

# Étude des estérases de deux souches d'*Anopheles stephensi* Liston, une sensible aux organochlorés et l'autre résistante

Daniel BERL\*

## Résumé

Par des techniques d'électrophorèse sur gel d'acrylamide, deux souches d'*Anopheles stephensi*, une sensible et l'autre résistante aux insecticides organochlorés, ont été étudiées.

Dans les deux souches, le zymogramme des mâles présente des bandes supplémentaires par rapport à celui des femelles.

La souche sensible possède plus de bandes que la souche résistante et ce dans les deux sexes.

L'identité enzymatique des estérases étudiées a été précisée à l'aide de techniques d'inhibition. Il s'agit de cholinestérases et d'aliestérases.

**Mots-clés :** *Anopheles stephensi* – Insecticides organochlorés – Résistance – Électrophorèse.

## Summary

STUDY OF THE ESTERASES OF TWO STRAINS OF ANOPHELES STEPHENSI LISTON, ONE SUSCEPTIBLE, THE OTHER RESISTANT TO ORGANOCHLOROUS COMPOUNDS

By electrophoresis techniques, two strains of *Anopheles stephensi* were studied, one susceptible and the other resistant to organochlorous compounds. Larvae, pupae, and adults have been reared in the laboratory as permanent strains for three years. The migrations are realised on horizontal polyacrylamide gel, using TRIS-Glycine buffers. The samples (40-50  $\mu$ l) are set in prefor mated cavity in the gel. We used two types of revelation for the esterases : one using the  $\alpha$  +  $\beta$  naphthyl acetate as substrate ; the other indoxyl acetate as substrate.

The bands are the first pink ( $\beta$ ) and brown ( $\alpha$ ) and blues the second.

Two inhibition techniques with organophosphorous compounds and with eserine have been done.

The results are :

- In the two strains the male zymogram shows supplementary bands, compared with the female one.
- The susceptible strain have more bands than the resistant.
- The studied esterases have been identified as cholinesterases and aliesterases by the mean of inhibitors.

**Key words :** *Anopheles stephensi* – Organochlorous insecticides – Resistance – Electrophoresis.

## 1. INTRODUCTION

La résistance des moustiques aux insecticides organochlorés (DDT, dieldrine...) est un phénomène bien connu, mais dont le mécanisme physiologique n'est pas encore complètement élucidé.

Nous avons étudié les estérases d'une souche sensible et d'une souche résistante aux composés

organochlorés, pour déterminer s'il existait d'éventuelles différences dans ce type d'équipement enzymatique, corrélables avec la résistance, comme ceci avait déjà été observé pour la résistance au chlorpyrifos chez *Culex pipiens*.

Les différences dans les zymogrammes peuvent s'exprimer soit par l'existence de bandes supplémentaires, soit par une densité plus ou moins forte des bandes, décelable par dosage au densitomètre.

\* Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., Services Scientifiques Centraux, 70 route d'Aulnay, 93140 Bondy.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Les souches d'*Anopheles stephensi*

Les souches d'*A. stephensi* (ST 15 pour la souche sensible et STR/M2 pour la résistance) (1) étudiées, sont élevées de manière continue à l'insectarium du laboratoire. L'élevage est réalisé dans des cages de tulle de 30 × 30 × 50 cm. Les adultes sont nourris sur cobaye, 5 jours par semaine, en plus du jus sucré présent en permanence. Les œufs sont récoltés dans des pondoirs et mis à éclore dans des cristallisoirs. Les larves sont nourries régulièrement avec un mélange de farines pour petits animaux (souris, cobaye).

Les nymphes prélevées chaque jour sont mises dans les cages d'adultes pour éclosion. Les récipients les contenant sont recouverts d'un cône de papier, ouvert à la pointe, pour éviter que des femelles viennent y pondre.

Les deux souches étudiées sont élevées de la même manière.

### 2.2. Technique d'électrophorèse

Les migrations sont effectuées sur gel de polyacrylamide (cf. annexe I) avec un appareil LKB-Multiphor. La plaque de gel (24,5 × 11 × 0,2 cm) est placée horizontalement et la migration s'effectue dans la largeur, ce qui donne une longueur de migration d'environ 8 cm.

Le gel est fabriqué selon la formulation donnée en annexe I, dans un moule où 12 godets de 1,1 × 0,2 × 0,2 cm sont préformés. Les échantillons (40 à 50 µl) sont déposés dans ces godets.

Les ponts servant à faire la jonction entre le tampon bac (cf. annexe I) et le gel sont des plaques faites d'une sorte d'éponge fournie par la maison LKB.

On a également essayé quelques migrations sur disques selon Davis (1964) mais avec le seul gel d'espacement.

Les moustiques sont broyés individuellement ou par groupes de même sexe, dans des tubes de plastique avec une baguette de verre dans une quantité de tampon d'extraction (cf. annexe I) proportionnelle au nombre de migrations à effectuer. Après 15 minutes de contact on centrifuge à 30 000 tours/minute pendant 5 minutes. Les surnageants sont placés dans les

godets du gel. Une préélectrophorèse à 35 mA/600 V d'au moins une heure a précédé cette opération.

Une électrophorèse (20 mA/400 V) de courte durée (10 mn environ) permet aux échantillons de pénétrer dans le gel; puis le courant est porté à 35 mA/600 V et la migration s'effectue jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le pont anodique.

Le courant est alors arrêté et le gel est plongé dans la solution de révélation choisie, pendant une quinzaine de minutes. Les bandes commencent à apparaître assez vite (4 à 5 mn) à la température ambiante; mais il est préférable de réaliser cette coloration à 37° C car les bandes apparaissent encore plus vite, le gel se colore proportionnellement moins qu'à la température de la pièce (22-25° C) et la lecture s'en trouve facilitée.

### 2.3. Protocole expérimental de caractérisation des estérases

Les enzymes peuvent être caractérisées selon deux méthodes basées sur les affinités de l'enzyme avec un ou plusieurs substrats spécifiques, ou sur ses réactions en présence d'inhibiteurs.

#### 2.3.1. RÉVÉLATION DES ESTÉRASES

Nous avons étudié les estérases avec deux techniques de révélation différant l'une de l'autre par le substrat utilisé et donc le colorant.

*Substrat* :  $\alpha + \beta$  naphthyl-acétate (Shaw & Prasad, 1970)

Pour 150 ml de solution :

4,5 ml d'une solution composée de 1 g d' $\alpha$  et 1 g de  $\beta$  naphthyl-acétate dissout dans 63 ml d'acétone puis Q.S.P. 100 ml avec de l'eau ;  
150 mg de Fast blue RR (colorant le naphthol libéré) ;  
Q.S.P. avec du Tris-HCl (composé de Tris 0,05 M ajusté à pH 7,1 avec HCl 2N).

La coloration donne des bandes roses et brunes sur fond brun clair.

*Substrat* : Indoxyl acétate (I ac) (Uriel, 1964)

Pour 150 ml de solution :

30 mg d'indoxyl acétate dissout dans 3 ml d'acétone ;  
15 ml d'acétate cuivrique 10<sup>-3</sup> M ;

(1) Souches provenant du professeur G. Davidson, du Ross Institute, Londres ; ST 15 provient du cercle de Delhi (1947) et ST RM2 de Roknabad, Minab, Bandar Abbas, Iran (1976).

## ÉTUDE DES ESTÉRASES DE DEUX SOUCHES D'*ANOPHELES STEPHENSI*

Q.S.P. avec du tampon véronal (composé de diéthyl barbiturate de Na ;  
0,05 M ajusté à pH 8,2 avec HCl 2N).

La coloration donne des bandes bleues sur fond presque incolore.

### 2.3.2. INHIBITION DES ESTÉRASES

Deux types d'inhibitions ont été réalisés, l'une avec deux organophosphorés : le malathion et le chlorpyrifos, l'autre avec l'ésérine. Ces techniques ont été choisies en raison de leur spécificité vis-à-vis des différents types d'estérases (cf. annexe II).

En effet, si l'on considère la classification des estérases la plus utilisée, et qui découle des articles de Richter & Croft (1942), Alridge (1943) et Bergman *et al.* (1957), on se trouve en présence de 4 groupes d'estérases :

Les A-estérases appelées arylestérases qui ne sont inhibées ni par les organophosphorés ni par l'ésérine.  
Les B-estérases qui se divisent en deux groupes :  
— les aliestérases inhibées par les organophosphorés mais insensibles à une concentration d'ésérine de  $10^{-3}$  M ;  
— les cholinestérases inhibées par les organophosphorés et par l'ésérine à  $10^{-3}$  M.  
Les C-estérases qui ne sont pas inhibées par les organophosphorés, cette classe est encore mal connue.

Le tableau I, adapté de celui d'Augustinsson (1961), permet d'avoir une vue d'ensemble sur les caractéristiques des différentes sortes d'estérases (classe C non comprise).

Nous avons essayé trois types de manipulations quelque soit le substrat et l'inhibition utilisée :

- 20' de contact du gel avec l'inhibiteur dilué dans 3 ml d'acétone et complété à 150 ml avec le tampon de révélation puis coloration normale (environ 15') ;
- 20' de contact comme ci-dessus puis coloration avec à nouveau présence d'inhibiteur soit au total environ 35' de contact enzyme-inhibiteur ;
- seulement 15' de contact lors de la coloration (Pasteur, 1977).

Les concentrations utilisées sont  $10^{-5}$  M pour l'ésérine et de  $1,3 \times 10^{-3}$  M pour le malathion et le chlorpyrifos. Soit 0,12 ml de malathion technique (95 %) dans 3 ml d'acétone ajusté à 150 ml avec du tampon, et 41 mg d'ésérine dans les mêmes quantités d'alcool et de tampon.

## 3. RÉSULTATS

### 3.1. $\alpha + \beta$ naphthyl-acétate

Dès les premières migrations nous avons observé un dimorphisme sexuel caractérisé par la présence d'au moins une bande supplémentaire chez les mâles. Cette différence avait déjà été observée par Freyvogel *et al.* (1968). Elle est identique chez les deux souches étudiées.

La zone d'activité intense présente apparemment deux bandes (A et B) chez la femelle et trois chez le mâle (A, B et C). De plus dans les deux souches on observe souvent une ou deux bandes supplémentaires en arrière des bandes A, B et C (fig. 1a et 2).

TABLEAU I

	A-estérases Arylestérases ArE	B-estérases Aliestérases AliE	Cholinestérases ChE
Spécificité			
Esters aromatiques	+++	+	+
Esters aliphatiques	—	+++	++
Cholinesters	—	—	+++
Inhibiteurs			
Organophosphorés ( $1,3 \times 10^{-3}$ M)	—	+++	+++
Esérine ( $10^{-3}$ M)	—	—	+++
EDTA	+++	—	—

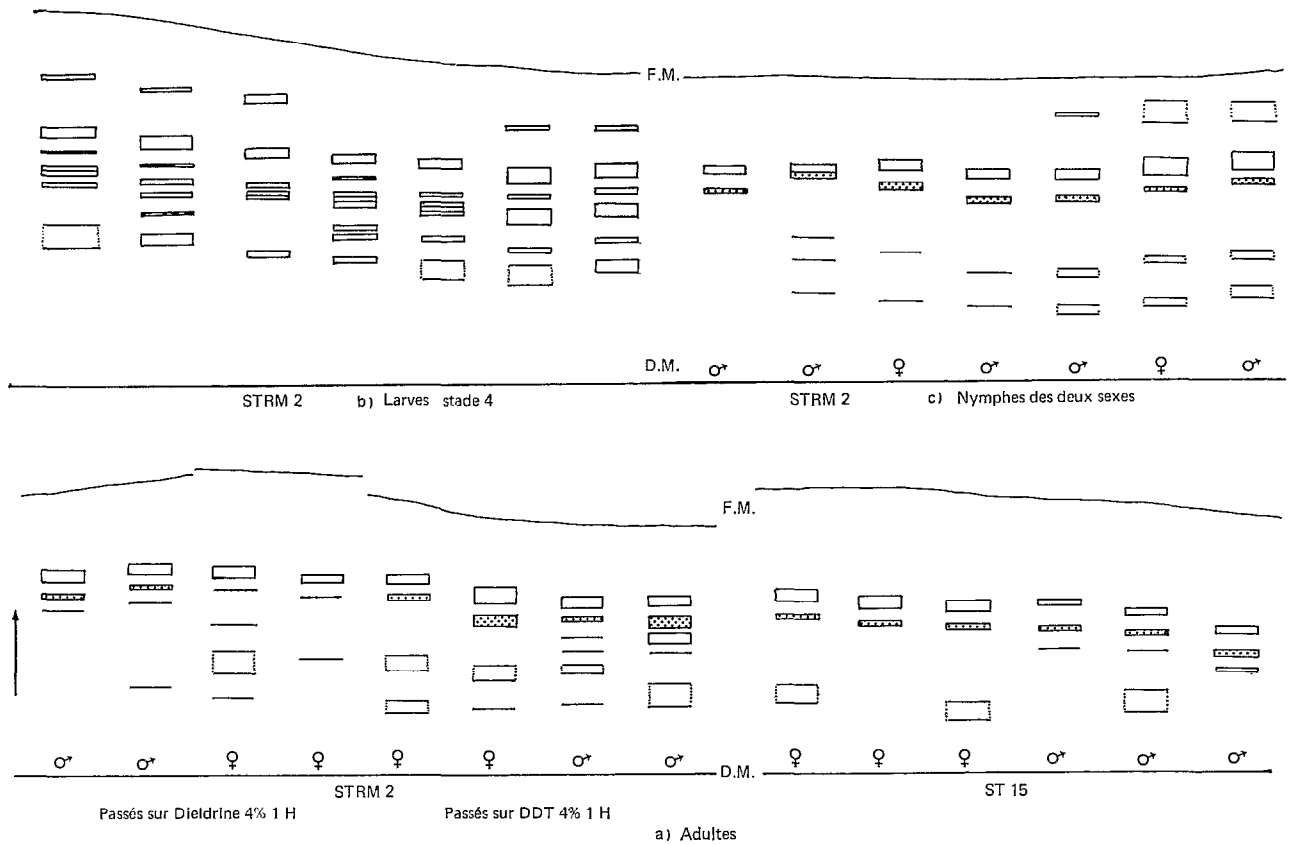


FIG. 1. — Exemples de révélations en  $\alpha + \beta$  naphthyl acétate des différents stades de développement d'*Anopheles stephensi*. P.M. : front de migration (bleu de bromophénol). D.M. : départ de la migration.

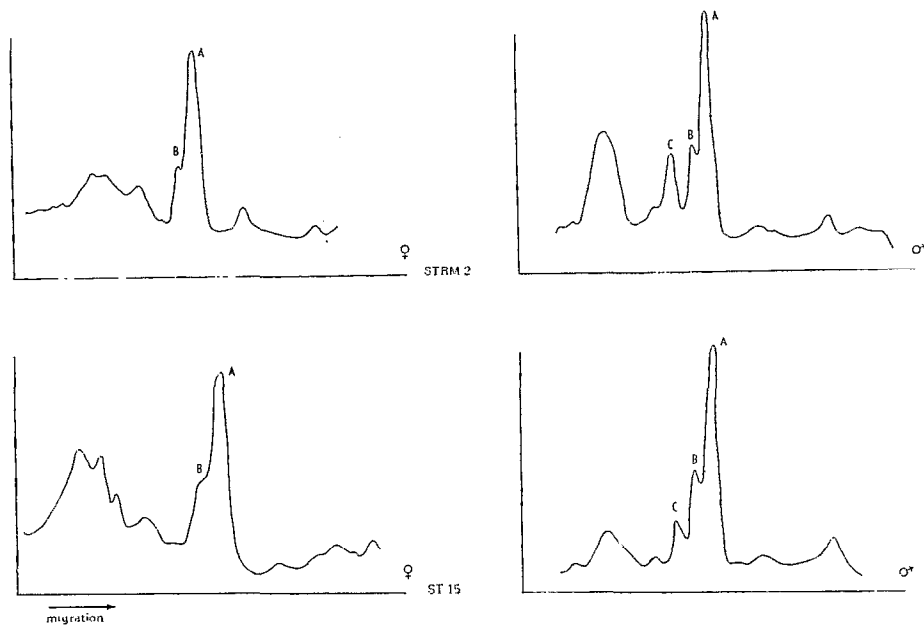


FIG. 2. — Migrations comparées des mâles et des femelles ST 15 et STR M2, révélés par  $\alpha + \beta$  naphthyl acétate.

## ÉTUDE DES ESTÉRASES DE DEUX SOUCHES D'*ANOPHELES STEPHENSI*

Les bandes apparaissent colorées de deux manières, la bande A en rose, la bande B en brun et la C en rose ; les bandes supplémentaires amont et aval quand elles existent sont roses. Ceci est dû à une préférence (et non à une spécificité) des estérases pour l' $\alpha$  naphthyl acétate (coloration brune) ou le  $\beta$  naphthyl acétate (coloration rose). En effet si l'on fait une révélation en présence d' $\alpha$  ou de  $\beta$  naphthyl acétate seul, toutes les bandes apparaissent de la même couleur, mais quand le mélange est présent, les deux teintes sont observées.

La finesse des bandes n'étant jamais très bonne et le fond du gel étant toujours assez foncé, nous avons essayé la révélation à l'indoxy-acétate.

### 3.1.1. INDOXYL-ACÉTATE

Les résultats obtenus avec l' $\alpha + \beta$  naphthyl acétate, ont été confirmés, mais de nouvelles bandes ont été observées.

En effet, la bande C s'est avérée être une double bande (8 et 9), chez le mâle de ST 15 de manière nette, et beaucoup moins nette chez STR/M2. Une bande supplémentaire (11) existe aussi, dans les deux sexes, entre A et B (fig. 3, 4, 5 et 6).

Une électrophorèse sur disque (« disc electro-

phoresis » des auteurs anglo-saxons) de 5 mm de diamètre nous a montré au moins 12 bandes, visibles à l'œil et au densitomètre, chez les mâles de ST 15, et 9 chez les femelles de la même souche. Ces migrations ont été effectuées avec des lots de 10 et 15 individus (fig. 4).

### 3.1.2. INHIBITIONS (CF. ANNEXE II)

Les inhibitions faites avec des organophosphorés entraînent une disparition presque complète de toutes les bandes des mâles ou des femelles et ce dans les deux souches. Ceci indique que les estérases en présence ne sont ni des arylestérases, ni des estérases C.

Les inhibitions réalisées avec l'ésérine montrent une disparition des bandes 10 et 11 chez les mâles et les femelles des deux souches (fig. 7).

Une expérience effectuée avec deux concentrations d'ésérine (sur ST 15, a montré qu'à  $10^{-5}$  M la disparition des bandes 10 et 11 n'est pas totale, alors que l'inhibition est complète à la concentration  $10^{-3}$  M (fig. 8). Ceci est dû à la compétition entre le substrat et l'inhibiteur.

D'après le tableau du § 2.3.2 ceci indique que ces bandes sont des cholinestérases, les autres bandes non inhibées par l'ésérine  $10^{-3}$  M sont des aliestérases.

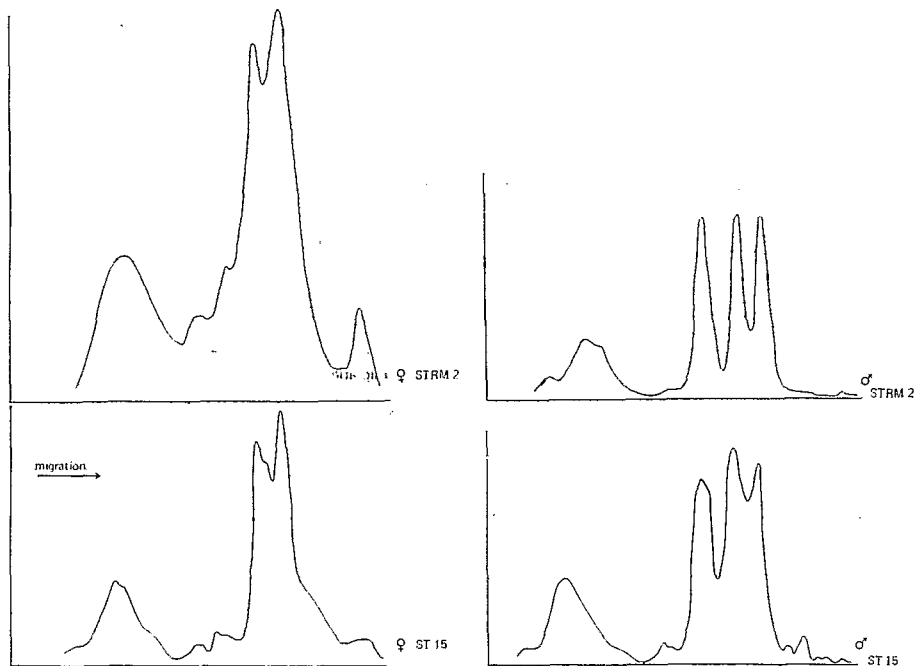


FIG. 3. — Migrations comparées des mâles et des femelles ST 15 et ST RM2, révélés par indoxy acétate.

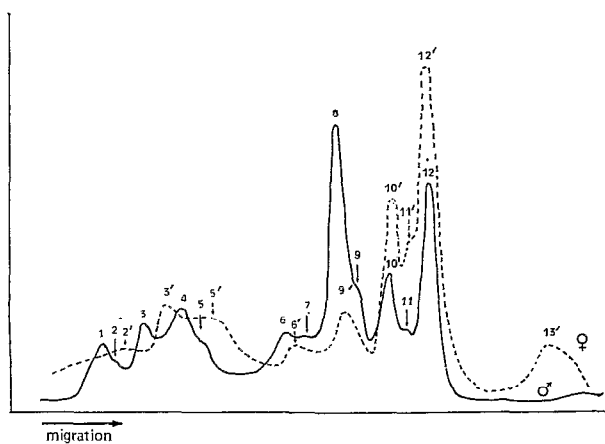


FIG. 4. — Migrations sur disques.  
Révélation en IAc des estérases de mâles  
et de femelles ST 15.

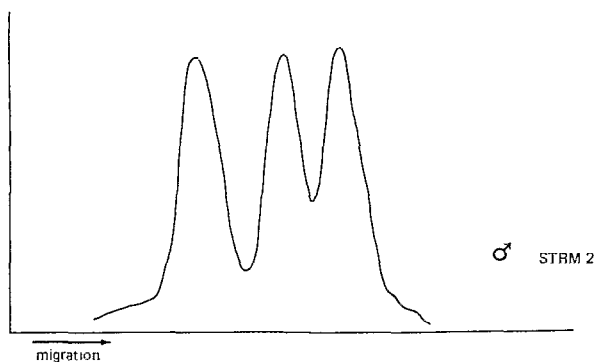
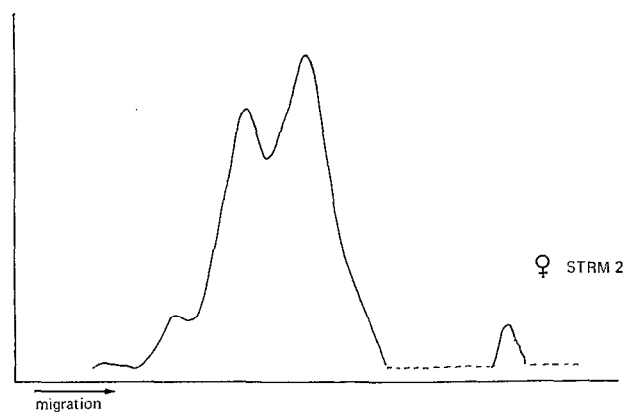
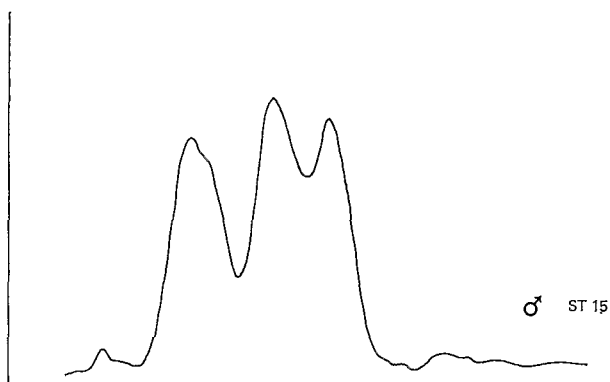
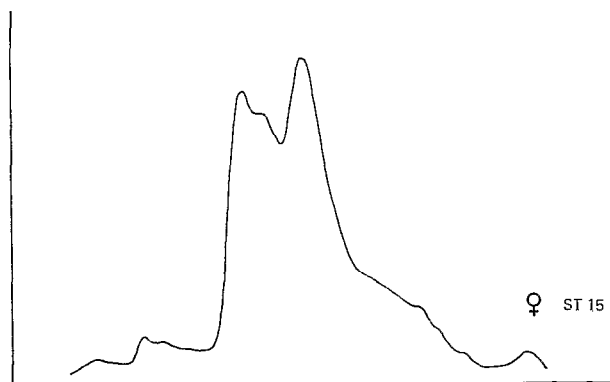


FIG. 6. — Détail à vitesse de défilement plus lente  
des migrations des femelles ST 15 et ST RM2 (IAc).

FIG. 5. — Détail à vitesse de défilement plus lente  
des migrations des mâles ST 15 et ST RM2 (IAc).

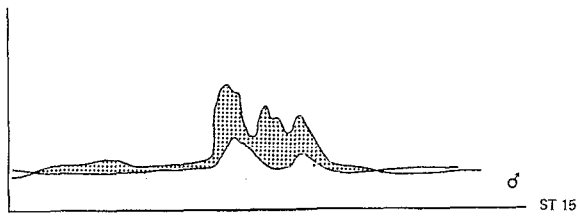
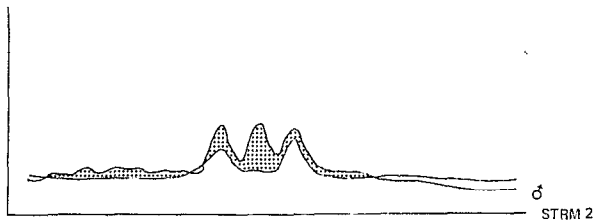
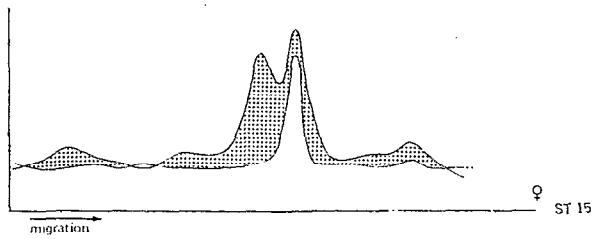
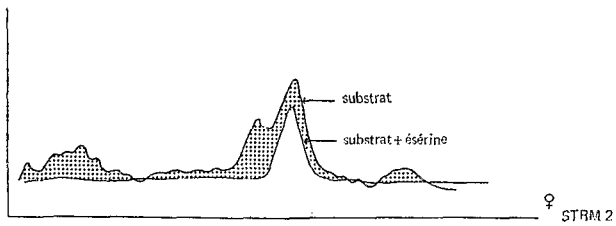
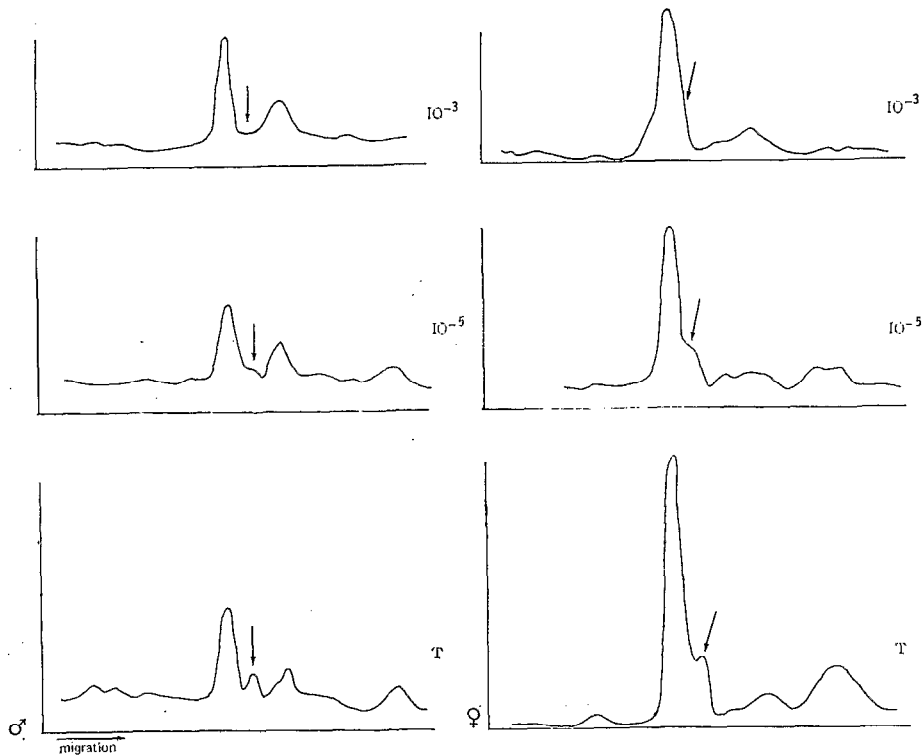


FIG. 7. — Migrations comparées des mâles et des femelles de deux souches, avec et sans inhibition par éserine (IAC).

FIG. 8. — Étude de l'inhibition par l'éserine, à deux concentrations, des estérases des mâles et des femelles de la souche ST 15.



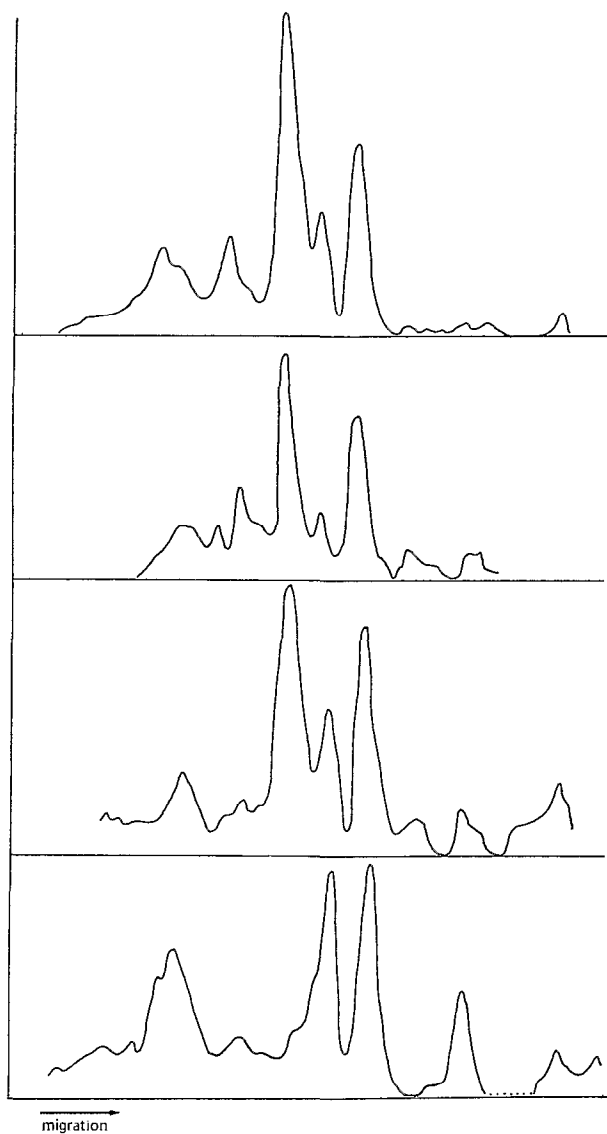


FIG. 9. — Lectures densitométriques de migrations de larves de stade 4 de la souche ST 15 ( $\alpha + \beta$  naphthyl acétate).

### 3.2. Larves et nymphes

Les migrations que nous avons effectuées sur des larves et des nymphes (avec révélation à l' $\alpha + \beta$  naphthyl acétate) montrent une plus grande diversité des bandes.

Chez les larves, on peut observer un nombre de bandes assez élevé (environ 9, fig. 1b), alors que chez les nymphes on ne trouve plus que deux bandes bien

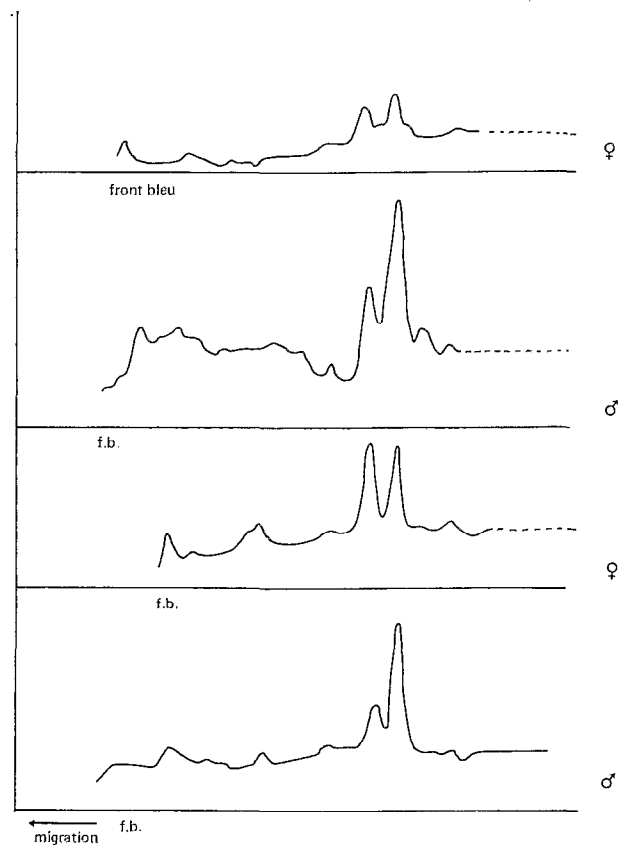


FIG. 10. — Lectures densitométriques de migrations de nymphes de la souche ST 15 ( $\alpha + \beta$  naphthyl acétate).

nettes, que ce soit chez les mâles ou les femelles (fig. 1c et 10). Dans les deux souches (fig. 1c) quelquefois, une ou deux bandes plus lentes ou plus rapides existent chez certains individus.

### 4. DISCUSSION

Au niveau des bandes centrales la présence de couleurs différentes, et le fait que le nombre de bandes observées (supérieur à deux) dans les deux sexes est indépendant du nombre d'adultes traités par extraits indique que nous sommes en présence de plusieurs loci. Le fait que le nombre de bandes est constant quel que soit le nombre d'individus montre que nous sommes vraisemblablement en présence d'une population homozygote (ce qui se conçoit vu la sélection réalisée par intercroisement successifs au cours de nombreuses générations obtenues en cages d'élevage).



## ÉTUDE DES ESTÉRASES DE DEUX SOUCHES D'*ANOPHELES STEPHENSI*

La comparaison des deux souches d'*Anopheles stephensi* montre une différence au niveau des bandes centrales. En effet (fig. 5 et 6) en Iac on observe au densitomètre 5 bandes chez les mâles ST 15 et seulement 3 chez les STR/M2. De même les femelles ST 15 présentent 3 bandes alors que les femelles STR/M2 n'en ont que 2.

Il faut donc faire attention lors d'une étude, par électrophorèse, de ne pas attribuer des bandes en plus ou en moins à des différences spécifiques; en effet on est ici en présence de deux souches de la même espèce, parfaitement interfécondes, mais qui présentent une variation enzymatique.

Il n'est pas encore possible de corréler cette différence dans le «pool» estérasiq ue au caractère sensible ou résistant. Des croisements entre adultes des deux souches permettront peut-être de voir s'il existe une dominance éventuelle d'une souche plus «sauvage» (ST 15) sur une souche plus sélectionnée (STR M2).

D'autre part, il sera intéressant de faire des migrations comparées entre des adultes ayant subi des pressions sélectives de DDT ou de dieldrine et ayant survécu à d'autres adultes de la même souche (STR/M2) tués par la même dose d'insecticides; en effet, le pourcentage de morts d'un test fait avec du DDT ou de la dieldrine à 4 % et avec une heure de contact est quand même d'environ 15 à 20 % dans cette souche.

### 5. CONCLUSION

Les estérases d'*Anopheles stephensi* montrent un dimorphisme sexuel bien marqué. De plus, un certain polymorphisme apparaît entre les deux souches étudiées, la souche sensible présentant plus de bandes que la souche résistante. Ce polymorphisme n'est en rien un caractère d'espèce et seuls des croisements avec étude électrophorétique de la descendance pourront permettre éventuellement de lier ce phénomène au caractère résistant ou non.

### REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout particulièrement le laboratoire du B.A.P.U.-O.R.S.T.O.M. et M<sup>me</sup> Riandey pour les conseils, l'aide et l'accueil qui m'a toujours été réservé.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.  
le 6 janvier 1981.

### BIBLIOGRAPHIE

- ALDRIDGE (W. N.), 1953. — Serum Esterases — I — Two types of esterases (A and B) hydrolysing P-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a methode for their determination. *Biochem. J.*, 53 : 110-117.
- AUGUSTINSSON (K. B.), 1961. — Multiples forms of esterases in vertebrate blood plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 94 : 884-860.
- BERGMAN (F.), SEGAL (R.) & RIMON (S.), 1957. — A new type of esterase in hog-kidney extract. *Biochem. J.*, 67 : 481-486.
- DAVIS (B. J.), 1964. — Disc electrophoresis — II — Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 121 : 404-427.
- FREYVOGEL (T. A.), HUNTER (R. L.) & SMITH (E. M.), 1968. — Non specific esterases in mosquitoes. *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 12 : 765-790.
- MAHLER (H. R.) & CORDES (E. H.), 1961. — Biological Chemistry. Chap. 6 — Enzymes Kinetics. *Harpers Intern. ed.*
- PASTEUR (N.), 1977. — Recherches de génétique chez *Culex pipiens pipiens* L. Polymorphisme enzymatique, autogénèse et résistance aux insecticides organophosphorés. Thèse de Docteur ès Sciences, USTL, Montpellier.
- RICHTER (D.) & CROFT (P. G.), 1942. — Blood esterases. *Biochem. J.*, 36 : 746-757.
- SHAW (C. R.) & PRASAD (R.), 1970. — Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4 : 297-320.
- URIEL (J.), 1964. — Characterization reaction of protein constituent, following electrophoresis or immunoelectrophoresis in agar. In *Immuno-electrophoresis analysis* : 30-57. P. GRABAR & P. BURTIN, Elsevier, Amsterdam, London, Paris.

## ANNEXE I

Tampon bac de migration (pH 8,3) ; Davis, 1964.

TRIS (Tris (hydroxyméthyl) aminométhane) 0,6 g/l  
Glycine 2,88 g/l

Gel d'acrylamide (à 7 %) ; Davis, 1964.

**Solution I (pH 8,9)**

TRIS	18,15	g	} 1 part
TEMED (N-N'-N'-N'-tétra- méthyl éthylène diamine)	0,23	ml	
HCl (1N)	24	ml	
H <sub>2</sub> O QSP	100	ml	

**Solution II**

Acrylamide	28	g	} 1 part
Bis (N-N'-méthylène bis acrylamide)	0,735	g	
H <sub>2</sub> O QSP	100	ml	

**Solution III**

Persulfate d'ammonium	140	mg	} 2 parts
H <sub>2</sub> O QSP	100	ml	

Mélanger puis dégazer à la trompe à vide

Couler dans le moule et laisser polymériser au moins 1 heure.

Tampon d'extraction (pH 8,5)

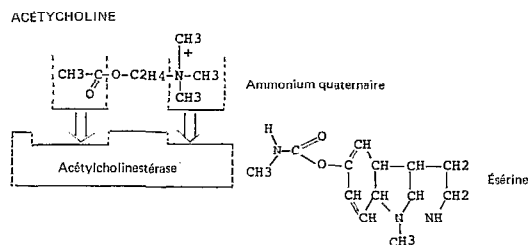
TRIS 0,2 M	50	ml
HCl 0,2 N	14,4	ml
Mercaptoéthanol	15	μl
+ quelques gouttes de bleu de bromophénol		

Solution de conservation des gels

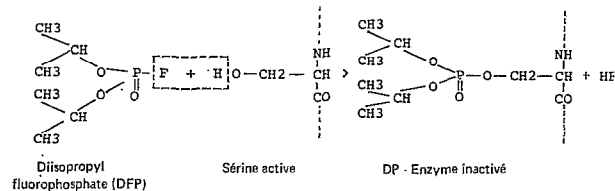
Acide acétique	7,5	%
Méthanol	5	%
H <sub>2</sub> O QSP		

## ANNEXE II

L'inhibition d'une estérase par l'ésérine est une inhibition compétitive dont il est possible de représenter ainsi le mécanisme :



La réaction stoechiométrique d'inhibition par les organophosphorés, basée sur le fait qu'il existe une sérine dans le site actif de la plupart des estérases (Mahler & Cordes, 1961) peut être représentée ainsi :



Par analogie de structure l'action inhibitrice du malathion et du chlorpyrifos peut être envisagée de la façon suivante :

