

## **Variabilités des génomes des individus et évolution : l'acquisition de résistances aux insecticides chez les moustiques**

L'homme a développé au cours du XX<sup>i</sup><sup>ème</sup> siècle des opérations de démoustication fondées sur une lutte chimique. Ainsi, par exemple, la zone littorale du Languedoc, gîte favori du moustique *Culex pipiens*, a été abondamment traitée par des insecticides organophosphorés à partir de 1968.

Ce type d'insecticide tue les larves de moustiques en altérant le fonctionnement de l'acétylcholinestérase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine dans les synapses cholinergiques. Cette inhibition prolonge la transmission synaptique ce qui conduit rapidement à la mort du moustique.

À partir de 1972, les moustiques languedociens sont devenus résistants à ces insecticides.

Les documents proposés concernent les bases biochimiques et génétiques de la résistance des moustiques et d'autres insectes aux insecticides organophosphorés (OP).

### **Sujet**

#### **1. Analyse et interprétation des documents**

Vous analyserez dans l'ordre les résultats expérimentaux présentés par les documents regroupés en quatre thèmes pour dégager l'apport de chacun d'entre eux à la connaissance des mécanismes de résistance aux insecticides chez les moustiques.

#### **2. Synthèse**

En vous appuyant sur les résultats des quatre parties du sujet, vous présenterez de manière synthétique les mécanismes de la résistance aux insecticides chez les moustiques. Vous utiliserez vos connaissances sur l'origine du polymorphisme génétique au sein d'une espèce pour préciser les mécanismes à l'origine de ces résistances et leur relation avec l'évolution de l'espèce.

Remarques :

- Les documents présentés sont proches de travaux de recherche, ils comprennent donc de nombreuses précisions dont vous devrez savoir extraire les informations qui concernent le sujet.
- Il sera tenu grand compte de la clarté de l'expression et, plus généralement, de la présentation du travail.

## Thème A : Identification des mécanismes de résistance aux insecticides

**A1** / Plusieurs souches de moustiques (nommées BLEUET, S 54 et MSE) ont été isolées.

On réalise des tests biologiques sur des larves de ces souches : ces tests consistent à estimer la mortalité de larves placées dans des milieux renfermant différents insecticides. On immerge ainsi des lots de 10 larves (les larves de moustique sont aquatiques) dans des solutions d'insecticides de différentes concentrations et on estime la mortalité au bout d'un temps déterminé (16 heures).

On peut alors par exemple définir la concentration létale 50 notée  $LC_{50}$  qui correspond à la concentration en insecticide déterminant une mortalité de 50 % dans la durée considérée.

### Document 1

Valeurs de  $LC_{50}$  (en chlorpyrifos) observée dans les trois souches diversement résistantes étudiées en fonction de la concentration en un insecticide organophosphoré (le chlorpyrifos) et en absence puis en présence de DEF. On donne les valeurs moyennes et les intervalles de variations.

Le DEF est un inhibiteur de certaines enzymes cellulaires, appelées estérases, que l'on sait capables de dégrader les insecticides organophosphorés. Il n'intervient pas sur l'activité de l'acétylcholinestérase.

	BLEUET	S 54	MSE
$LC_{50}$ (en $\mu\text{g}$ par litre) En absence de DEF	1,80 (1,72 – 1,81)	5,70 (5,37 – 5,95)	169 (161 – 178)
$LC_{50}$ (en $\mu\text{g}$ par litre) En présence de DEF	0,44 (0,41 – 0,47)	0,38 (0,35 – 0,40)	165 (119 – 229)

### Document 2

Concentrations en insecticide (chlorpyrifos) nécessaires pour obtenir une inhibition de 50 % ( $I_{50}$ ) de l'acétylcholinestérase recueillie dans chacune des trois souches.

	BLEUET	S 54	MSE
Chlorpyrifos ( $10^{-8}\text{M}$ )	0,59	0,41	48,4

**A2** / On étudie *in vitro* l'acétylcholinestérase extraite de têtes de mouches. On travaille sur trois souches, deux souches (notées Cooper et 608) sensibles aux insecticides organophosphorés et une souche résistante (notée arD). L'enzyme est récupérée après traitement de plusieurs centaines de têtes de mouches. On utilise comme substrat l'acétylthiocholine.

L'affinité d'une enzyme pour son substrat peut être estimée par l'inverse de la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat ( $K_m$ ). Plus  $K_m$  est grand, plus l'affinité est faible.

La vitesse maximale de la réaction catalysée par l'enzyme à saturation en substrat ( $V_{max}$ ) traduit l'activité de l'enzyme. Plus  $V_{max}$  est grand, plus l'activité est grande.

### Document 3

$K_m$  et  $V_{max}$  de l'acétylcholinestérase extraite des souches sensibles et de la souche résistante.

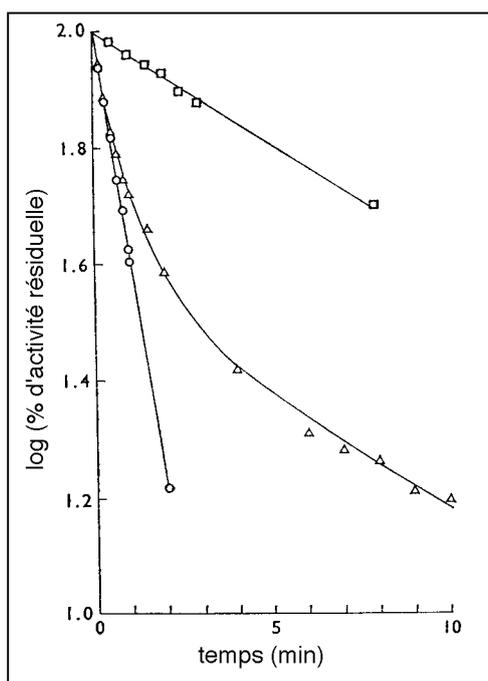
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}$ d'acétylthiocholine hydrolysée par h par tête de mouche)
Souche sensible Cooper	$0,121 \pm 0,004$	$2,29 \pm 0,07$
Souche sensible 608	$0,115 \pm 0,004$	$3,39 \pm 0,09$
Souche résistante arD	$0,154 \pm 0,009$	$1,36 \pm 0,05$

### Document 4

Inhibition de l'activité enzymatique par un insecticide, le malaoxon

L'inhibition est estimée par le pourcentage de l'activité résiduelle (par rapport à l'activité initiale à  $t=0$ ) (échelle en log). (0,1 mM de malaoxon)

- cercles vides : acétylcholinestérase extraite de la souche sensible 608.
- carrés vides : acétylcholinestérase extraite de la souche résistante arD.
- triangles vides : mélanges des deux types d'acétylcholinestérase dans les proportions 2:1 d'acétylcholinestérase respectivement des souches 608 et arD.



d'après DEVONSHIRE A. (1975) Studies of the acetylcholinesterase from houseflies (*Musca domestica* L.) Resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. *Biochem. J.*, **149**, 463-469.

## Thème B : Étude de l'acétylcholinestérase

**B1** / L'acétylcholinestérase extraite de l'organe électrique du poisson torpille (*Torpedo californica*) est constituée de deux sous-unités identiques liées de manière covalente à la membrane plasmique.

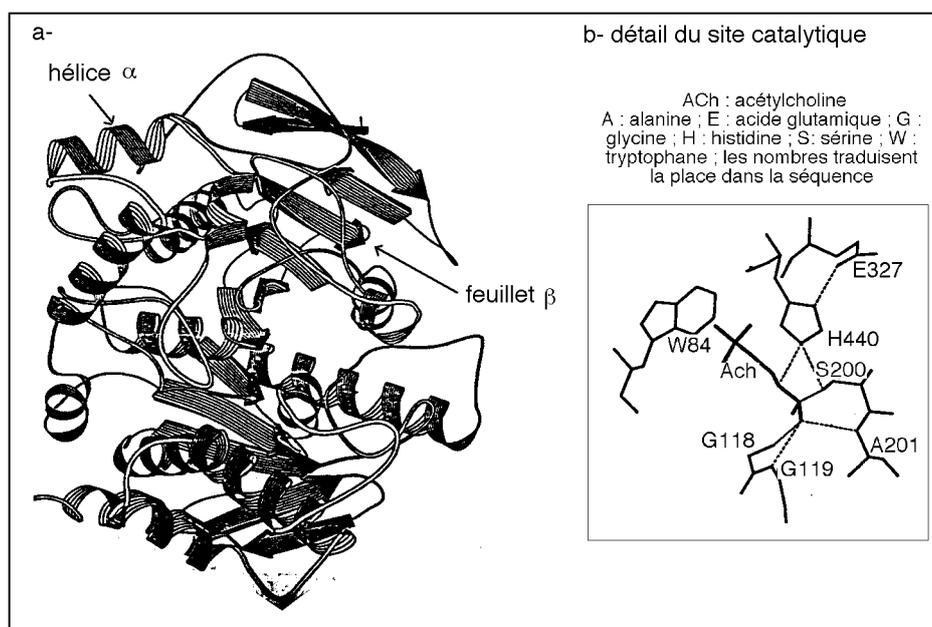
L'obtention de l'enzyme cristallisée a permis son étude aux rayons X et la détermination de sa structure.

Le document 5a représente la schématisation d'un monomère : chez *Torpedo californica*, celui-ci comprend 537 acides aminés et montre différents types de structure dont des segments dits en hélice  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$ . La structure du site catalytique est détaillée sur la figure 5b.

### Document 5

a - Schématisation d'une sous-unité de l'acétylcholinestérase chez *Torpedo californica*.

b - Schématisation du site catalytique et indication des acides aminés impliqués dans la catalyse.



d'après SUSSMAN J.L. et al. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* : a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **253**, 872- 879.

## Document 6

On mesure par une méthode conventionnelle, non décrite ici, l'activité d'acétylcholinestérase qui diffère de la souche sauvage par un ou deux acides aminés (activité donnée en % de l'activité du type sauvage en présence de 0,5 nM d'acétylthiocholine).

Les mutants sont notés par les lettres désignant conventionnellement les acides aminés : S : sérine, V : valine, C : cystéine, H : histidine, Q : glutamine, E : acide glutamique, D : acide aspartique.

Par exemple : S200V : signifie remplacement de la sérine en position 200 par de la valine.

Mutant	Activité catalytique (en % de l'activité du type sauvage)
Type sauvage	100
S200V	< 0,1
S200C	1,2 ± 0,6
H425Q	59 ± 6
H440Q	< 0,1
H425Q, H440Q	< 0,1
E199Q	50 ± 15
E199D	23 ± 9
E199H	< 0,1

d'après GIBNEY G. et al. (1990) *Mutagenesis ... Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7546-7550.

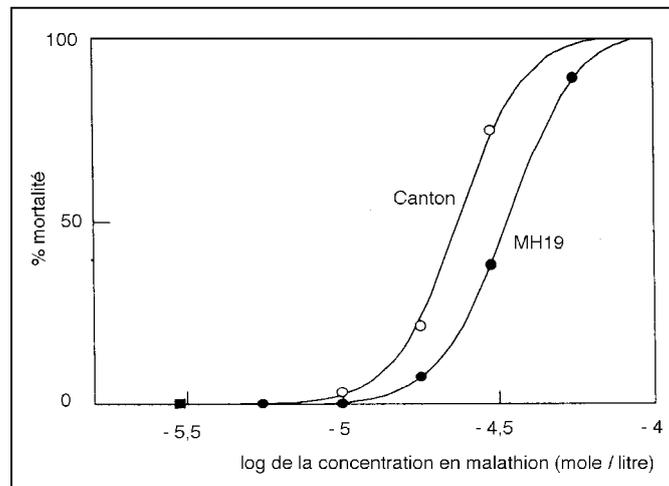
**B2 /** Une lignée de drosophile (MH19) est apparue lors d'expériences de sélection dans lesquelles des populations sauvages de drosophiles étaient mises au contact de concentrations croissantes en un insecticide, le malathion. Certains caractères de cette lignée sont comparés avec ceux d'une lignée sauvage (appelée Canton).

*Document 7*

Mortalité des différentes populations de drosophiles en fonction de la concentration en malathion.

Dix individus sont placés dans une boîte de Pétri renfermant un papier imprégné de 1 mL d'insecticide. La mortalité est enregistrée 16 heures plus tard. Dix essais ont été effectués pour différentes concentrations d'insecticides.

Les courbes MH19 et Canton correspondent aux résultats obtenus pour chacune de ces deux souches.



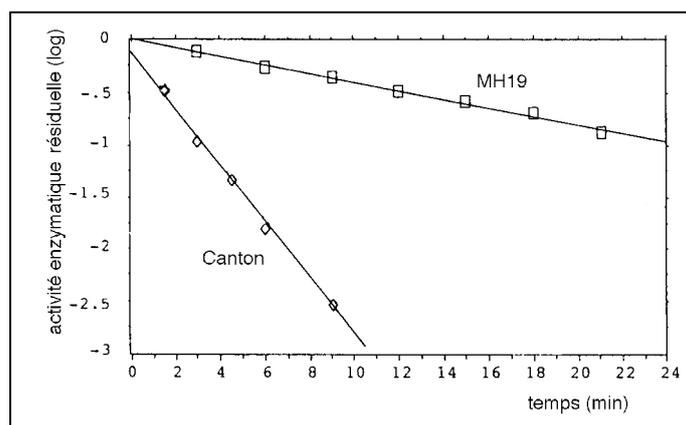
*Document 8*

Activité de l'acétylcholinestérase en présence d'un insecticide.

Les essais sont réalisés avec  $5 \cdot 10^{-9}$  M d'un insecticide, le dichlorvos (inhibiteur de l'acétylcholinestérase) à 25 °C. On mesure l'activité de l'enzyme par rapport à l'activité initiale ou activité enzymatique résiduelle (rapport  $V_i / V_0$  avec  $V_i$  : vitesse à l'instant t en présence d'inhibiteur et  $V_0$  vitesse initiale sans inhibiteur) au cours de la mise en contact avec l'inhibiteur.

NB : Le complexe enzyme-inhibiteur, un fois formé, ne se dissocie pas, l'enzyme est inactivée.

Les courbes MH19 et Canton correspondent aux résultats obtenus pour chacune de ces deux souches.



**B3 /** Chez la Drosophile, la synthèse de l'acétylcholinestérase est gouvernée par un gène noté Ace. Une région de ce gène a été clonée et séquencée. Le document 9 présente une partie de la séquence des brins complémentaires des brins transcrits (brins de séquences identiques à celle des ARNm) des gènes des acétylcholinestérases des souches MH19 et Canton ainsi que les fragments correspondants des séquences polypeptidiques des acétylcholinestérases:

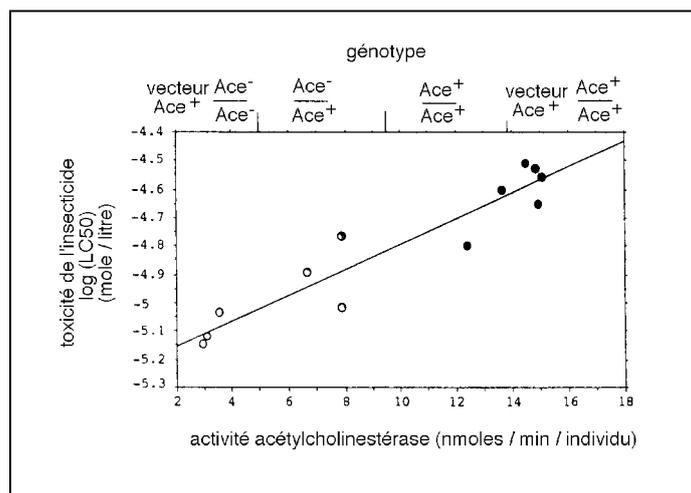
*Document 9*

Souche MH19 :	CTC AGC TAT CCC TCG
Souche Canton :	CTC AGC TTT CCC TCG
Souche MH19 :	LEU – SER – TYR – PRO – SER
Souche Canton :	LEU – SER – PHE – PRO – SER

**B4/** On étudie chez des drosophiles, de génotypes différents, l'activité de l'acétylcholinestérase (en moles par minute et par individu) et la sensibilité au malathion. Ace<sup>+</sup> est ici l'allèle fonctionnel permettant la synthèse d'une acétylcholinestérase de type Canton, Ace<sup>-</sup> est un allèle muté non fonctionnel. Dans les souches homozygotes, peut être ajouté par transgénèse un fragment d'ADN contenant un allèle Ace<sup>+</sup> fonctionnel, de type Canton (noté vecteur Ace<sup>+</sup>).

*Document 10*

Relations entre activité acétylcholinestérase, sensibilité au malathion et génotype de l'organisme



d'après FOURNIER D. et al. (1992) Acetylcholinesterase... . *J. Biol. Chem.*, **267**, 14270-14274

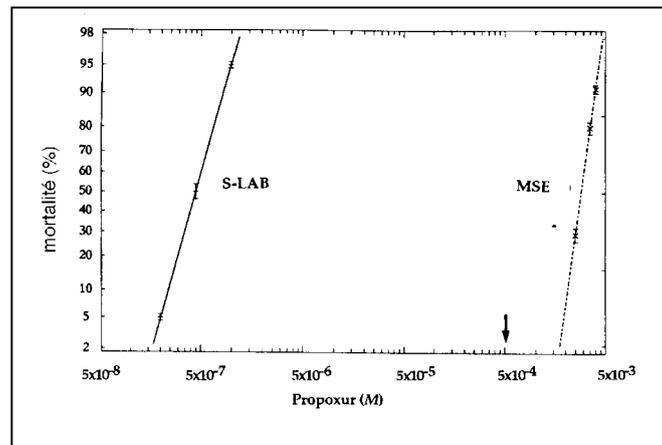
**B5** / Chez certaines lignées de moustiques, deux acétylcholinestérases, AChE1 et AChE2 ont été identifiées dans le même organisme.

On s'intéresse à deux lignées de moustiques notées S-LAB et MSE. On réalise tout d'abord un test de mortalité de larves placées dans des milieux contenant différentes concentrations de proxopur.

### Document 11

Mortalité dans les deux souches S-LAB et MSE en fonction de la concentration en proxopur.

La flèche indique la concentration en proxopur utilisée dans les documents 12 et 13.



On étudie ensuite l'activité des enzymes AChE1 et AChE2 dans chacune des souches. Cette activité est identifiée par électrophorèse (document 12) en absence ou en présence d'un insecticide inhibiteur (protopur à  $5 \cdot 10^{-4}$  M).

L'électrophorèse permet de séparer dans un gel soumis à un champ électrique les protéines selon leur charge et leur masse moléculaire (unité: le kiloDalton ou kD).

La localisation de l'enzyme sur le gel est révélée par son activité enzymatique: le gel d'électrophorèse est traité par un substrat voisin de l'acétylcholine, le thiocholine ester (AcSCh): l'hydrolyse de celui-ci libère la thiocholine, que l'on fait précipiter en présence de cuivre. La mise en contact avec du sulfite d'ammonium jaune fait apparaître du  $\text{CuS}$ , donnant des bandes de couleur brune.

### Document 12

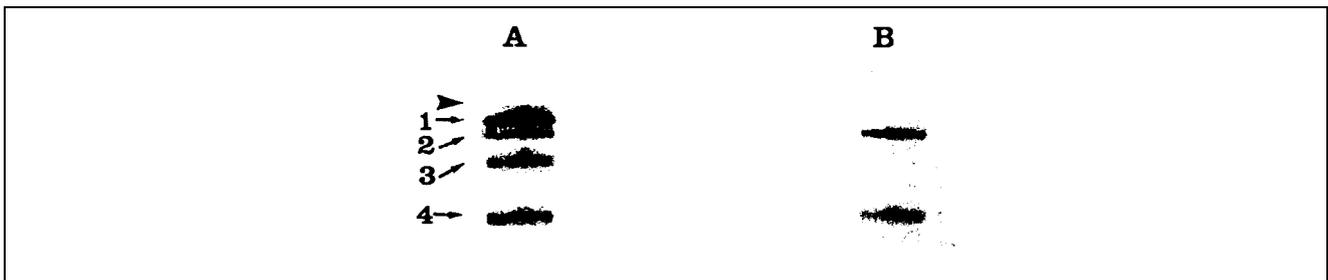
Electrophorèse des extraits d'acétylcholinestérase à partir de la souche S-LAB et coloration des bandes selon la technique exposée plus haut.

On observe deux bandes pour chaque type d'acétylcholinestérase, correspondant à deux formes possibles de chaque enzyme, formes que l'on n'étudiera pas ici (formes interconvertibles et différant par leur comportement en milieu aqueux)

Les bandes 1 et 3 sont interprétées comme les deux formes de l'enzyme AChE1, les bandes 2 et 4 étant de même interprétées comme les deux formes de l'enzyme AChE2.

En A, le gel est traité par  $10^{-3}$  M de substrat de type AcSCh en l'absence d'insecticide.

En B, le gel est traité par  $10^{-3}$  M de substrat de type AcSCh en présence d'un insecticide, le propoxur ( $5 \cdot 10^{-4}$  M).



On réitère le protocole expérimental à partir la souche MSE, l'électrophorèse révèle alors la présence de 4 bandes avec ou sans insecticide.

## Thème C : Étude des estérases

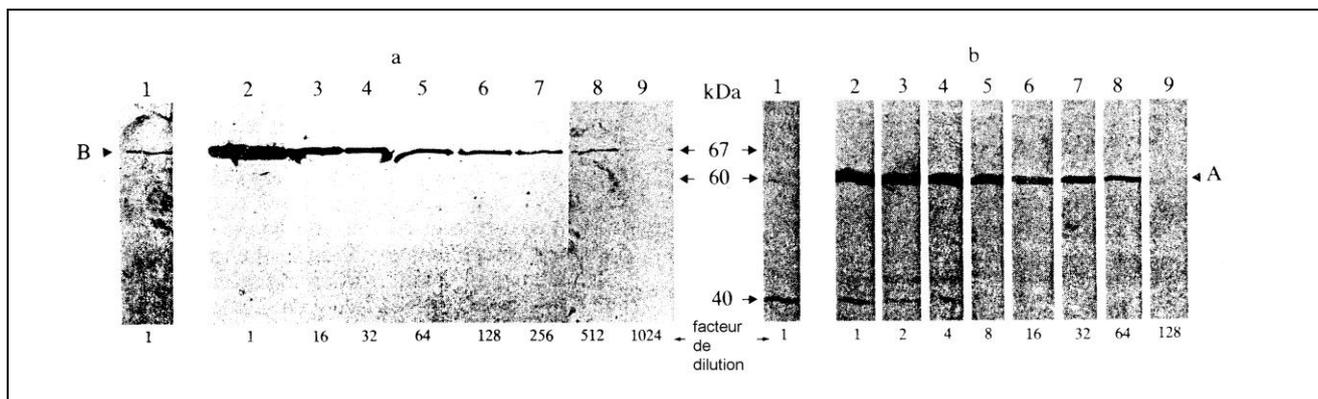
On étudie la production d'estérases dans différentes souches de moustiques, sensibles ou résistantes aux insecticides organophosphorés. Différentes estérases ont été identifiées, deux d'entre elles, A et B, seront envisagées ici. (On rappelle que les estérases dégradent les insecticides organophosphorés).

**C1** / Les estérases A et B ont été purifiées à partir de différentes souches de moustiques, puis injectées à des lapins, ce qui déclenche la production d'anticorps anti-estérase. Ceux-ci peuvent être utilisés pour détecter et quantifier la présence des estérases dans les souches considérées.

Les protéines des moustiques sont récupérées après broyage des insectes, soumises à une électrophorèse et ensuite transférées sur un filtre de nitrocellulose. Les positions des estérases sur le filtre sont repérées par immunocytochimie en utilisant les anti-corps anti-estérase A et anti-estérase B. La coloration de la bande est d'autant plus forte que la concentration initiale d'estérases était élevée.

Le document 13 présente les résultats obtenus pour les estérases A et B (les masses moléculaires en kDa sont indiquées au milieu).

### Document 13



a – Estérase B : la position de la protéine B est indiquée par une flèche à gauche du document.

La piste 1 correspond à la souche S-LAB (déjà considérée dans la question B). 200 microgrammes de protéines solubles ont été soumis à électrophorèse et transférés sans dilution sur le filtre de nitrocellulose.

Les pistes 2 à 9 correspondent à la souche Tem-R, souche reconnue comme résistante aux insecticides

- piste 2 : 200 microgrammes de protéines solubles ont été soumis à électrophorèse et transférés sans dilution sur le filtre de nitrocellulose.

- pistes 3 à 9 : le transfert est précédé de dilutions, selon les valeurs indiquées sous les pistes (facteur de dilution 16, 32, ...).

b – Estérase A : la position de la protéine A est indiquée par une flèche à droite du document.

La piste 1 correspond à la souche BLEUET (déjà étudiée dans la partie A du sujet). 200 microgrammes de protéines solubles ont été soumis à électrophorèse et transférés sans dilution sur le filtre de nitrocellulose.

Les pistes 2 à 9 correspondent à la souche S 54 (cf. partie A).

- piste 2 : 200 microgrammes de protéines solubles ont été soumis à électrophorèse et transférés sans dilution sur le filtre de nitrocellulose.

- pistes 3 à 9 : le transfert est précédé de dilutions, selon les valeurs indiquées sous les pistes (facteur de dilution : 2, 4, ...).

d'après MOUCHÈS CL. et al. (1987), *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, **84**, 2113-2216

NB : Les résultats obtenus sont à considérer à la fois sous l'aspect qualitatif et sous l'aspect quantitatif.

**C2** / On travaille sur différentes souches de moustiques, certaines ayant déjà été rencontrées dans les questions précédentes.

Certaines souches sont sensibles aux insecticides organophosphorés, d'autres sont résistantes (dont Simpson, Tem – R et Selax)

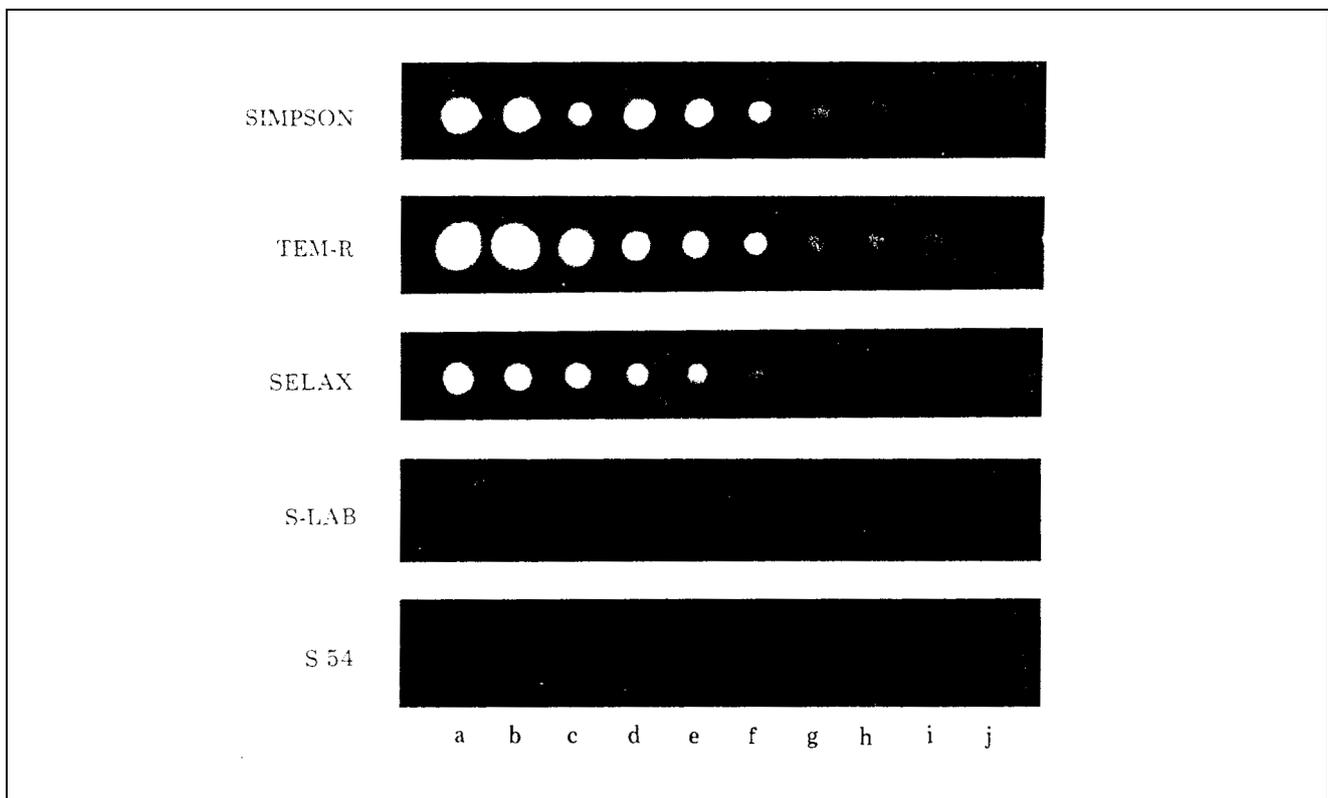
L'ADN de moustiques se rattachant à ces différentes souches est isolé, puis transféré sur une membrane de nylon. On réalise une hybridation : on sépare les 2 brins de l'ADN isolé et l'on ajoute une sonde radioactive. Celle-ci est un ADN monobrin correspondant à une partie du gène de l'estérase B. Cet ADN radioactif est susceptible de s'apparier avec un brin complémentaire dans l'ADN isolé du moustique.

On peut estimer la quantité d'ADN hybridée en considérant les autoradiographies obtenues avec une solution initiale de 10 microgrammes d'ADN, puis avec des solutions obtenues par dilution de la solution initiale (de 1/2 à 1/512).

Les résultats sont présentés sur le document 14.

#### Document 14

Autoradiographies de solutions d'ADN de dilutions croissantes, placées sur une membrane et hybridées avec la sonde ADN radioactif.



Dilutions successives: a = 1 ; b = 1/2 ; c = 1/4 ; e = 1/16 ; f = 1/32 ; g = 1/64 ; h = 1/128 ; i = 1/256 ; j = 1/512

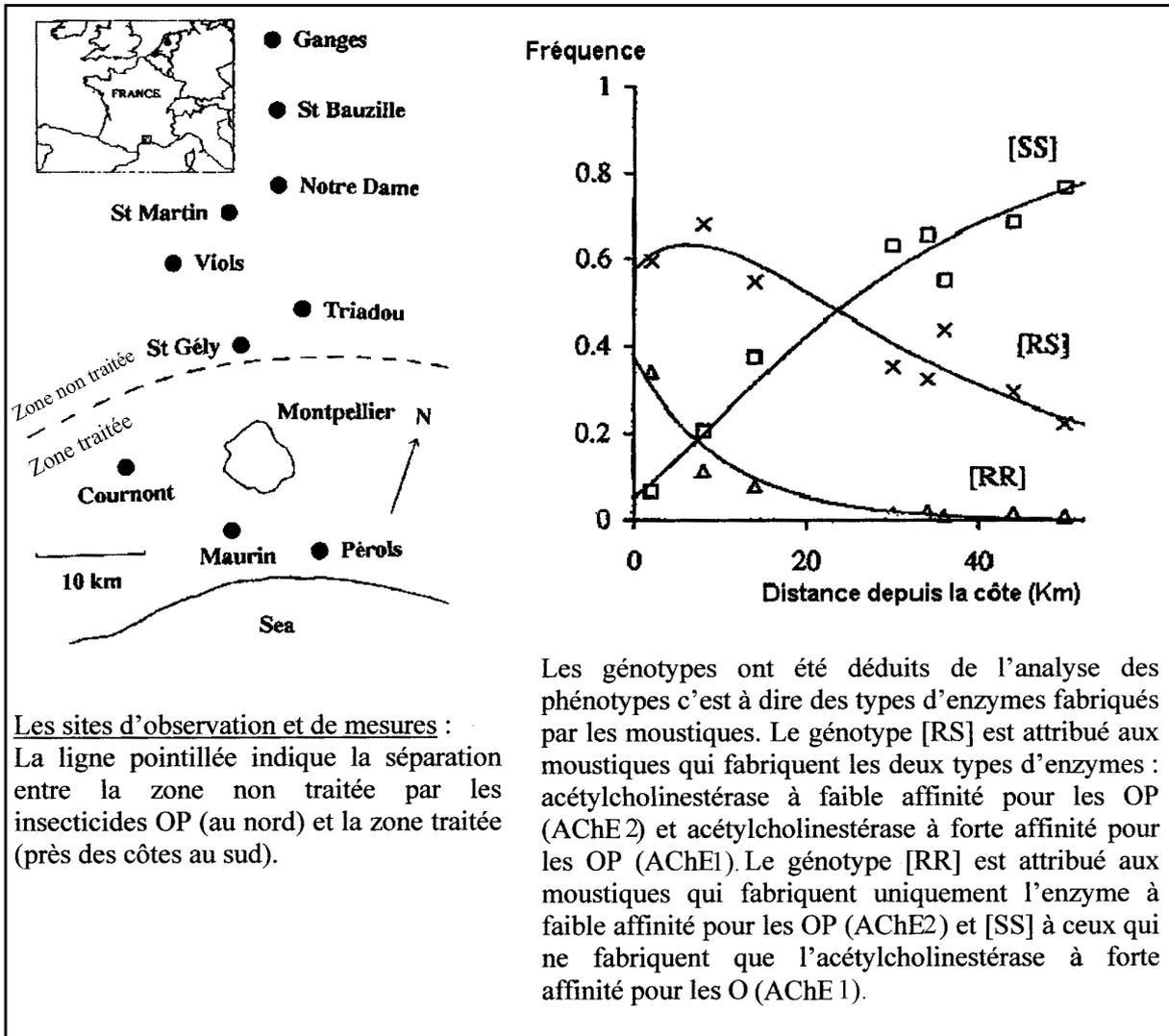
NB : on obtiendrait en fait une très discrète tache, que la photocopie n'a pas permis de laisser, pour la colonne a de S-LAB et S 54, tache qui disparaîtrait à partir de la colonne b.

D'après RAYMOND M. et al. (1989) *Biochemical Genetics*, 27, 417-423

### Thème D : Relation entre le polymorphisme génétique et des pressions de sélection

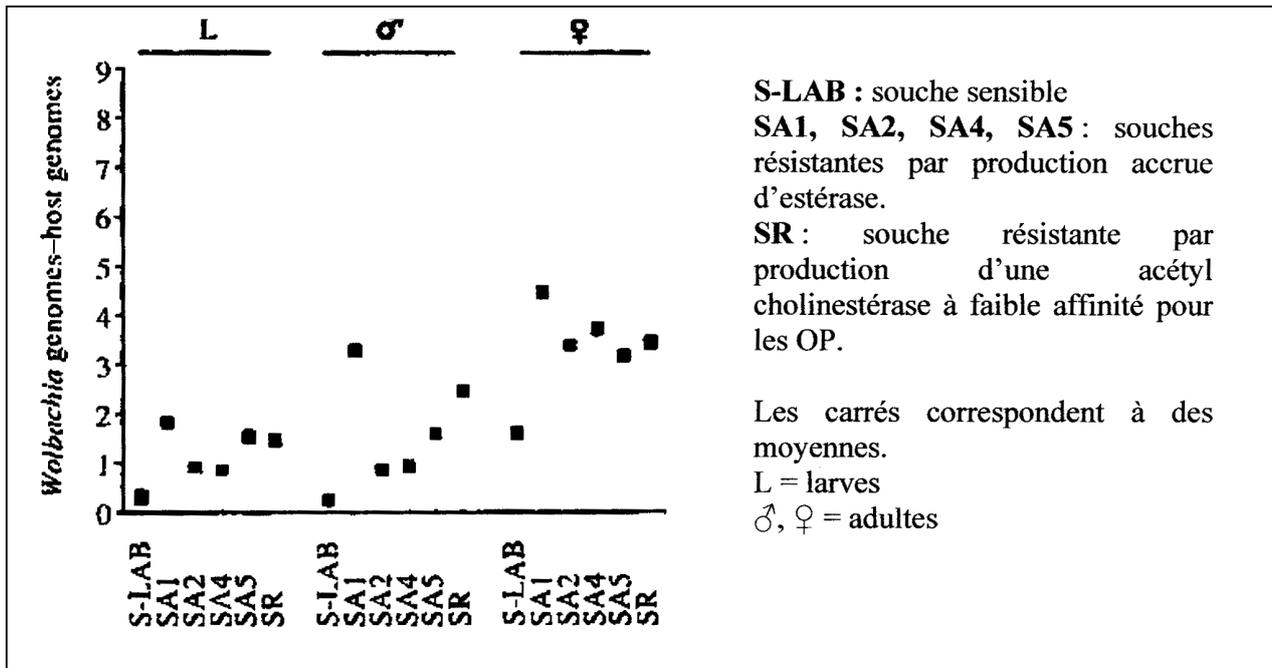
D1/ Fréquence des différents génotypes de moustiques recueillis dans la région de Montpellier en fonction de la distance au bord de mer.

Document 15



**D2/** Les *Wolbachia* sont des bactéries endocellulaires (c'est-à-dire vivant à l'intérieur des cellules) très répandues chez les insectes. Elles sont transmises maternellement par l'intermédiaire des œufs et par la suite, elles perturbent la reproduction de leur hôte devenu adulte. On mesure la densité de bactéries *Wolbachia* (nombre de bactéries/ nombre de moustiques hôtes) chez différentes souches de moustiques sensibles aux insecticides organophosphorés OP.

Document 16



D'après Claire Berticat, François Rousset, Michel Raymond, Aranud Berthomieux et Mylène Weil. High Wolbachia density in insecticide-resistant mosquitoes. Royal Society. June 2002