

MOREVOL:

« Evolution et gestion de la résistance des moustiques aux insecticides »

Mylène Weill (Coordinatrice) Directrice de Recherche à l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (ISEM), UMR CNRS 5554, Université Montpellier 2, C.C.065, 34095 Montpellier.
mylene.weill@univ-montp2.fr

Pierrick Labbé, ISEM, Montpellier. pierrick.labbe@univ-montp2.fr

Haoues Alout, ISEM, Montpellier. haoues.alout@univ-montp2.fr

Thomas Lenormand, CEFÉ, Montpellier. thomas.lenormand@cefe.cnrs.fr

Arnaud Berthomieu, ISEM, Montpellier. arnaud.berthomieu@univ-montp2.fr

Luc Djogbénou, CREC/IRD, Cotonou, Bénin. luc.Djogbenou@ird.fr

Nicole Pasteur, ISEM, Montpellier. nicole.pasteur@univ-montp2.fr

Chuan-Ling Qiao, Institute of Zoology, Beijing, China. qiaocl@ioz.ac.cn

Pascale Marchot, ToxCiM-CRN2M. Marseille. pascale.marchot@univmed.fr

Yves Bourne, AFMB, Marseille. Yves.Bourne@afmb.univ-mrs.fr

Introduction

Les maladies transmises par les moustiques (malaria, fièvres hémorragiques, encéphalites, filarioses) représentent la plus importante cause de mortalité et de morbidité, particulièrement dans les régions tropicales. La prévention de ces maladies repose essentiellement sur le contrôle des populations d'insectes vecteurs. La lutte anti-vectorielle peut être physique (assainissement), biologique (utilisation de pathogènes ou de prédateurs), génétique (introduction de mâles stériles) et/ou chimique (insecticides de synthèse ou d'origine biologique comme les toxines bactériennes). Même si la lutte avec des insecticides de synthèse n'est pas à privilégier, elle reste dans bien des cas la seule approche possible.

La majorité des insecticides de synthèse sont des composés qui inactivent une cible vitale du système nerveux, entraînant ainsi la mort de l'insecte. Malheureusement, les populations d'insectes traitées évoluent très vite vers la résistance. Pour lutter contre la résistance, l'utilisation de molécules insecticides dirigées contre une autre cible peut s'avérer efficace durant un temps plus ou moins court selon la fréquence d'apparition de nouvelles mutations adaptatives. Cependant, il reste très peu d'insecticides pour lesquels des résistances n'ont pas été sélectionnées. Peu de compagnies pharmaceutiques ont investi dans cette recherche ces 30 dernières années et rares sont les nouvelles molécules mises sur le marché. Par ailleurs, les réglementations européennes qui sont entrées en application (Directive « Biocide » 98/8/CE), réduisent fortement la panoplie des molécules disponibles.

En général, les moustiques résistants présentent, en l'absence d'insecticide, une valeur adaptative réduite (ou coût) par rapport aux individus sensibles^{1,2}. Ce coût reflète les effets délétères associés à la mutation qui influencent de nombreux traits d'histoire de vie de l'insecte. Le moyen le plus simple de diminuer la proportion d'insectes résistants est donc d'arrêter les traitements (éventuellement en utilisant un insecticide dirigé contre une autre cible). Les moustiques sensibles gagnent alors la compétition avec les résistants et augmentent en fréquence. Cette stratégie n'est pas toujours applicable et dépend de l'importance du coût du mécanisme de résistance sélectionné. Cependant, le coût évolue, en entraînant, par exemple, la disparition d'allèles résistants trop coûteux remplacés par d'autres allèles moins coûteux³, ou la sélection de gènes modificateurs (ou "modifiers")^{4,5} qui diminuent ou suppriment le coût. Dans ce cas, diminuer ou supprimer les traitements insecticides n'a plus d'incidence sur la fréquence des individus résistants et la lutte par alternance d'insecticides (dans le temps ou dans l'espace) devient inefficace.

Après l'utilisation massive du DDT (organochloré), une résistance a très vite été sélectionnée dans les années 1960. Deux autres familles d'insecticides ont alors été utilisées : les organophosphorés (OP) et les carbamates (CX). Ces molécules inhibent l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine dans les synapses cholinergiques. Cette inhibition prolonge l'influx nerveux, ce qui conduit rapidement à la mort de l'insecte par tétanie. Chez le moustique *Culex pipiens*, deux principaux mécanismes de résistance à ces insecticides ont été mis en évidence:

- Le premier correspond à une détoxification accrue des OP par des carboxylestérases qui les piègent ou les dégradent. Dans les cas de résistance, ces estérases sont surproduites grâce à un processus d'amplification ou de surexpression des gènes qui les codent.
- Le deuxième mécanisme correspond à une modification de la cible, l'AChE, qui réduit son affinité pour les insecticides et conduit à son insensibilité.

Le gène codant pour l'AChE impliquée dans la résistance chez les moustiques n'a été identifié que récemment. En effet, l'homologue du gène d'AChE de drosophile initialement trouvé chez *C. pipiens* s'est avéré indépendant de la résistance⁵. La séquence complète du génome d'*Anophèles gambiae* nous a permis de montrer qu'il existe deux gènes chez le moustique, *ace-1* et *ace-2*, codant pour deux AChEs distinctes. Le nouveau gène identifié, *ace-1*, code pour l'AChE1 synaptique, cible des insecticides organophosphorés et carbamates chez les moustiques et a été perdu chez la drosophile⁶ qui n'a plus que le gène *ace-2*.

Chez *C. pipiens*, une seule substitution d'une glycine en sérine à la en position 119 (numérotation basée sur celle de l'AChE de *Torpedo californica*) a été trouvée responsable de la résistance dans la plupart des souches testées quelle que soit leur origine géographique. Ce résultat a été confirmé *in vitro* en comparant les propriétés biochimiques des protéines recombinantes sauvages et mutées G119S avec celles des enzymes extraites des individus sensibles et résistants. Cette même mutation a également été identifiée chez *A. gambiae* et *A. albimanus*, vecteurs de la malaria en Afrique de l'ouest et en Amérique, respectivement^{7,8}. Des études *in natura* ont montré qu'un fort coût est associé à la résistance par AChE1 insensible chez *C. pipiens*^{1,9,10}. Des expériences en insectarium sur des souches homogènes pour leur fond génétique et ne différant qu'au locus de résistance ont montré que ce coût affecte de nombreux traits d'histoire de vie (mortalité larvaire, fécondité, survie adulte, infection...).

Objectifs du programme

L'objectif de ce programme était d'étudier l'évolution de la résistance aux insecticides pour comprendre les facteurs adaptatifs qui l'influencent et dégager les stratégies de lutte les plus adaptées. Notre programme était centré sur l'étude du moustique *C. pipiens*, mais nous l'avons étendu à d'autres espèces de moustiques, en particulier aux vecteurs de maladies endémiques tels que les *Anopheles*. Nous avons privilégié l'étude des mécanismes de résistance liés à l'insensibilité de l'AChE1 car elle est la cible de nombreux insecticides encore utilisés et qui se sont révélés extrêmement efficaces dans les programmes de lutte avant l'apparition de résistances.

Ce projet était organisé en trois parties complémentaires :

- Etudier le déterminisme génétique de la résistance due à l'AChE chez les diptères
- Identifier les mutations de l'AChE1 responsables de résistance aux insecticides en populations naturelles et mesurer leur effet sur la valeur adaptative pour comprendre les contraintes évolutives responsables de leur sélection.
- Proposer des stratégies de lutte contre la résistance.

Matériels et méthodes

Identification des variants résistants du gène *ace-1* et mise au point du test TDP (TDP = Témoin-Dichlorvos-Propoxur)

L'identification d'un nouveau variant (F290V) chez *C. pipiens* nous a amené à mettre au point un test biochimique basé sur l'inhibition des AChE1 sauvage et mutées (G119S et F290V) par deux insecticides. Le dichlorvos inhibe uniquement l'AChE1 sensible et le propoxur inhibe l'AChE1 sensible et mutée F290V. Ainsi, le test TDP permet de discriminer le phénotype sensible [S], les phénotypes résistants homozygotes G119S ou [R] et F290V ou [V] ainsi que les individus portant différentes combinaisons alléliques : [VS], [VR], [RS], [VRS].

Détection de duplication

Le protocole de détection de duplications du gène *ace-1* (appelées D) est basé sur des croisements de femelles de phénotype hétérozygote ([RS] ou [VS]) avec des mâles de la souche Slab, et sur la sélection de chaque descendance avec une dose de propoxur tuant tous les génotypes sensibles. S'il n'y a aucune mortalité dans la descendance alors la femelle possède une duplication du gène *ace-1* qui associe une copie sensible et une copie résistante. L'ADN de ces femelles est alors amplifié dans la région où est localisée la mutation. Le produit PCR est cloné, et au moins trois clones de chaque copie S et R (identifiées par un test PCR-RFLP⁷) sont séquencés.

Expression de l'AChE1 de *C. pipiens*

Un vecteur d'expression contenant l'ADNc de l'AChE1 G119S de *C. pipiens* a été construit pour l'expression de protéine recombinante dans des cellules S₂ en conditions d'adhérence. L'extrémité N-terminale contenant le peptide de sécrétion ainsi qu'une région riche en sérine suspectée de gêner la cristallisation de l'enzyme a été remplacée par le peptide de sécrétion d'une protéine ubiquitaire de drosophile (protéine Bip). A l'extrémité C-terminale, le peptide responsable de l'ancrage membranaire a été éliminé afin que l'enzyme soit directement sécrétée dans le milieu de culture. Pour faciliter la détection et la purification, l'extrémité C-terminale de l'enzyme a été fusionnée avec un tag poly-histidine

précédé par un site de clivage à la protéase (TEV). Les premiers tests de promoteur inductible ayant été peu concluants, cette construction a été placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (celui du gène codant l'actineA de drosophile). Suite à de très faibles taux d'expression et rendements de purification, la quantité d'enzyme s'est révélée très insuffisante pour permettre l'obtention de cristaux. Pour améliorer le rendement de production, nous avons essayé de produire l'AChE1 G119S dans différents types cellulaires (humain, moustique et papillon), en vain. Une construction contenant l'ADNc complet de l'AChE1 de *C. pipiens* a alors été exprimée afin de vérifier que les parties N- et C-terminale (éliminées dans la première construction) n'avait pas d'influence sur la production. Là encore, la production n'a pas été améliorée. Enfin, le peptide signal de sécrétion de l'AChE2 de drosophile a été testé ainsi que la position du tag histidine sans apporter d'amélioration. En conséquence la production de l'AChE1 G119S a du être abandonnée.

Nous avons alors décidé de produire la forme sensible de l'AChE1 en cellules S_2 dans la première construction décrite. Le niveau de production (estimé par l'activité enzymatique) a été 20 fois supérieur à celui de l'AChE1 G119S et deux fois plus important que celui de l'AChE2 de drosophile. D'après des données obtenues sur l'AChE de torpille, la substitution d'une alanine à une cystéine libre (non impliquée dans un pont disulfure) (C231A) permet d'augmenter significativement la production, vraisemblablement du fait d'une amélioration de la stabilité (P. Marchot, com. pers.). Dans l'AChE1 de *C. pipiens*, la mutation C286A (position homologue) a été introduite mais n'a pas eu d'effet notable sur les taux de production. Enfin, des conditions de culture de cellules S_2 en suspension ont été mises au point. Ces nouvelles conditions, qui associent des taux d'expression satisfaisants à la possibilité d'augmenter les volumes de culture (3 litres), nous ont permis d'exprimer d'avantage de protéine recombinante.

Résultats

I/ Déterminisme génétique de la résistance AChE chez les Diptères.

Le déterminisme génétique de la résistance due à l'AChE dessine un patron très original dans l'ordre des Diptères. La famille des *Culicidae* possède deux gènes : *ace-1* qui code pour la principale AChE1 synaptique, cible des insecticides et *ace-2* dont la fonction est inconnue. Chez certains Diptères, comme par exemple la drosophile et la mouche domestique, le gène *ace-1* a été perdu et sa fonction physiologique, bien que vitale, remplacée par *ace-2* au cours de l'évolution⁶. Nous avons recherché systématiquement les gènes *ace-1* et *ace-2* chez 78 espèces de Diptères représentant 50 familles (27% des familles de Diptères). Cette analyse a montré que la perte du gène *ace-1* affecte probablement tout le large groupe monophylétique des Cyclorrhaphes au sein des Diptères¹⁷. Par contre, chez tous les insectes étudiés à ce jour qui possèdent deux gènes *ace*, comme par exemple les moustiques, c'est le gène *ace-1* qui code l'AChE1 synaptique cible des insecticides. De plus, la comparaison des séquences partielles du gène *ace-2* des différentes espèces a montré une sélection purificatrice forte et constante chez les diptères que le gène *ace-1* soit présent ou non. Ce résultat nous indique que l'AChE2 a une fonction importante, y compris chez les espèces orthorrhaphes telles que les moustiques.

II/ Identification des mutations de l'AChE1 responsables de résistance aux insecticides en populations naturelles.

Identification et distribution géographique des mutations responsables de l'insensibilité

Ces recherches ont été réalisées dans de nombreux pays et sur plusieurs espèces de moustiques. Trois mutations de l'AChE1 (G119S, F290V et F331W) ont été observées en populations naturelles^{8, 18, 19}. La mutation G119S avait été identifiée dans les deux sous-espèces de *C. pipiens* en Europe et dans les Caraïbes ainsi que chez *A. gambiae* en Afrique de l'ouest et *A. albimanus* en Amérique du Sud⁸. Nos recherches montrent qu'elle est aussi présente chez l'espèce *C. vishnui* en Chine²⁰, et élargissent son observation chez *C. p. quinquefasciatus* d'Asie du Sud-Est (Chine et Philippines)^{21, 22} et chez *C. p. pipiens* à l'est de la Méditerranée (Chypre, Liban) et en Afrique du Nord (Algérie, Tunisie)²³. La mutation F290V est présente chez *C. p. pipiens* de divers pays autour de la Méditerranée, du Liban à l'est, à l'Espagne à l'ouest en passant par l'Afrique du nord. Dans tous les échantillons étudiés cette mutation est à faible fréquence et presque toujours sympatrique avec la mutation G119S qui elle est en fréquence élevée²⁴. La mutation F331W n'a été détectée que chez l'espèce *C. tritaeniorhynchus* de Chine. Étonnamment tous les individus, analysés sur un transect nord/sud de 2000 kilomètres, sont homozygotes pour cette mutation²⁰. Il est intéressant de noter qu'il y a une bonne corrélation entre les spécificités de résistance des mutations sélectionnées et la nature des insecticides utilisés localement.

Niveaux de résistance

L'expression d'AChE1 recombinantes mutées en cellules S_2 a permis de mesurer et de caractériser l'influence des mutations sur la résistance^{8, 18, 20}. Toutes ces mutations sont localisées sur des positions

conservées proches du site actif de l'AChE1, et deux (F290V et F331W) ont aussi été observées chez d'autres insectes (Lépidoptères et Hémiptères)^{25,26}. Un faible nombre de mutations de l'AChE1 conférant une insensibilité est donc observée *in natura*. D'autre part, la comparaison des AChE1 de *C. pipiens* et d'*A. gambiae* a montré que ces enzymes sont très proches et que la mutation G119S confère des niveaux de résistance similaires dans ces deux espèces²⁷. Les niveaux d'insensibilité sont en général plus forts pour la mutation G119S que pour F290V et F331W²⁸, mais aucune n'est spécifique d'une classe particulière d'insecticides, OP ou CX. La mutation G119S qui est la plus fréquente en populations naturelles confère une résistance à un plus large spectre d'insecticides²⁸.

Origine des mutations

Chez *C. pipiens*, on savait que deux mutations G119S indépendantes s'étaient produites au locus *ace-1*, l'un chez *C. p. pipiens*, l'autre chez *C. p. quinquefasciatus*. Notre étude a identifié deux nouveaux événements de mutation, l'un en Asie du Sud-Est (Chine et Philippines), l'autre à Cuba^{21,22}. Nous avons montré l'existence d'un seul événement de mutation dans les deux formes moléculaires d'*A. gambiae*, sur un territoire comprenant la Côte d'Ivoire, le Burkina Faso et le Bénin²⁹.

Sept événements de mutation F290V ont été identifiés dans le bassin méditerranéen chez *C. p. pipiens*²⁴. Cette observation contraste fortement avec la situation de la mutation G119S qui, dans la même région, ne s'est produite qu'une fois.

Pour la mutation F331W, un seul événement de mutation a été observé en Chine dans l'espèce *C. tritaeniorhynchus* et il est le même que celui décrit au Japon¹⁹.

Evolution du coût de la résistance au locus *ace-1*

De nombreuses duplications du gène *ace-1* associant une copie sensible et une copie résistante (G119S ou F290V) ont été mises en évidence dans les populations naturelles de *C. pipiens*^{22,24} et d'*A. gambiae*²⁹. La duplication du gène *ace-1* apparaît être une réponse adaptative qui réduit le coût génétique de la mutation en absence d'insecticide. Cependant l'étude de ces duplications chez *C. pipiens* dans la région de Montpellier a permis de montrer qu'elles peuvent parfois entraîner des effets génétiques délétères³¹.

D'autre part, nous avons déterminé la valeur sélective de moustiques porteurs de deux allèles de résistance (*ace-1* G119S qui confère la résistance aux OP et la mutation dans le canal sodium, « *kdr* » qui confère la résistance aux pyréthriinoïdes) pour estimer l'impact de la résistance sur l'efficacité des moustiquaires bi-traitées avec deux classes d'insecticide différentes. La comparaison de souches à fond génétique homogène a montré que ces moustiques doubles mutants ont une valeur sélective meilleure que celle des simples mutants³². Dans la mesure où la faible valeur sélective associée à la résistance est un allié de la lutte anti-vectorielle ces résultats sont inquiétants, notamment pour les *A. gambiae* d'Afrique qui présentent de plus en plus ces deux mutations.

III/ Proposer des stratégies de lutte contre la résistance

Criblage de nouvelles molécules insecticides

Nous avons cherché à mettre au point de nouvelles molécules insecticides plus efficaces sur les moustiques résistants que sur les moustiques sensibles. Des molécules inhibitrices spécifiques de l'AChE1 G119S résistante aux OP ont été obtenues à la suite d'un criblage d'une banque chimique aléatoire de 3000 molécules. Des analogues de ces molécules présentent également une meilleure toxicité sur les larves résistantes. Ces molécules constituent donc la première génération d'insecticides plus actifs sur des larves de moustiques résistantes aux OP que sur les larves sensibles.

Nous avons entrepris d'optimiser l'efficacité insecticide et la spécificité de ces molécules via une approche de biologie structurale. Cet objectif requiert la résolution de la structure tridimensionnelle de l'AChE1 résistante, puis celle de complexes entre cette AChE1 et les molécules insecticides les plus prometteuses. A défaut, la structure de l'AChE1 sensible, associée à une approche de « docking » *in silico*, représente une alternative satisfaisante.

En pratique, la production et la purification de l'enzyme recombinante sensible ont été mises au point. Ce succès nous a permis de soumettre cette AChE1 à de nombreux (plusieurs centaines) essais de cristallogénèse et d'obtenir de petits cristaux de protéine, hélas dotés d'un trop faible pouvoir de diffraction aux rayons-x pour qu'ils conduisent à la résolution d'une structure. En parallèle, nous avons caractérisé les paramètres enzymatiques de AChE1 vis à vis de l'acétylthiocholine, un analogue du substrat physiologique, et l'avons trouvée plus de 2 fois plus rapide que l'AChE de souris et 2 fois moins que celle de gymnote. Enfin, nous avons généré *in silico* un modèle 3D, l'avons analysé et avons émis des hypothèses mécanistiques.

Il s'avère cependant que la solubilité limitée de AChE1 sensible recombinante après purification est un handicap sérieux pour un projet de caractérisation structurale par cristallographie aux rayons-x. Plusieurs

stratégies visant à stabiliser la protéine et dépasser cette étape limitante ont été tentées. Le clivage, par la protéase TEV, de l'étiquette 6xHis prolongeant l'extrémité C-terminale de la protéine n'a pas apporté d'amélioration notable. L'exploitation de la technologie NVOY (de longs polymères de carbohydrates présentant les avantages mais pas les inconvénients des détergents) a résulté en une augmentation significative de la capacité de concentration de la protéine, de la taille des cristaux, et de leur pouvoir de diffraction, mais pas encore suffisamment pour permettre l'acquisition de données cristallographiques. Plus récemment, l'ajout de proportions variables d'agents « de relarguage » dans les gouttes de cristallogenèse de NVOY-AChE1 a conduit en augmentation notable de la taille des cristaux mais aucune amélioration supplémentaire de leur qualité. Une information a cependant pu être extraite des clichés issus des tests de diffraction : le calcul des paramètres de maille suggère fortement que AChE1, bien qu'exprimée sous forme d'un monomère, forme un homodimère dans le crystal. Cette dimérisation, en parfait accord avec les comportements d'autres espèces d'AChE, confirme que la protéine recombinante que nous avons exprimée et purifiée est fonctionnellement ET structuralement intégrée. Nous continuons à travailler sur la qualité des cristaux afin de parvenir à collecter des données cristallographiques exploitables.

Publications obtenues

- 1 Cui F., M. Raymond, A. Berthomieu, H. Alout, M. Weill and C. L. Qiao. 2006. Recent emergence of insensitive acetylcholinesterase in Chinese populations of the mosquito *Culex pipiens*. *J. Med. Entomol.* 43:878-883
- 2 Huchard E., M. Martinez, H. Alout, E. J. P. Douzery, G. Lutfalla, A. Berthomieu, C. Berticat, M. Raymond and M. Weill. 2006. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 273:2595-2604
- 3 Alout H., A. Berthomieu, A. Hadjivassilis and M. Weill. 2007. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem. Molec.* 37:41-47
- 4 Labbe P., A. Berthomieu, C. Berticat, H. Alout, M. Raymond, T. Lenormand and M. Weill. 2007. High duplication rate in an insecticide resistance gene in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol. Biol. Evol.* 24:1056-1067
- 5 Alout H., A. Berthomieu, F. Cui, Y. Tan, C. Berticat, C. L. Qiao and M. Weill. 2007. Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from China. *J. Med. Entomol.* 44:463-469
- 6 Labbe P., Berticat C., Berthomieu A., Unal S., Bernard C., Weill M., Lenormand T. 2007. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the Mosquito *Culex pipiens*. *PLOS Genetics.* 3:2190-2199.
- 7 Ben Cheikh R., Berticat C., Berthomieu A., Pasteur N., Ben Cheikh R., Weill M. 2008. Characterization of a novel high-activity esterase in Tunisian Populations of the mosquito *Culex pipiens*. *J. Econ. Entomol.* 101(2):484-491.
- 8 Berticat C., Bonnet J., Duchon S., Agnew P., Weill M., Corbel V. 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol. Biol.* 8: 8
- 9 Alout H., L. Djogbenou, C. Berticat, F. Chandre and M. Weill. 2008. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* Acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 150(3):271-277.
- 10 Alout H. and M. Weill. 2008. Amino-acid substitutions in acetylcholinesterase 1 involved in insecticide resistance in mosquitoes. *Chem Biol Interact.* 175(1-3): 138-141
- 11 Djogbénou L., Chandre F., Berthomieu A., Dabiré R., Koffi A., Alout H., Weill M. 2008. Evidence of introgression of the ace-1(R) mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. *PLoS ONE.* 3(5):e2172.
- 12 Ben Cheikh R., Berticat C., Berthomieu A., Pasteur N., Ben Cheikh H., Weill M. 2009. Genes conferring resistance to organophosphorus insecticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. *J. Med. Entomol.* 46(3): 523-530.
- 13 Djogbenou L., Labbe P., Chandre F., Pasteur N., Weill M. 2009. *Ace-1* duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. *Malaria Journal* 8:70.
- 14 Alout H., Labbé P., Berthomieu A., Pasteur N., Weill M. 2009. Multiple duplications of the rare *ace-1* mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* In press.

Faits marquants et retombées prévisibles

La résistance aux insecticides chez les moustiques est un modèle de choix pour l'étude des phénomènes adaptatifs. La connaissance des processus mis en jeu dans cette adaptation peut avoir des applications pratiques et permettre de développer des stratégies de lutte efficaces et respectueuses de l'environnement.

Nos recherches se sont focalisées sur l'AChE1 des moustiques, cible des OP et des carbamates. Les faits marquants de notre étude sont les suivants:

- Nous avons montré que le déterminisme génétique de la résistance de l'AChE est très original dans l'ordre des Diptères. Tout le large groupe monophylétique des Cyclorhaphes, qui comprend la drosophile et la mouche domestique, a perdu le gène *ace-1* qui code pour l'AChE1 et c'est l'AChE2 qui assure la fonction synaptique. Chez les autres insectes en particuliers, chez les Hémiptères (pucerons), les Dycyoptères (blattes), les Phtiraptères (pou) et les Lépidoptères (papillons) et les Diptères Orthorhaphes (moustiques), c'est le gène *ace-1* qui code l'enzyme synaptique. L'AChE2 ne peut donc plus être utilisée comme modèle d'étude de l'AChE de tous les insectes. Nous maintenons donc notre objectif de résoudre une structure cristalline de l'AChE1 de *C. pipiens*, laquelle structure constituera un modèle optimal pour comprendre les mécanismes de résistance aux insecticides actuels. Par ailleurs cette structure permettra d'améliorer *in silico* des molécules insecticides spécifiques des individus résistants.
- Seules trois mutations qui rendent l'AChE1 insensible aux insecticides ont été caractérisées dans de nombreuses populations naturelles de différentes espèces de moustiques échantillonnées de par le monde. De plus la mutation G119S est de loin la plus commune. L'AChE1 semble donc très contrainte et sa forme mutée G119S représente toujours une cible de choix pour le développement de nouveaux insecticides. Nous avons donc cherché de nouvelles molécules capables d'inhiber spécifiquement l'AChE1 résistante G119S, et nous avons trouvé des molécules qui représentent la première génération d'insecticides plus actifs sur des moustiques résistants aux OP que sur des moustiques sensibles.
- Les moustiques résistants via une AChE1 insensible présentent, en l'absence d'insecticide, un coût par rapport aux individus sensibles. Nos études ont hélas montré que le coût de la mutation G119S diminue dans le cas de duplications du gène *ace-1*, la sélection d'une duplication est équivalente à la sélection d'un gène « modifieur » qui restaure (au moins partiellement) la valeur adaptative des individus résistants et ces duplications augmentent en fréquence chez les moustiques *C. pipiens* et *A. gambiae*. De plus les moustiques doubles mutants qui possèdent les deux mécanismes de résistance aux pyréthrinoides et aux OP ont une meilleure valeur adaptative, ce qui risque de diminuer l'efficacité de moustiquaires bi-imprégnées. La réduction du coût peut rendre inefficaces les stratégies d'alternance d'insecticides dans le temps ou dans l'espace.

Références

1. Lenormand, T., Bourguet, D., Guillemaud, T. & Raymond, M. Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature* 400, 861-864 (1999).
2. Roush, R. T. & McKenzie, J. A. Ecological studies of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology* 32, 361-80 (1987).
3. Guillemaud, T. et al. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: Allele replacement and changing environment. *Evolution* 52, 443-453 (1998).
4. McKenzie, J. A. Measuring fitness and intergenic interactions: the evolution of resistance to diazinon in *Lucilia cuprina*. *Genetica* 90, 227-237 (1993).
5. Malcolm, C. A. et al. A sex-linked *Ace* gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 7, 107-120 (1998).
6. Weill, M., Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269, 2007-16 (2002).
7. Weill, M., Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* 13, 1-7 (2004).
8. Weill, M. L. G., Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Phillips A, Fort P, Raymond M. Insecticide Resistance in mosquito vector. *Nature* 423, 136-137 (2003).
9. Gazave, E., Chevillon C, Lenormand T, Marquine M, Raymond M. Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 87, 441-8 (2001).
10. Lenormand, T., Guillemaud, T., Bourguet, D. & Raymond, M. Evaluating gene flow using selected markers: A case study. *Genetics* 149, 1383-1392 (1998).
11. Berticat, C., Duron O, Heyse D, Raymond M. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genetical Research* 83, 189-96 (2004).

12. Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. & Chevillon, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical research* 79, 41-47 (2002).
13. Berticat, C., Rousset, F., Raymond, M., Berthomieu, A. & Weill, M. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269, 1413-1416 (2002).
14. Bourguet, D., Guillemaud, T., Chevillon, C. & Raymond, M. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 58, 128-135 (2004).
15. Duron, O. et al. High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Evolution* 60, 303-314 (2006).
16. Raymond, M., Berticat C., Weill M., Pasteur N., Chevillon C. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens* : What have we learned about adaptation? *Genetica* 112/113, 287-296 (2001).
17. Huchard, E. et al. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273, 2595-2604 (2006).
18. Alout, H., Berthomieu, A., Hadjivassilis, A. & Weill, M. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 41-47 (2007).
19. Nabeshima, T., Mori, Kozaki, Iwata, Hidoh, Harada, Kasai, Severson, Kono, Tomita. An amino acid substitution attributable to insecticide-resistance in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 313, 794-801 (2004).
20. Alout, H. et al. Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera : Culicidae) from China. *Journal of Medical Entomology* 44, 463-469 (2007).
21. Cui, F. et al. Recent emergence of insensitive acetylcholinesterase in Chinese populations of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 43, 878-883 (2006).
22. Labbe, P. et al. Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex pipiens*. *Molecular Biology and Evolution* 14, 1056-1067 (2007).
23. Ben Cheikh, R. et al. Genes Conferring Resistance to Organophosphorus Insecticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) From Tunisia. *Journal of Medical Entomology* 46, 523-530 (2009).
24. Alout, H., Labbé, P., Berthomieu, A., Pasteur, N. & Weill, M. Multiple duplications of the rare ace-1 mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* *In press* (2009).
25. Alon, M., Alon, F., Nauen, R. & Morin, S. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 940-949 (2008).
26. Cassanelli, S., Reyes, M., Rault, M., Manicardi, G.C. and Sauphanor, B. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 642-653 (2006).
27. Alout, H., Djogbenou, L., Berticat, C., Chandre, F. & Weill, M. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 150, 271-277 (2008).
28. Alout, H. & Weill, M. Amino-acid substitutions in acetylcholinesterase 1 involved in insecticide resistance in mosquitoes. *Chemico-Biological Interaction* 175, 138-41 (2008).
29. Djogbenou, L. et al. Evidence of introgression of the ace-1(R) mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. *PLoS ONE* 3, e2172 (2008).
30. Djogbenou, L., Labbe, P., Chandre, F., Pasteur, N. & Weill, M. Ace-I duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. *Malaria Journal* 8 (2009).
31. Labbe, P. et al. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the Mosquito *Culex pipiens*. *Plos Genetics* 3, 2190-2199 (2007).
32. Berticat, C. et al. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evolutionary Biology* 8 (2008).
33. Lenormand, T. & Raymond, M. Resistance management: the stable zone strategy. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265, 1985-1990 (1998).