 1 % (°) et à 0,1 % (°).

*AChE phenotypes observed among the offspring of various crosses (females × males). F1 reciprocal crosses S 54 × MSE and MSE × Bleuet were sterile (en preparation). Deviations from the expected 1:1 segregation ratio were significant at the 1% level (°) and at the 0.1% level (°).*

Croisements	Phénotypes de l'acétylcholinestérase		
	R <sub>0</sub> < x < R <sub>100</sub> (R)	R <sub>0</sub> < x < R <sub>100</sub> (RS)	R <sub>0</sub> = x < R <sub>100</sub> (S)
1 Bleuet × Bleuet. . . . .	0	0	12
2 S 54 × S 54. . . . .	0	0	22
3 MSE × MSE. . . . .	25	0	0
4 MSE × S 54. . . . .	0	43	0
5 Bleuet × MSE. . . . .	0	42	0
6 Bleuet × (Bleuet × MSE). . . . .	0	35	60 (°)
7 (Bleuet × MSE) × MSE. . . . .	15	26	0
8 MSE × (MSE × S 54). . . . .	31	52	0 (°)
9 (MSE × S 54) × MSE. . . . .	42	115	0 (°)

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Trois souches de *Culex pipiens* isolées à partir de populations naturelles du sud de la France ont été utilisées. Bleuet [6] est une souche sensible de référence. S 54 [7] est une souche homozygote pour l'allèle *Est-3<sup>A</sup>* codant l'estérase de détoxification; elle est résistante au chlorpyrifos mais sensible au propoxur [8]; MSE est une souche résistante au chlorpyrifos et au propoxur ne possédant pas l'estérase de détoxification [5]. L'activité de l'acétylcholinestérase en présence ou non de deux inhibiteurs, le propoxur et l'ésérine, a été mesurée par la méthode d'Ellman et coll. [9] à partir d'extraits préparés avec quelques dizaines d'adultes (en préparation). Divers croisements ont été réalisés entre les trois souches et leurs descendants ont été croisés en retour avec des adultes d'une des souches parentales [2].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — L'activité de l'acétylcholinestérase, estimée par la variation de densité optique (DO) par minute et par Moustique, est comparable chez les adultes des souches Bleuet et S 54 (0,147 < DO < 0,156) mais légèrement et significativement plus basse chez ceux de la souche MSE (DO = 0,104; *p* < 0,01, test de Mann-Whitney, tableau I).

TABLEAU III

Phénotypes de l'AChE en fonction du jour d'émergence chez les Moustiques du croisement 9 (tableau II). Les Moustiques RS ont un développement larvaire plus rapide que les Moustiques R.

*AChE phenotypes according to the emergence day among the mosquitoes issued from cross 9 (Table II). RS mosquitoes have a faster larval development than R mosquitoes.*

Phénotype	Jour de sortie	
	1-3	4-7
RS. ....	66	49
R. ....	14	28

$$p(\chi^2 = 7,1; \text{ddl} = 1) = 0,992.$$

En présence d'ésérine, l'acétylcholinestérase des trois souches se comporte de façon similaire : on obtient une inhibition de 50 % de l'activité à des concentrations du même ordre de grandeur. Cet enzyme réagit de façon complètement différente en présence de propoxur : une inhibition de 50 % est obtenue avec les mêmes concentrations pour les souches Bleuet et S 54, mais il faut une concentration plus de 16 000 fois supérieure pour MSE (tableau I).

L'ensemble de ces résultats montre que l'acétylcholinestérase des souches Bleuet (sensible) et S 54 (résistante au chlorpyrifos, sensible au propoxur) possède des propriétés d'activité et d'inhibition en présence de propoxur tout à fait comparables entre elles, mais extrêmement différentes de celle des Moustiques de la souche MSE, résistante à la fois au propoxur et au chlorpyrifos.

Le fait que l'acétylcholinestérase des trois souches peut être complètement inhibée en présence d'une concentration adéquate d'ésérine, a été utilisé pour mettre au point un test permettant de déterminer la nature de l'acétylcholinestérase d'un Moustique unique (en préparation). Ce test est basé sur l'analyse de la densité optique de trois aliquots du même extrait d'un Moustique après un temps d'incubation de 2 h à 20°C. Deux aliquots constituent les références (référence 100 % d'activité -  $R_{100}$  - où la DO est estimée en l'absence de tout inhibiteur, et référence 100 % d'inhibition -  $R_0$  - où la DO est estimée en présence d'ésérine). Le troisième aliquot sert à mesurer la DO(x) en présence d'une concentration de propoxur inhibant totalement l'acétylcholinestérase des Moustiques Bleuet et S 54, mais n'affectant pas celle des Moustiques MSE. Ainsi quand  $x = R^{100}$ , l'acétylcholinestérase est insensible à l'inhibition (type MSE) et quand  $x = R_0$ , elle est sensible (type Bleuet ou S 54).

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'ensemble des Moustiques des trois souches supposées pures pour le type d'acétylcholinestérase qu'elles contiennent pouvait être caractérisé par cette technique sans ambiguïté (tableau II, croisements 1, 2 et 3). Dans un deuxième temps, nous avons analysé la descendance de divers croisements entre la souche MSE et les souches Bleuet et S 54 (croisements 4 et 5, tableau II); les Moustiques ont un phénotype intermédiaire, c'est-à-dire tel que  $R_0 < x < R_{100}$ . Nous pouvons donc conclure que chaque souche est pure pour les facteurs génétiques contrôlant les phénotypes R (souche MSE) ou S (souches Bleuet et S 54); corrélativement les hybrides de première génération entre MSE et Bleuet ou S 54 ont le phénotype RS. Quand ces hybrides RS sont croisés en retour (croisements 6 à 9) avec une des souches parentales, deux classes de phénotypes sont obtenues comme cela est attendu pour des caractères codominants contrôlés par un seul gène ou plusieurs gènes fortement liés. Toutefois, les

ségrégations observées dans les croisements retour sont en général (croisements 6, 8 et 9) statistiquement différentes ( $p < 0,01$ ) des proportions 1:1 que l'on attend dans une hypothèse de monofactorialité. Nous devons remarquer que, dans tous les cas, les phénotypes les plus résistants (R dans les croisements 7, 8 et 9, RS dans le croisement 6) sont les moins nombreux. Des observations comparables, suggérant qu'une valeur adaptative plus faible est associée aux phénotypes résistants en l'absence d'insecticide (ce qui est réalisé dans nos élevages), ont souvent été signalées [11] et c'est également le cas de l'allèle *Est-3<sup>A</sup>* codant l'estérase à grande activité chez *Culex pipiens* L. [5]. Le seul argument que nous possédons en faveur de l'existence de valeurs adaptatives différentes entre les phénotypes d'acétylcholinestérase est l'observation que les phénotypes RS ont un développement larvaire plus rapide que les phénotypes R (tableau III), ce qui, bien évidemment, n'est pas nécessairement associé à une mortalité larvaire différentielle entre les deux phénotypes.

*En conclusion*, bien que les proportions phénotypiques observées dans trois des quatre croisements retour soient statistiquement différentes des proportions 1:1 attendues, nos résultats suggèrent que les phénotypes de l'acétylcholinestérase que nous avons observés sont contrôlés par un gène unique (ou groupe de gènes étroitement liés) possédant deux allèles (ou haplotypes) codominants : *Ace<sup>S</sup>* codant un enzyme sensible à l'inhibition par le propoxur, et *Ace<sup>R</sup>* codant un enzyme insensible à une telle inhibition. La disparition (ou diminution) du pouvoir inhibiteur des carbamates sur l'activité de l'acétylcholinestérase a été observée chez de nombreux Insectes devenus résistants [10]; ce phénomène est généralement attribué à une modification stérique de la molécule enzymatique qui n'est plus reconnue par l'insecticide considéré. Dans tous les cas, de telles modifications de l'acétylcholinestérase induisent une résistance croisée avec deux familles d'insecticides (organophosphates et carbamates) dont l'acétylcholinestérase est la cible.

Remise le 21 janvier 1985.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] N. PASTEUR, *Thèse de Doctorat d'Etat*, Université de Montpellier II, 1977, 170 p.  
 [2] N. PASTEUR, A. ISEKI et G. P. GEORGHIOU, *Biochem. Genet.*, 19, 1981, p. 909-919.  
 [3] N. PASTEUR, G. SINEGRE et A. GABINAUD, *Biochem. Genet.*, 19, 1981, p. 499-508.  
 [4] R. WOOD, N. PASTEUR et G. SINEGRE, *Bull. Ent. Res.*, 74, 1984, p. 677-687.  
 [5] M. RAYMOND, B. GAVEN, N. PASTEUR et G. SINEGRE, *Génét. Sélect. Evol.*, 17, 1985 (sous presse).  
 [6] J. A. RIOUX et J. PECH, *C. R. Séan. Soc. Biol.*, 155, 1961, p. 343-344.  
 [7] N. PASTEUR et G. SINEGRE, *Experientia*, 34, 1978, p. 709-710.  
 [8] G. SINEGRE, B. GAVEN et J. L. JULLIEN, *Parassitologia*, 19, 1977, p. 63-72.  
 [9] G. L. ELLMAN, K. D. COURTEY, V. ANDRES et R. M. FEATHERSTONE, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 1961, p. 88-95.  
 [10] H. HAMA, G. P. GEORGHIOU et T. SAITO, *Pest resistance to pesticides*, New York, Plenum Press, 1983, p. 809.  
 [11] G. P. GEORGHIOU et C. E. TAYLOR, *J. Econom. Entomol.*, 70, 1977, p. 319-323.  
 [12] Subvention contrat I.N.S.E.R.M. n° 841019.

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

D. F., A. C. et J. B. : *Institut national de la Recherche agronomique, 123, boulevard Francis-Meilland, B.P. n° 78, 06602 Antibes.*