

Caractérisation des estérases chez des larves du complexe *Simulium damnosum* résistantes aux insecticides organophosphorés ⁽¹⁾

Michel MAGNIN ⁽²⁾⁽³⁾, Daniel KURTAK ⁽⁴⁾,
Nicole PASTEUR ⁽²⁾

Résumé

Trois échantillons larvaires du complexe *Simulium damnosum* originaires de Côte d'Ivoire ont été étudiés afin de mettre en relation une augmentation d'activité estérasique avec la résistance à deux insecticides organophosphorés, le téméphos et le chlorphoxime. L'activité observée dans des extraits totaux est corrélée à la résistance, mais la variation individuelle à l'intérieur de chaque échantillon est très grande. Aucune estérase caractéristique des deux populations résistantes n'a été mise en évidence après électrophorèse. L'intérêt opérationnel d'une étude plus complète est discutée.

Mots-clés : *Simulium damnosum* — Résistance — Téméphos — Chlorphoxime — Estérase.

Summary

CHARACTERIZATION OF ESTERASES IN THE LARVAE OF THE *SIMULIUM DAMNOSUM* COMPLEX RESISTANT TO ORGANOPHOSPHATES. Larvae (6th and 7th instars) belonging to the *Simulium damnosum* complex were collected in three localities of the Ivory Coast, West Africa, during February 1986. Esterasic activity was studied in relation with susceptibility to the organophosphates temephos and chlorphoxim.

Total esterasic activity appeared to be correlated with the level of resistance, although there was a large heterogeneity among individuals within each population. A similar heterogeneity was also revealed by starch gel electrophoresis. Some individuals of the "resistant" samples displayed low activity, whereas some individuals of the "susceptible" sample had medium activity for one isozyme. This heterogeneity could also be due to the presence of a mixture of susceptible and resistant species of the complex in the samples tested. Polyacrylamide gel electrophoresis of denaturated extracts labelled with tritiated diisopropylfluorophosphates, an esterase inhibitor, did not show different esterasic enzymes in resistant insects.

The operational interest of a more complete study is discussed.

Key words : *Simulium damnosum* — Resistance — Temephos — Chlorphoxim — Esterase.

(1) Ce travail a bénéficié d'une mission spéciale en Côte d'Ivoire financée par l'Unité de Recherche Lutte contre les Vecteurs de l'ORSTOM (Dr. G. Chauvet), de l'aide financière de l'INSERM (contrat 84-1019), du MRT (contrat 85.T.0869) et du PIREN/CNRS (ATP « Écotoxicologie »).

(2) Laboratoire de Génétique, Institut des Sciences de l'Évolution (CNRS : UA 327), Université de Montpellier II, Place E. Bataillon, 34060 Montpellier, France.

(3) Unité ORSTOM, U.R. Lutte contre les Vecteurs, 3191 route de Mende, 34060 Montpellier, France.

(4) Programme OMS de Lutte contre l'Onchocercose en Afrique de l'Ouest (OMS/ONCHO), B.P. 549, Ouagadougou, Burkina Faso.

Introduction

L'utilisation intensive d'un insecticide organophosphoré, le téméphos (Abate[®]), dans le cadre du Programme OMS de Lutte contre l'Onchocercose en Afrique de l'Ouest s'est accompagnée du développement d'une résistance à ce composé dans les populations de vecteurs, les simulies appartenant au complexe *Simulium damnosum*. Cette résistance pose actuellement des problèmes économiques et opérationnels très importants (Guillet, 1985 ; Kurtak, 1986 ; Kurtak *et al.*, sous presse).

En Côte d'Ivoire, seuls des foyers ponctuels de résistance au téméphos sont apparus chez les espèces de savane (Guillet, 1985). En zone forestière, par contre, une résistance au téméphos de 45 fois a été mise en évidence 16 mois après le début des traitements (Guillet *et al.*, 1980) chez les deux espèces occupant cette zone, *S. sanctipauli* Vajime et Dunbar et *S. soubrense* Vajime et Dunbar. En 1982, Kurtak *et al.* constatent que les populations déjà résistantes au téméphos sont devenues résistantes au chlorphoxime, et en 1985 il existe une résistance croisée avec le chlorpyrifos-méthyl et le pirimiphos-méthyl (Guillet, 1985).

L'effet synergiste positif très important qu'a le DEF (S, S, S, tributyl-phosphorothioate) sur la résistance (Guillet, 1985 ; Kurtak *et al.*, sous presse), suggère que des estérases et/ou des glutathion-S-transférases sont impliquées dans les phénomènes de résistance aux organophosphorés, ce qui corrobore les études de Meredith (1983) qui montraient une activité estérasique plus élevée chez les adultes provenant des populations résistantes.

Dans cet article nous rapportons les essais que nous avons menés pour caractériser les estérases de larves du complexe *Simulium damnosum* originaires de trois populations de Côte d'Ivoire présentant des degrés de résistance différents.

Matériels et méthodes

Trois échantillons de larves du complexe *Simulium damnosum* ont été prélevés en février 1986 en zone forestière de Côte d'Ivoire à Akakro (sur le M'pedo), aux Chutes Gauthier (sur le Bandama) et à Amiakouasikro (rivière Comoé). Ces trois populations font l'objet d'un suivi de la résistance au téméphos et au chlorphoxime, dans certains cas depuis 1980, en utilisant des tests de sensibilité basés sur la méthode de Mouchet *et al.* (1977).

Les larves de 6^e et 7^e stades ont été congelées dans

l'azote liquide immédiatement après leur récolte pour les études enzymatiques.

L'activité estérasique totale a été estimée sur des lots de 25 larves de chaque échantillon broyées à 4° C dans 2 ml de tampon phosphate 5 mM pH 6,4. Après centrifugation (dix minutes à 10 000 rpm), 50 µl de surnageant ont été incubés pendant cinq minutes avec 750 µl de tampon phosphate et 100 µl d'une solution acétonique 10⁻³M d'alpha-naphthyl acétate ou de bêta-naphthyl acétate. 100 µl d'une solution de Fast Garnett GBC salt (300 mg dans 10 ml d'eau, 3 % de dodécyl sulfate de sodium) sont alors ajoutés. La lecture est effectuée au spectrophotomètre après une minute, à 527 nm pour l'alpha-naphthyl acétate et à 505 nm pour le bêta-naphthyl acétate. La quantité de protéines contenue dans les différents extraits est déterminée par la méthode du Bleu de Coomassie (Bradford, 1976).

L'activité estérasique individuelle a été analysée en broyant individuellement entre 15 et 20 larves de chaque échantillon dans 150 µl de tampon phosphate. L'extrait a été traité comme décrit précédemment en utilisant de l'alpha-naphthyl acétate comme substrat et la lecture au spectrophotomètre a été effectuée 30 minutes après l'addition du Fast Garnett.

Étude par électrophorèse en gel d'amidon : les enzymes à activité estérasique ont été mis en évidence, après électrophorèse en gel d'amidon, par leur activité vis-à-vis de différents substrats. Chaque larve est broyée dans 20 µl d'eau distillée ; cet extrait est utilisé pour imbiber un rectangle de papier filtre qui est ensuite placé dans le gel. Deux systèmes de tampon de migration ont été utilisés : le système décrit par Poulik (1957) et le système Tris maléate (TME) décrit par Selander *et al.* (1971). Après migration, les estérases ont été relevées :

(a) par des incubations de cinq à 15 minutes dans une solution composée de 40 ml de tampon phosphate NaK 0,1 M à pH 6,5, 5 ml d'alpha-naphthyl acétate à 2 % dans l'acétone, 5 ml de bêta-naphthyl acétate à 2 % dans l'acétone, puis addition de 300 mg de Fast Garnett GBC salt.

(b) par une incubation de 15 minutes dans 50 ml de tampon phosphate 0,04 M pH 7,0, 1 ml d'alpha-naphthyl propionate à 1 % dans l'acétone, 1 ml de bêta-naphthyl propionate à 1 % dans l'acétone, puis addition de 20 mg de Fast Blue RR.

Les gels sont fixés dans une solution d'acide acétique (un volume), de méthanol (quatre volumes) et d'eau (cinq volumes).

Étude des protéines totales et marquage au diisopropyl-fluorophosphate (DFP) tritié : 25 larves de chaque

échantillon ont été broyées à 4° C dans 2 ml de tampon imidazole 25 mM pH 7,4. Après centrifugation (dix minutes à 10 000 rpm), 10 µl de DFP tritié sont ajoutés à 1 ml du surnageant. Après une incubation de 24 heures, les protéines sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes selon la technique utilisée par Fournier *et al.* (1987). Le profil protéique total est révélé au Bleu de Coomassie et une autoradiographie du gel est réalisée.

Résultats

Le complexe *Simulium damnosum* est représenté en Afrique de l'Ouest par plusieurs espèces jumelles que l'on commence à pouvoir identifier par l'examen des chromosomes (Vajime et Dunbar, 1975 ; Post, 1986). La nomenclature des différentes espèces est encore mal établie et souvent révisée.

Deux des localités de forêt ivoirienne étudiées ici ont fait l'objet d'analyses récentes. À Akakro, il

semblerait qu'il n'existe que l'espèce *S. yahense* (Guillet *et al.*, 1985 ; Guillet, communication personnelle). Au contraire, aux Chutes Gauthier, il existe un mélange d'au moins deux espèces : *S. damnosum* s. s., présumée de savane et *S. sanctipauli* sensu novo (Post, 1986 ; ancien *soubrense/sanctipauli* Vajime et Dunbar). La proportion de ces deux espèces est très variable dans le temps (13 *sanctipauli* pour une *damnosum* le 17.02.86, deux *sanctipauli* pour 17 *damnosum* le 20.02.86 ; Guillet, communication personnelle). Nous n'avons pas de données sur la composition spécifique de la population d'Amiakouasikro.

Sensibilité au téméphos et au chlorphoxime des populations étudiées

Dans le tableau I sont présentés les résultats des tests de sensibilité aux deux insecticides organophosphorés pratiqués entre 1983 et 1986 sur des échantillons prélevés dans les trois localités que nous avons étudiées. Alors que les résultats sont relativement cons-

TABLEAU I

Résultats des tests de sensibilité au téméphos et au chlorphoxime des trois populations échantillonnées

population (statut)	date	insecticide	DL 50 (mg/l)	DL 95 (mg/l)	DL 100 (mg/l) (observée)
Akakro (sensible)	12/83	téméphos	0,15 (0,14-0,17) ^{a)}	0,38 (0,34-0,44)	0,625
		chlorphoxime	0,0086 ^{b)}	0,019	0,020
	01/86	téméphos	0,045	0,29	0,63
		chlorphoxime	0,011 (0,008-0,014)	0,03 (0,02-0,04)	0,031
Chutes Gauthier (résistante)	01/85	téméphos	35 (20-50) TR ^{c)} = 233	16.600 TR = 45.000	>16.600
		chlorphoxime	0,12 (0,086-0,17) TR = 14	0,44 (0,26-1,6) TR = 23	0,5
	01/86	téméphos	0,044 TR = 1	9,3 TR = 32	50
		chlorphoxime	0,0033 TR = 3	0,03 TR = 1	0,031
Amiakoua- sikro (résistante)	06/85	téméphos	2,5 (1,9-3,4) TR = 55	110 (58-220) TR = 379	>200
		chlorphoxime	0,024 (0,020-0,026) TR = 2,2	0,095 (0,076-0,13) TR = 3,2	0,25

a) intervalle de confiance à 95% b) données hétérogènes c) taux de résistance

tants à Akakro, une variation importante entre prélèvements existe aux Chutes Gauthier. Bien que les résultats de sensibilité soient difficilement extrapolables aux échantillons que nous avons prélevés, on peut considérer que les larves de l'échantillon d'Akakro sont globalement plus sensibles que celles des deux autres localités.

Activité estérasiqne globale

Deux essais ont été effectués sur des broyats de 25 larves de chaque échantillon à deux jours d'intervalle avec l'alpha-naphthyl acétate, alors qu'un seul a été réalisé avec le bêta-naphthyl acétate. L'activité estérasiqne globale est plus importante dans les deux échantillons où la résistance est la plus importante (Chutes Gauthier et Amiakouasikro), quel que soit le substrat utilisé (tabl. II) et on peut noter que les réactions estérasiqnes semblent plus importantes avec l'alpha-naphthyl acétate qu'avec le bêta-naphthyl acétate, comme l'avait observé Meredith (1983) sur des similies adultes.

Activité estérasiqne individuelle

Si l'on considère l'activité estérasiqne au niveau de chaque individu (fig. 1), on constate de grandes variations dans chaque échantillon. Ainsi les densités optiques (DO) varient respectivement de 5 à 31×10^{-3} pour Akakro, de 18 à 43×10^{-3} pour Chutes Gauthier et de 15 à 58×10^{-3} pour Amiakouasikro. Comme l'indiquait

l'étude de l'activité estérasiqne sur des extraits de plusieurs larves, les larves de cette dernière population présentent, en moyenne, une activité estérasiqne plus élevée que celles des Chutes Gauthier et d'Akakro. Il en est de même pour les larves des Chutes Gauthier vis-à-

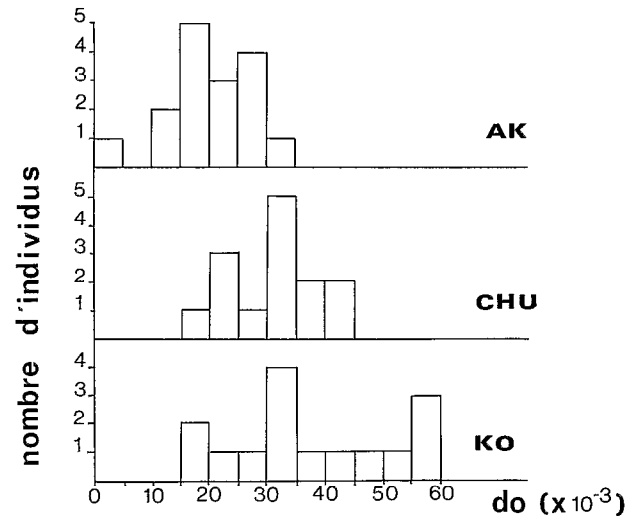


FIG. 1. — Activités estérasiqnes individuelles (exprimées en densité optique = DO) de larves de 6^{me} et 7^{me} stades des trois échantillons de similies étudiés (AK = Akakro ; CHU = Chutes Gauthier ; KO = Amiakouasikro).

TABLEAU II

Activité estérasiqne totale d'extraits de larves au 6^{me} et 7^{me} stades de similies

population		alpha-naphthyl acétate		bêta-naphthyl acétate	
		substrat hydrolysé (ng/min/mg de protéine)	rapport résistant/sensible	substrat hydrolysé (ng/min/mg de protéine)	rapport résistant/sensible
Akakro	essai 1	$0,53 \times 10^5$	1	-	-
	essai 2	$1,3 \times 10^5$	1	$0,4 \times 10^5$	1
Chutes Gauthier	essai 1	$1,1 \times 10^5$	2,1	-	-
	essai 2	$1,6 \times 10^5$	1,3	$0,5 \times 10^5$	1,2
Amiakouasikro	essai 1	$1,4 \times 10^5$	2,6	-	-
	essai 2	$1,7 \times 10^5$	1,4	$0,6 \times 10^5$	1,6

vis de celles d'Akakro. Cependant la variation entre individus au sein de chaque échantillon est importante et une proportion importante d'individus de la population « sensible » d'Akakro présentent une activité estérasiqne semblable à celle qui est observée chez des individus des populations « résistantes » des Chutes Gauthier et d'Amiakouasikro.

Caractérisation électrophorétique des estérases

Les différentes électrophorèses pratiquées en gel d'amidon n'ont pas permis de mettre en évidence d'estérases n'existant que dans les populations résistantes des Chutes Gauthier ou d'Amiakouasikro. En gel TME, plusieurs estérases (ou isozymes) sont révélées dans les échantillons d'Akakro et des Chutes Gauthier, relativement proches géographiquement, alors qu'une seule est observée dans l'échantillon d'Amiakouasikro, site très éloigné géographiquement des deux premiers. Des résultats analogues ont été rapportés entre différentes populations du complexe *Simulium damnosum* en zone de forêt ivoirienne (Guillet, 1985).

Une différence dans l'intensité de coloration et la taille (donc dans l'activité) de l'isozyme commun aux trois échantillons existe entre les populations « résistantes » et la population « sensible ». Cet isozyme est présent chez tous les insectes mais est en moyenne plus actif aux Chutes Gauthier et à Amiakouasikro qu'à Akakro (cela est visible quel que soit le système de tampon d'électrophorèse utilisé et quelle que soit la procédure de révélation des estérases).

Étude des protéines totales et marquage au DFP tritié

Dans une étude récente, Fournier *et al.* (1987) ont montré que les estérases qui sont responsables de la résistance aux organophosphorés chez *Culex quinquefasciatus* et qui présentent une augmentation d'activité vis-à-vis du naphthyl acétate, peuvent être identifiées par marquage au DFP tritié suivi par une électrophorèse dénaturante. D'une part, elles présentent une radioactivité et, d'autre part, leur intensité de coloration par le Bleu de Coomassie est plus intense chez les souches résistantes que chez les souches sensibles.

En ce qui concerne les échantillons de simulies étudiés, le profil protéique total obtenu après électrophorèse en conditions dénaturantes et révélé grâce au Bleu de Coomassie, n'a pas montré de bandes protéiques spécifiques ou beaucoup plus intensément colorées dans les deux populations « résistantes » par rapport à la population « sensible ». L'utilisation de DFP tritié permet de visualiser après autoradiographie : (a) une protéine commune aux trois échantillons dont l'intensité de radioactivité semble plus forte chez les

individus « sensibles », et (b) deux protéines de faible poids moléculaire présentes chez les populations « résistantes » uniquement. Il est possible que ces deux dernières protéines représentent des produits de dégradation de la protéine commune aux trois échantillons, et on ne peut pas conclure sans autre vérification qu'il existe des estérases particulières chez les insectes résistants sur la base de cette expérience.

Nous disposons d'un sérum spécifique de l'estérase B1 qui détoxifie le téméphos chez les *Culex quinquefasciatus* de Californie et d'une sonde moléculaire de cette estérase (Mouchès *et al.*, 1986, sous presse). Nous n'avons mis en évidence aucune réaction immunologique croisée avec les extraits protéiques de simulies et la sonde de l'estérase B1 ne s'hybride pas avec l'ADN génomique d'extraits totaux des échantillons de simulies étudiés.

Discussion et conclusion

Notre étude a permis de confirmer la présence d'une activité estérasiqne plus forte dans les échantillons de simulies les plus résistants au téméphos et au chlorphoxime. L'activité estérasiqne est très variable entre individus du même échantillon, comme l'attestent les résultats observés sur des individus uniques après électrophorèse en gel d'amidon des extraits ou les tests enzymologiques sur larves individuelles, mais il apparaît clairement que la proportion d'individus avec une forte activité estérasiqne est plus importante dans les échantillons où la résistance est élevée. Cette hétérogénéité de l'activité estérasiqne pourrait refléter un mélange d'individus présentant des niveaux de résistance différents. Si l'activité estérasiqne et la résistance sont associées, les individus ayant une activité estérasiqne plus élevée seront préférentiellement sélectionnés par des traitements insecticides répétés. Toutefois, les différences d'activité estérasiqne que nous avons observées peuvent être indépendantes du niveau de résistance aux insecticides et simplement être le reflet de différences dans la proportion de différentes espèces du complexe *Simulium damnosum* dans nos échantillons. Il serait donc important, dans le futur, de déterminer de manière précise la nature de la liaison qu'il y a entre le taux de résistance d'un individu et l'activité estérasiqne qu'il contient, car l'analyse de cette activité est susceptible de fournir au personnel chargé de la lutte contre ces vecteurs des indications précieuses quant au niveau de résistance aux insecticides organophosphorés existant ou pouvant se développer dans chaque population.

L'impossibilité actuelle d'élever au laboratoire des souches de simulies ne permet pas, certes, une approche

directe, basée sur des sélections sur de nombreuses générations et des croisements, du type de celle qui a été utilisée sur les moustiques du complexe *Culex pipiens* en France et en Californie (Pasteur, 1977; Georghiou *et al.*, 1980; Raymond *et al.*, 1985). Cependant, il existe des approches indirectes utilisant des tests enzymologiques rapides, réalisables sur le terrain même dans des conditions difficiles, sur des larves ayant ou non été exposées à des insecticides. Il est probable que dans un futur proche, d'autres méthodologies, immunologiques ou de biologie moléculaire, pourront également être utilisées (Mouchès *et al.*, 1986, sous presse). Il convient donc, dès maintenant, de développer ces techniques sur le « matériel » simulies.

REMERCIEMENTS

Nous remercions MM. Guy Chauver, Jacques Duval, Henri Escaffre et Jean-Pierre Eouzan qui ont permis la réalisation matérielle et pratique de la récolte des échantillons de simulies; Claude Mouchès, Monique de Sylvestri, Valérie Beyssat et Jean-Baptiste Bergé de l'INRA d'Antibes qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail et Pierre Guillet qui nous a conseillés.

Nous remercions Monsieur le Directeur du Programme de Lutte contre l'Onchocercose (OCP) qui nous a autorisés à publier les résultats de tests biologiques réalisés dans le cadre de ce programme.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 6 avril 1987.

BIBLIOGRAPHIE

- BRADFORD (R. A.), 1976. — A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248.
- FOURNIER (D.), BRIDE (J. M.), MOUCHES (C.), RAYMOND (M.), MAGNIN (M.), BERGE (J. B.), PASTEUR (N.) et GEORGHIOU (G. P.), 1987. — Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphates resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pest. Biochem. Physiol.*, 27 : 211-217.
- GEORGHIOU (G. P.), PASTEUR (N.) et HAWLEY (M. K.), 1980. — Linkage relationship between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California. *J. Econ. Ent.*, 73 : 301-305.
- GUILLET (P.), 1985. — La lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest : étude de la résistance et recherche de nouveaux larvicides. Thèse Doctorat Sciences Naturelles, Université Paris Sud, Centre d'Orsay, 444 p.
- GUILLET (P.), ESCAFFRE (H.), QUEDRACCO (M.) et QUILLÉVERE (D.), 1980. — Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 18, 3 : 291-299.
- GUILLET (P.), HOUGARD (J. M.), DOANNIO (J.), ESCAFFRE (H.) et DUVAL (J.), 1985. — Évaluation de la sensibilité des larves du complexe *Simulium damnosum* à la toxine de *Bacillus thuringiensis* H14. 2. Sensibilité relative de quelques groupes d'espèces et possibilités d'utilisation de doses diagnostiques. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 23 (4) : 251-255.
- KURTAK (D.), 1986. — Insecticide resistance in the Onchocerciasis Control Programme. *Parasitology Today*, 2 : 19-20.
- KURTAK (D.), QUEDRACCO (M.), OCRAN (M.), TELE (B.) et GUILLET (P.), 1982. — Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate[®]). Doc. Miméo. WHO/VBC/82.850.
- KURTAK (D.), GRUNEWALD (J.) et BALDRY (D. A. T.), sous presse. — Chemical control of *Simulium* vectors of onchocerciasis in Africa. In « Black flies : Ecology, population management and annotated world list », (Kim and Merritt eds.), Pennsylvania State Univ. Press.
- KURTAK (D.), MEYER (R.), OCRAN (M.), RENAUD (P.), SAWADOGO (R.) et TELE (B.), sous presse. — The potential use of negative correlation between organophosphate resistance and pyrethroid susceptibility in managing resistance in *Simulium damnosum* s.l. (Diptera : Simuliidae) in the Onchocerciasis Control Programme. *Med. Vet. Entomol.*
- MEREDITH (S. E. O.), 1983. — Report to OCP : The improvement and refinement of electrophoretic techniques for the study of esterases and organophosphate resistance in the *S. damnosum* complex. Doc. Miméo. OMS/OCP.
- MOUCHES (C.), PASTEUR (N.), BERGE (J. B.), HYRIEN (O.), RAYMOND (M.), ROBERT DE SAINT-VINCENT (B.), SYLVESTRI (M. de) et GEORGHIOU (G. P.), 1986. — Amplification of an esterase gene is responsible of insecticide resistance in a *Culex* mosquito from California. *Science*, 233 : 778-780.
- MOUCHES (C.), MAGNIN (M.), BERGE (J. B.), SYLVESTRI (M. de), BEYSSAT (V.), PASTEUR (N.) et GEORGHIOU (G. P.), sous presse. — Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*
- MOUCHET (J.), QUELENNEC (G.), BERL (D.), SECHAN (Y.) et GREBAUT (S.), 1977. — Méthodologie pour tester les insecticides des larves de *Simulium damnosum* s.l. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 15 : 55-56.
- PASTEUR (N.), 1977. — Recherches de génétique chez *Culex pipiens pipiens* L. Polymorphisme enzymatique, autogénèse et résistance aux insecticides organophosphorés, Thèse Doctorat d'État, U.S.T.L. Montpellier, 170 p.
- POST (R. J.), 1986. — The cytotoxicity of *Simulium sanctipauli* and *Simulium soubrense* (Diptera : Simuliidae). *Genetica*, 69 : 191-207.
- POULIK (M. D.), 1957. — Starch electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180 : 1477.
- RAYMOND (M.), GAVEN (B.), PASTEUR (N.) et SINEGRE (G.), 1985. — Étude de la résistance au chlorpyrifos à partir de quelques souches du moustique *Culex pipiens* L. du sud de la France. *Génét. Sél. Evol.*, 17 : 73-88.
- SELANDER (R. K.), SMITH (M. H.), YANG (S. Y.), JOHNSON (W. E.) et GENTRY (J. B.), 1971. — Biochemical polymorphism in the genus *Peromyscus*. L. Variation of the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genet., Univ. Texas Publ. No. 7103* : 49-60.
- VAJIME (C. G.) et DUNBAR (R. W.), 1975. — Chromosomal identification of eight species of the subgenus *Edwardsellum* near and including *Simulium* (*Edwardsellum*) *damnosum* Theobald (Diptera : Simuliidae). *Tropen med. Parasit.*, 26 : 111-138.