

Le système des estérases carboxyliques chez *Anopheles stephensi*

MARIE-FRANCE RIANDEY

Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, ORSTOM, 70, route d'Aulnay, 94143 Bondy Cedex, France.
Reprints : M.-F. Riandey

Carboxylic esterases system in *Anopheles stephensi*

RÉSUMÉ

L'étude des estérases carboxyliques d'*Anopheles stephensi* a été réalisée par électrophorèse. L'utilisation d'insecticides inhibiteurs des estérases et la modification des conditions opératoires ont permis de mettre en évidence trois classes d'estérases. Un dimorphisme sexuel est observé : dans les deux sexes, on a identifié un gène diallélique codant pour une estérase sensible aux inhibiteurs, mais, chez les mâles uniquement, il existe un autre gène, également diallélique codant pour une autre estérase qui, elle, est insensible. ▲

ABSTRACT

The study of carboxylic esterases was made by electrophoresis using insecticides, inhibitors of esterases and different migrating conditions. Three classes of esterases were detected. We also observed a sexual dimorphism : in both sexes, a single diallelic gene is responsible for an esterase synthesis, sensitive to inhibitors and, in males only, another diallelic gene is responsible for a non sensitive esterase synthesis. ▲

Mots clés : dimorphisme, estérase, inhibition, insecticide, pH, résistance.
Key words : dimorphism, esterase, inhibition, insecticide, pH, resistance.

ABRIDGED VERSION

In mosquitoes, it was shown that carboxylic esterases (EST) were frequently involved in resistance processes to insecticides. We studied the esterases in *Anopheles stephensi* in order to clarify the genetic determinism and to show whether or not these enzymes are involved in resistance.

The method used is the starch gel electrophoresis in a discontinuous system at pH 6. Insects were treated one by one except in the case of inhibitions where pools were used.

Simple revelations showed a zymogram with three zones of esterase activity : the zones with shorter and longer migration (I) and (III) were invariable. On the contrary, the median zone (II) showed a variability : one to two bands in females, while in males, one to three bands were observed. The genetic determinism of this zone II seems therefore simple in females (a diallelic gene would be responsible for the synthesis of these enzymes), while it is less obvious in males.

Insecticides such as malathion (organophosphorous) and eserine (carbamate) were used to try to inhibit some EST and to identify the removed bands. Zone I was never inhibited and zone III was inhibited by malathion but not by eserine. Concerning zone II, it was completely inhibited in females, while two bands remained in males. The hypothesis about two genes being responsible for the synthesis of zone II in males is consistent with the results. One of

the genes is common to both sexes and the products of its alleles are inhibited by malathion and eserine. The other gene, which is also diallelic, generates enzymes which are not sensitive to these two insecticides. The most rapid allelomorph of the sensitive enzyme common to both sexes would migrate to the same site as the slower allelomorph of the non sensitive enzyme. This hypothesis could be confirmed through the modification of the operating conditions : as a matter of fact, using the same migration system at pH 8 instead of 6, one could observe an extension of the zymogram and four bands were observed in some males, which showed quite well that two diallelic genes responsible for the synthesis of EST of zone II in males could be present. With pH 8, the position of the allelomorphs of variable enzymes has, however, changed : the order of migration at pH 8 is as follows (from the origin to the anode) : enzyme of zone I, specific enzyme of males, variable enzymes common to both sexes and finally enzyme of zone III.

These experiments revealed a sexual dimorphism in *A. stephensi* which was also observed in *Anopheles subpictus* and *Anopheles funestus* by other authors who positioned these enzymes in the accessory glands of males. The same specific characteristics were found in *Drosophila melanogaster* where the enzyme was observed in the ejaculatory duct of males and plays a significant role in reproduction.

Moreover, we showed that the enzymes of *A. stephensi* are divided into three categories according to whether or not they were inhibited by carbamates and/or organophosphorous compounds. This result can be significant with respect to the phenomena of

Note présentée par Jules Hoffmann.

Note remise le 31 mars 1993, acceptée après révision le 30 août 1993.

resistance because a modified enzyme can lead to a resistance either to carbamates or to organophosphorous compounds. Moreover, some authors showed that EST can be the product of a very linked gene (or even the product of a gene) which makes a carrier strain resistant to a parasite such as *Plasmodium*.

Dès 1943, l'utilisation de molécules organiques telles que le DDT a suscité de grands espoirs pour la lutte contre les insectes nuisibles. Mais, très vite, l'efficacité des traitements a diminué du fait de l'apparition des premiers phénomènes de résistance chez les insectes. De nombreuses études ont été poursuivies afin d'en comprendre les mécanismes. Si certains de ces mécanismes conduisent à une résistance rare ou peu efficace, d'autres, en revanche, sont à l'origine de taux de résistance élevés [1]. Il s'agit soit de mutations ponctuelles affectant les gènes qui codent pour la cible de l'insecticide, soit, le plus souvent, de l'augmentation de l'activité des enzymes responsables de la détoxification que sont certaines estérases (EST), oxydases ou transférases [2]. Les études entreprises sur *Culex* [3, 4] ont révélé que l'accroissement de l'activité de certaines EST était dû à l'augmentation du nombre de copies du gène codant pour ces enzymes.

Chez *Anopheles stephensi*, la résistance au malathion est apparue dès 1975 en Iran [5, 6] et en 1978 au Pakistan [7]. Les recherches ont montré qu'elle était due à une estérase carboxylique [8] et qu'elle dépendait d'un seul gène autosomique [9].

Notre étude a été entreprise dans le but d'élucider le déterminisme génétique des EST, d'une part, et de rechercher, d'autre part, si ces enzymes sont impliquées dans un phénomène de résistance aux insecticides.

Matériel et méthodes

Matériel animal et extraction

La souche d'*A. stephensi* utilisée est originaire d'Irak. Elle est élevée au laboratoire depuis septembre 1973, en conditions contrôlées de température (24 °C), d'humidité (70 % HR) et de photopériode (12 h de jour).

L'extraction des EST est effectuée sur des moustiques adultes tués à -20 °C. Ils sont homogénéisés soit individuellement, soit en mélange avec une petite quantité d'eau (5 µl pour 1 moustique). Des confettis de papier « Watman » n° 1 sont imprégnés avec les extraits et déposés sur le support d'électrophorèse.

Electrophorèse

Pour la migration, la méthode est celle de Brewer [10] remaniée par Second et Trouslot [11] et par nous-même : plaques d'amidon horizontales à 14 %; tampon de gel : Histidine-HCl 5 mM pH 6 ou pH 8 contenant du NaCl 2,5 mM; tampon de bac : respectivement citrate de sodium 0,41 M pH 6 ou pH 8. Pour la migration qui dure environ 4 h avec un courant de 9,5 V/cm, les gels d'amidon sont réfrigérés à 5 °C grâce à des plaques à circulation d'eau et un cryostat.

La révélation des EST est effectuée à 37 °C et à l'obscurité. La technique utilisée est celle de Scandalios [12] modifiée

With a view to carrying on research work on the control of malaria, we are now considering the study of a strain of *A. stephensi* which is resistant to *Plasmodium* in order to determine the possible role of esterases in the transmission of malaria. ▲

comme suit en trois étapes : (1) le gel est incubé pendant 20 min dans du tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 ; (2) il est ensuite incubé pendant le même temps avec le tampon phosphate en présence de 1 % de α et β naphthylacétate préparé dans l'acétone (3 ml pour 100 au total) ; (3) enfin, 100 mg de Fast Blue RR sont ajoutés.

Inhibiteurs

Deux insecticides inhibiteurs des EST ont été utilisés : le malathion (organophosphoré) et l'ésérine (carbamate).

Le malathion technique à la concentration de 2500 mg/l nous a été fourni par l'OMS ; l'ésérine est commercialisée par Sigma sous forme d'un produit cristallisé pur. Pour ces deux inhibiteurs, la quantité nécessaire pour aboutir à une concentration finale de 10^{-3} M est pesée et dissoute dans 1 ml d'acétone avant d'être ajoutée au milieu réactionnel. Lorsqu'ils sont utilisés, les inhibiteurs sont ajoutés à la place du substrat dans l'étape (2) de la révélation, puis substrat et inhibiteur sont mis au contact de la plaque d'amidon pendant 10 min et, enfin, le colorant est ajouté.

Résultats

Révélation après migration à pH 6

Les EST des zones I et III (bandes de couleur rose) ne présentent aucune variabilité quel que soit le sexe (Fig. 1 et photo 1 de la Fig. 2). En revanche, les EST de la zone II (bandes de couleur marron) présentent de 1 à 2 bandes chez les femelles et de 1 à 3 bandes chez les mâles, ce qui avait déjà été observé chez cette espèce en 1968 [13], en 1981 [14] et en 1983 [15]. Chez les femelles, le déterminisme génétique semble donc assez simple : l'EST

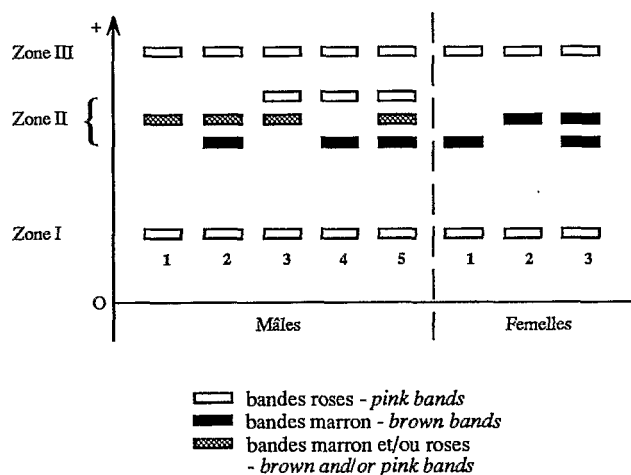


Figure 1. *Estérases chez les adultes à pH 6*. La zone II, variable, présente 3 types de zymogrammes chez les femelles, 5 chez les mâles.

serait codée par un gène diallélique, l'enzyme étant monomérique.

Pour essayer de déterminer la provenance de l'EST supplémentaire chez les mâles au niveau de la zone II, des expériences d'inhibition ont été tentées.

Révélation après inhibition

Cette expérience a été pratiquée sur des mélanges d'individus afin d'avoir une activité suffisamment élevée.

Les estérases peuvent être différenciées suivant trois classes (photo 3 de la Fig. 2), suivant qu'elles sont inhibées ou non par le malathion et/ou l'ésérine : (a) estérase non inhibée (zone I); (b) estérase inhibée par le malathion mais non par l'ésérine (zone III); (c) estérases inhibées par le malathion et l'ésérine (zone II des femelles).

La zone II présente, pour les témoins, 2 bandes chez les femelles et 3 chez les mâles, sans montrer de variabilité

puisque l'on travaille ici sur des mélanges d'individus. Avec les insecticides chez les femelles, les 2 bandes sont totalement inhibées; chez les mâles, en revanche, une seule bande semble sensible. L'interprétation que l'on peut en donner est la suivante : l'EST inhibée chez les mâles est la même que celle des femelles; celle qui ne l'est pas correspond à deux allèles d'une autre estérase ayant les mêmes propriétés que celle de la zone I et dont l'un des alléломorphes, le plus lent (S pour *slow*), migre au même endroit que l'alléломorphe le plus rapide (F pour *fast*) de l'enzyme sensible commune aux deux sexes (Fig. 3).

Tout se passe donc comme si la synthèse des enzymes de la zone II était dirigée par un gène diallélique chez la femelle et par deux gènes dialléliques chez le mâle.

Modification des conditions de migration

Le changement des conditions opératoires fait parfois apparaître une nouvelle variabilité [16]. On a donc

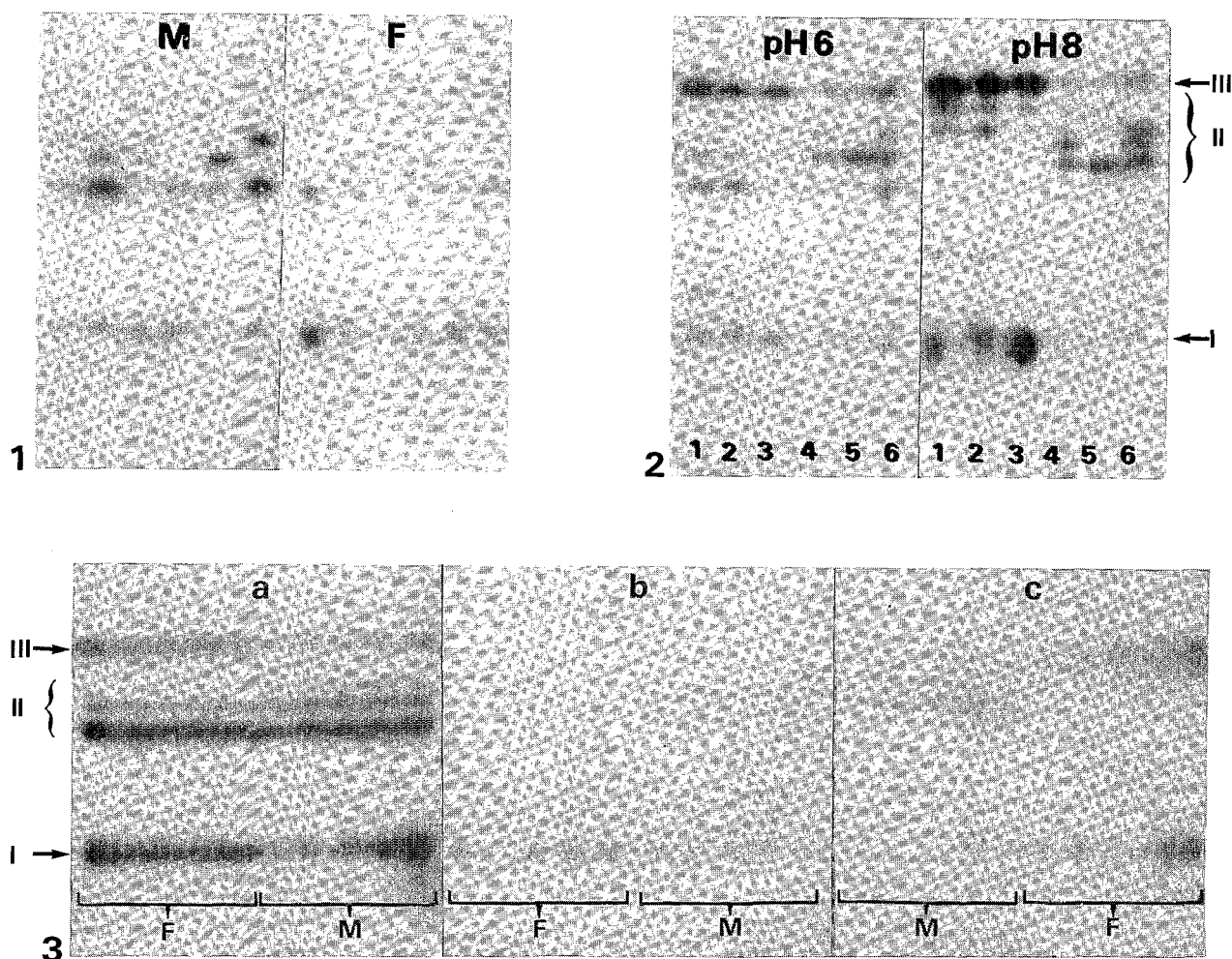


Figure 2. Pour tous les zymogrammes, le sens de migration se fait de bas en haut. **Photo 1.** Dimorphisme sexuel observé à pH 6 : la zone médiane présente de 1 à 2 bandes chez les femelles (F), de 1 à 3 chez les mâles (M). **Photo 2.** Migration à deux pH différents : dans la zone II, les femelles (1, 2 et 3) présentent au maximum 2 bandes pour les deux pH; les mâles (4, 5 et 6) présentent au plus 3 bandes à pH 6, mais à pH 8 le double hétérozygote est visible grâce à ses 4 bandes (4). **Photo 3.** Inhibition par les insecticides à 10^{-3} M : (a) témoin; (b) inhibition par le malathion; (c) inhibition par l'ésérine (le gel c est inversé par rapport aux gels (a) et (b)). La zone I n'est pas inhibée, la zone II est inhibée par les deux insecticides chez les femelles (F) mais pas totalement chez les mâles (M). La zone III est inhibée par le malathion mais pas par l'ésérine.

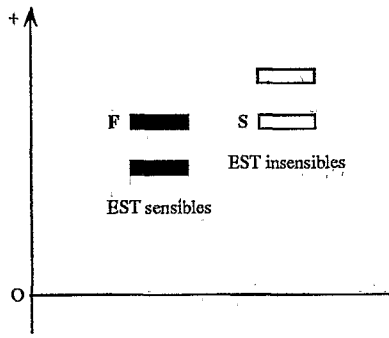


Figure 3. **Hypothèse de deux gènes dialléliques chez les mâles.** L'alléomorphe F des EST sensibles migre au même niveau que l'alléomorphe S des EST insensibles.

comparé deux conditions de migration : pH 6 et pH 8 sur les mêmes extraits. La photo 2 de la Figure 2 montre les zymogrammes obtenus et la Figure 4 résume les différents schémas possibles. Chez les mâles, les échantillons 1 et 4 à pH 6 ne donneront qu'une possibilité à pH 8. Les échantillons 2 et 3 peuvent se traduire de deux façons à pH 8. Quant à l'échantillon 5, il pourra se traduire de trois façons différentes à pH 8.

Plusieurs remarques s'imposent lorsque l'on considère cette figure :

- les zones I et III ne sont pas modifiées ;
- la zone II se trouve étirée à pH 8 faisant ainsi apparaître de 2 à 4 bandes chez le mâle (au minimum une rose et une marron, au maximum deux roses et deux marron), ce qui vérifie l'hypothèse d'un deuxième locus exprimé chez le mâle ;
- les estérases communes aux deux sexes (bandes marron), qui migraient moins loin que les estérases spécifiques des mâles à pH 6, migrent plus loin à pH 8 (cela, bien sûr, n'est visible que chez les mâles).

Pour faciliter le repérage des gènes et des enzymes correspondantes, une nomenclature a été adoptée et les bandes ont été définies d'après leur pourcentage de migration par rapport à l'enzyme la plus rapide. On a

donc chez *A. stephensi* quatre gènes, Est 1, Est 2, Est 3, Est 4, responsables de la synthèse de quatre enzymes, EST A, B, C et D (Fig. 3). Les pourcentages de migration de ces enzymes sont les suivants : 40 % pour EST A ; 79 et 85 % pour EST B ; 87 et 93 % pour EST C ; 100 % pour EST D.

Discussion et conclusion

Il existe un dimorphisme sexuel chez *A. stephensi* : dans les deux sexes, les alléomorphes de migration 87 et 93 % semblent dus à l'expression d'un seul locus diallélique, l'enzyme EST C étant monomérique, tandis que chez les mâles un deuxième gène autosomal, également diallélique, semble s'exprimer. En effet, si les expériences préliminaires nous avaient tout d'abord fait penser à un gène localisé sur le chromosome Y, les expériences d'inhibition et la modification des conditions de migration nous montrent qu'il n'en est rien puisque l'on trouve des mâles hétérozygotes pour ce locus.

Ce dimorphisme sexuel a finalement été trouvé chez trois espèces d'anophèles : *A. stephensi* [13-15], *A. subpictus* [15], *A. funestus* [17]. Chez cette dernière espèce, il a également été montré que le gène responsable de la synthèse de ces enzymes était autosomal et diallélique, l'enzyme étant active sous forme de monomère. De plus, Adak *et al.* [15] et Green [17] ont montré que, chez ces trois espèces, l'EST était localisée dans les glandes accessoires des mâles.

On peut faire un rapprochement entre cette particularité et celle de *Drosophila melanogaster*, chez qui l'EST 6, présente dans le canal d'éjaculation des mâles adultes, joue un rôle important dans la reproduction [18, 19].

Si nous n'avons pas réellement abordé ici le problème de la résistance aux insecticides, nous avons montré que les estérases d'*A. stephensi* se distinguent en trois catégories suivant qu'elles sont ou non inhibées par les carbamates et/ou les organophosphorés. Elles peuvent donc intervenir de façon différente vis-à-vis des phénomènes de résistance. Les estérases C, proches des cholinestérases [20], peuvent, si elles se trouvent altérées, entraîner une résistance aux carbamates et aux organophosphorés, comme le suggère De Deken [21]. D'autres estérases, comme l'ont

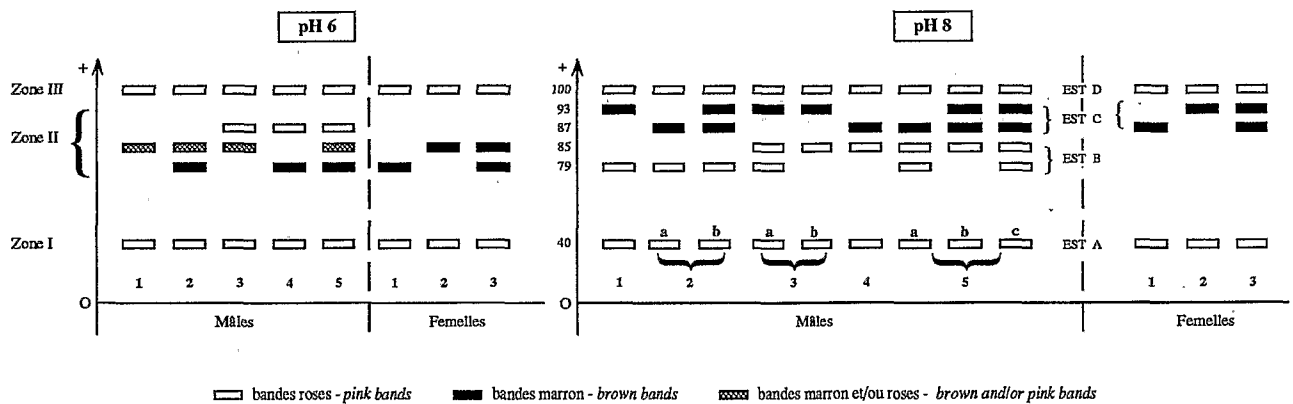


Figure 4. **Zymogrammes suivant le pH de migration et le sexe.** Chez les femelles, le nombre de bandes est invariable quel que soit le pH, mais l'enzyme de la zone II s'est déplacée vers l'anode ; chez les mâles, le pH 8 met en évidence le double hétérozygote (5c).

montré Collins *et al.* [22] sur *A. gambiae*, peuvent être l'expression d'un gène très fortement lié au gène (ou même être l'expression du gène) qui rend la souche porteuse réfractaire à un parasite tel que le *Plasmodium*.

Dans le but de poursuivre un travail de recherche sur la lutte antipaludique, nous envisageons maintenant l'étude d'une souche d'*A. stephensi* réfractaire au *Plasmodium* afin de déterminer le rôle possible des estérases dans la transmission du paludisme. ▼

Remerciements : je remercie Mme N. Pasteur pour les conseils qu'elle m'a donnés et Mme F. Pelletier pour l'aide qu'elle m'a apportée.

RÉFÉRENCES

1. Poirie M., Pasteur N. 1992. La résistance des insectes aux insecticides. *La Recherche* 22: 874-82.
2. Clark A. G., Shamaan N. A. 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathion-S-transferase. *Pest. Biochem. Physiol.* 22 (249): 249-61.
3. Mouches C. L., Pasteur N., Berge J. B., Hyrien O., Raymond M., Robert De Saint-Vincent B., De Silvestri M., Georghiou G. P. 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in California *Culex* mosquito. *Science* 233: 778-80.
4. Pasteur N., Raymond M., Pauplin Y., Nance E., Heyse D., Mouches C. 1990. Role of gene amplification in insecticide resistance. In: Casida J. E., ed. *Pesticides and alternatives*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 439-77.
5. Manouchehri A. V., Zaini A., Djanbakhsh B. 1976. Preliminary note on the resistance of *Anopheles stephensi* to malathion in Bandar Abbas, southern Iran. *Mosq. News* 36: 207-8.
6. Manouchehri A. V., Djanbakhsh B., Rouhani F. 1976. Studies on the resistance of *Anopheles stephensi* to malathion in Bandar Abbas, Iran. *Mosq. News* 36: 320-2.
7. Rathor H. R., Toqir G. 1980. Malathion resistance in *Anopheles stephensi* Liston in Lahore, Pakistan. *Mosq. News* 40: 526-31.
8. Herath P. R. J., Davidson G. 1981. Studies on the nature of malathion resistance in a population of *Anopheles stephensi* from southern Iran. *Mosq. News* 41: 531-4.
9. Hemingway J. 1983. The genetics of malathion resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 106-8.
10. Brewer G. J. 1970. *An Introduction to Isozymes Techniques*. New York, Academic Press, 186 p.
11. Second G., Trouslot P. 1980. Electrophorèse d'enzymes de riz. *Travaux et Documents de l'ORSTOM* 120: 88 p.
12. Scandalios J. G. 1969. Genetics control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genet.* 3: 37-79.
13. Freyvogel T. A., Hunter R. L., Smith E. M. 1968. Nonspecific estérases in mosquitoes. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 765-90.
14. Berl D. 1981. Etude des estérases de deux souches d'*Anopheles stephensi* Liston, une sensible aux organochlorés et l'autre résistante, *Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. Parasitol.* XIX (1): 23-32.
15. Adak T., Subbarao S. K., Sharma V. P. 1983. Male specific estérases in certain anopheline mosquitoes. *Mosq. News* 43: 14-6.
16. Lefranc-Riandey M.-F. 1984. Variabilité allélique du système alcool déshydrogénase (ADH) chez le mil (*Pennisetum americanum*): mise en évidence de classes d'électromorphes par différentes conditions de migrations. *C. R. Acad. Sci. Paris* 299, sér. III (8): 321-6.
17. Green C. A. 1977. A sex-limited esterase in the accessory glands of males of *Anopheles funestus*. *Mosq. News* 7: 46-8.
18. Cooke P. H., Richmond R. C., Oakeshott J. G. 1987. High resolution electrophoretic variation at the esterase-6 locus in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 59: 259-64.
19. Oakeshott J. G., Collet C., Phillis R. W., Nielsen K. M., Russell R. J., Chambers G. K., Ross V., Richmond R. C. 1987. Molecular cloning and characterization of esterase-6, a serine hydrolase of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3359-63.
20. Augustinsson K. B. 1961. Multiple forms of esterases in vertebrate blood plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94: 884-60.
21. De Deken R. 1991. Insecticide resistance: can it be avoided? *Ann. Soc. Belg. Med. trop.* 71 (suppl. 1): 19-25.
22. Collins F. H., Paskewitz S. M., Crews-Oyen A. E. 1991. A genetic study of *Plasmodium* susceptibility in the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 71 (suppl. 1): 225-31.