

Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens

Éric Haubruge ⁽¹⁾, Marcel Amichot ⁽²⁾

⁽¹⁾ Unité de Zoologie générale et appliquée. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : haubruge.e@fsagx.ac.be

⁽²⁾ Unité de Recherche sur la Résistance aux Xénobiotiques. INRA. BP 2078, F-06606 Antibes Cedex (France).

Reçu le 17 novembre 1997, accepté le 26 janvier 1998.

La résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens est un phénomène qui se développe de façon inquiétante. Les connaissances déjà anciennes sur les mécanismes de résistance et celles acquises très récemment par la biologie moléculaire laissent entrevoir des possibilités de gestion de la résistance. Ceci ne peut s'envisager qu'après avoir mis au point des outils pour détecter et diagnostiquer les différents types de résistance en cause. Dans cet article, nous faisons l'état des connaissances sur les résistances comportementales, physiologiques et biochimiques, sur les bases moléculaires des mécanismes de résistance et enfin, sur la manière dont toutes ces connaissances pourraient être appliquées au problème de la détection des gènes de résistance ainsi que dans le domaine de l'écotoxicologie.

Mots-clés. Résistance aux insecticides, biologie moléculaire, gènes, insectes, acariens.

Insect and mite resistance mechanisms to insecticides. Insecticide resistance is documented in nearly all insects and mites in which it has been studied. It is a major obstacle to control agriculturally important pests. Next to the already ancient knowledge on resistance this review discusses recent major breakthroughs in understanding the mechanisms, at molecular level, by which insects acquire resistance to natural, synthetic or bioengineered insecticides. Resistance is due either to a modification of the target affinity for the pesticide or to an increase of detoxification through some enzymatic systems. Now the challenge is to isolate the DNA encoding for these various proteins in order to understand what happens at the genetic level when an insect acquires resistance to insecticides. In this paper we review several types of resistance mechanisms (behavioural, physiological and biochemical) and we indicate the application that can be expected from this knowledge, mainly for the managing of the resistance genes in natural populations and for ecotoxicological studies.

Keywords. Insecticide resistance, molecular biology, genes, insects, mites.

INTRODUCTION

Autrefois, les populations d'insectes résistant à des pesticides étaient combattues soit en augmentant les quantités de produit utilisées, soit en appliquant de nouvelles matières actives. Ces deux stratégies sont désormais révolues. L'utilisation de quantités croissantes d'insecticides représente un danger pour l'environnement et est très coûteuse ; par ailleurs, la découverte et le développement de nouveaux insecticides sont en nette diminution. Il reste donc peu d'alternatives pour lutter contre des insectes comme *Leptinotarsa decemlineata*¹ ou *Heliothis virescens* qui sont résistants aux insecticides qu'il s'agisse des organophosphorés, des carbamates ou des pyréthrinoides. Toutes ces considérations poussent à prendre des mesures d'urgence,

basées sur l'élaboration de stratégies adéquates dans l'utilisation des pesticides. Les données inhérentes aux insecticides, à leur toxicité et à leurs interactions avec les sites d'action dans l'arthropode, à la connaissance des mécanismes biochimiques de résistance, sont essentielles pour la mise au point de telles stratégies.

On distingue trois types de mécanisme de résistance qui se traduisent par des modifications comportementales, physiologiques et biochimiques :

– la résistance comportementale s'observe au niveau de l'insecte qui présente un comportement différent, empêchant le toxique d'agir ;

– la résistance physiologique s'exprime au niveau des tissus et organes ; elle est caractérisée par une diminution de la pénétration ou par une augmentation de l'excrétion des insecticides ;

– la résistance biochimique se situe au niveau cellulaire ; elle consiste d'une part, en une augmentation de l'activité enzymatique des systèmes de détoxification

¹ Les noms scientifiques complets des espèces d'insectes et d'acariens cités sont renseignés au tableau 1.

et d'autre part, en une diminution de l'affinité des sites d'action vis-à-vis des insecticides.

Ces mécanismes sont très divers, bien que tous aient pour résultat ultime de diminuer l'action toxique de l'insecticide considéré (Figure 1).

Nous proposons ici de faire le point des connaissances actuelles sur les principaux mécanismes responsables de la résistance aux pesticides chez les insectes et les acariens en envisageant successivement les phénomènes comportementaux, physiologiques et biochimiques (Tableau 1).

RÉSISTANCE COMPORTEMENTALE : MYTHE OU RÉALITÉ

Depuis la mise en évidence de mécanismes comportementaux dans la résistance aux insecticides, en 1956 (Lockwood *et al.*, 1984), peu de recherches ont été effectuées dans ce domaine. L'approche expérimentale d'une telle résistance n'est pas facile à concevoir, car

tout changement dans le comportement est difficile à quantifier en laboratoire.

Chez l'insecte, on distingue deux catégories de mécanismes comportementaux de "résistance", qui permettent aux individus d'éviter le contact avec le produit toxique ou qui limitent la durée de ce contact.

Résistance associée à la mobilité de l'insecte

Le mécanisme de résistance comportemental peut être dépendant du stimulus, ce qui implique une reconnaissance de la substance toxique par des récepteurs sensoriels de l'insecte, créant une irritabilité (qui pousse l'insecte à quitter l'environnement toxique au contact de l'insecticide) et une répulsion (qui permet à l'insecte d'éviter le contact avec le pesticide) (Davidson, 1953). Ce type de mécanisme se rencontre essentiellement chez les Diptères. Les adultes d'*Haematobia irritans*, au contact de la perméthrine ou de la deltaméthrine, augmentent leur mobilité de manière à minimiser le temps de contact avec le pesticide (Lockwood *et al.*, 1984).

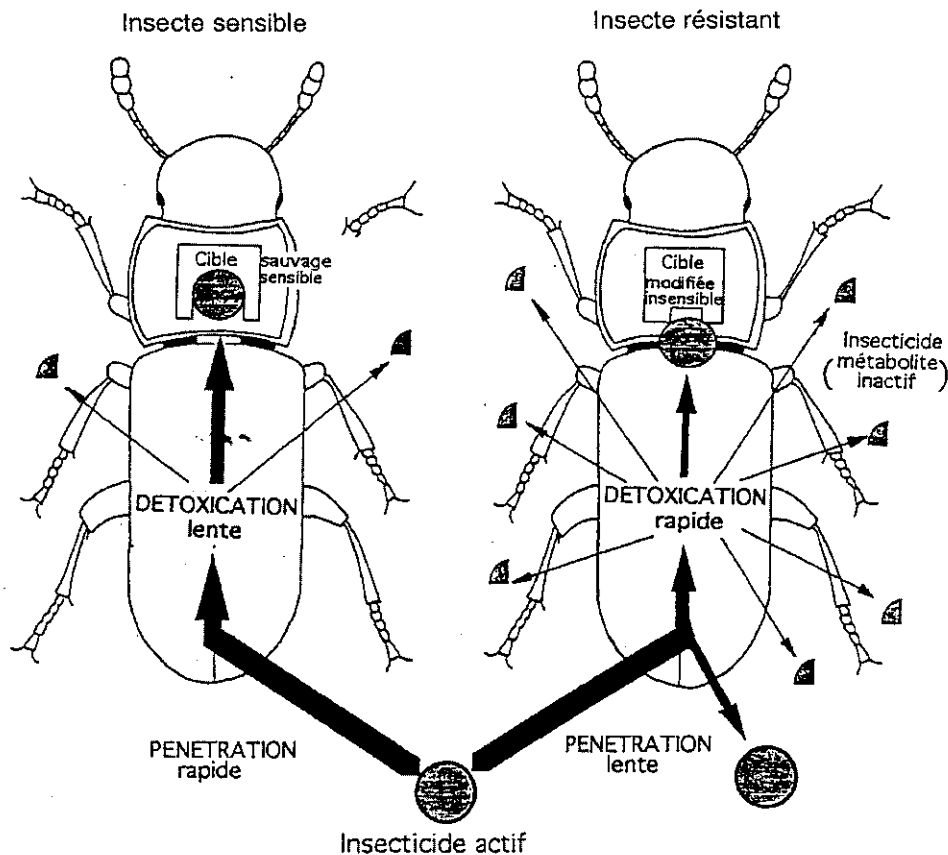


Figure 1. Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux pesticides chez les Arthropodes — Schematic illustration of the different pesticide resistance mechanisms in the Arthropoda.

Tableau 1. Les espèces d'insectes et d'acariens et les mécanismes de résistance aux insecticides — *Insects and mites species and their resistance mechanisms to pesticides.*

Espèce	Famille	Mécanismes comportementaux	Mécanismes physiologiques	Mécanismes biochimiques	
				Augmentation de l'activité enzymatique	Modification de la cible
<i>Aedes aegypti</i> L.	Culicidae	-	-	OP	CY
<i>Anopheles albimanus</i> Wied.	Culicidae	-	-	OP/PYR/DDT	OP/CAR
<i>Anopheles arabiensis</i> L.	Culicidae	-	-	OP	-
<i>Anopheles culicifacies</i> L.	Culicidae	-	-	OP	-
<i>Anopheles stephensi</i> Liston	Culicidae	-	-	OP	PYR/DDT
<i>Blattella germanica</i> L.	Blattidae	PYR	OP/CAR/PYR	OP/CAR/PYR	PYR/DDT
<i>Culex pipiens</i> L.	Culicidae	-	-	OP	OP/CAR
<i>Culex quinquefasciatus</i> L.	Culicidae	-	-	OP/CAR	PYR/DDT
<i>Culex tarsalis</i> Coquillett	Culicidae	-	-	OP	-
<i>Drosophila melanogaster</i> Meig.	Drosophilidae	-	-	OP/CAR/PYR/DDT	OP/PYR/DDT/CY
<i>Haematobia irritans</i> L.	Calliphoridae	PYR	-	-	PYR
<i>Helicoverpa armigera</i> Hübner	Noctuidae	-	OP/PYR	PYR	OP/PYR
<i>Heliothis virescens</i> L.	Noctuidae	PYR	PYR	OP/PYR	OP/PYR/DDT
<i>Laodelphax striatellus</i> Fallen	Delphacidae	-	-	OP	-
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	Chrysomelidae	-	-	OP/PYR	OP/PYR/DDT
<i>Lucilia cuprina</i> Wied.	Calliphoridae	-	-	OP	CY
<i>Musca domestica</i> L.	Muscidae	-	PYR	OP/CAR/PYR	OP/PYR/DDT
<i>Myzus persicae</i> Sulz.	Aphididae	-	-	OP	OP/PYR
<i>Nephotettix cincticeps</i> Uhler	Cicadellidae	-	-	OP	OP
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> L.	Cucujidae	-	-	OP	-
<i>Periplaneta americana</i> L.	Blattidae	-	-	-	CY
<i>Plodia interpunctella</i> Hübner	Pyralidae	-	-	OP	-
<i>Rhyzopertha dominica</i> F.	Bostrychidae	-	PH ³	OP	OP
<i>Sitophilus granarius</i> L.	Curculionidae	-	PH ³	-	-
<i>Spodoptera littoralis</i> Bois du Val	Noctuidae	-	-	OP/PYR	OP
<i>Spodoptera exigua</i> Hübner	Noctuidae	-	-	CY	-
<i>Tetranychus kanzawai</i> Koch	Tetranychidae	-	-	-	OP
<i>Tetranychus urticae</i>	Tetranychidae	-	-	OP	-
<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	Tenebrionidae	-	OP	OP/PYR	PYR/CY/DDT
<i>Trichoplusia ni</i> Hübner	Noctuidae	-	-	DDT	-

OP = organophosphorés ; CAR = carbamates ; PYR = pyréthrinoïdes ; CY = cyclodiènes ; PH³ = phosphine ; - = non détecté

Résistance associée à l'immobilité de l'insecte

Ce type de résistance comportementale correspond à la possibilité pour l'insecte de limiter le temps de contact avec le pesticide. Par exemple, la diminution de l'activité locomotrice des larves résistantes de *Heliothis virescens* est une réponse comportementale provoquée par la présence d'un pyréthrinoïde. Après 6 heures sur une surface de verre traitée avec 0,03 µg de perméthrine, les chenilles résistantes d'*Heliothis virescens* ont été en contact avec 0,5 % de la quantité de pyréthrinoïde déposée, alors que les larves sensibles portent plus de 5 % de la perméthrine appliquée (Sparks *et al.*, 1989). Des individus de certaines souches d'*Haematobia irritans* résistantes aux pyréthrinoïdes fréquentent les régions ventrales et postérieures non traitées des bovins possédant à

l'oreille une étiquette imprégnée de pesticides (Georghiou, 1990).

RÉSISTANCE PHYSIOLOGIQUE : UN REMPART CONTRE L'EFFET DES INSECTICIDES

Des modifications affectant la physiologie de l'insecte peuvent être à la base de la résistance aux pesticides : la cinétique de pénétration, la séquestration ou l'excrétion.

Modification de la cinétique de pénétration de l'insecticide

Pour atteindre leurs cibles moléculaires, les insecticides pénètrent à l'intérieur des insectes en traversant

soit la cuticule, soit les parois du tube digestif. Cette pénétration a lieu à une vitesse qui, pour un même toxique, varie d'une espèce à l'autre. Si la cinétique de pénétration est suffisamment lente, l'insecticide pourra être dégradé par les systèmes de détoxification et aura peu d'effet. Les insectes concernés seront sélectionnés par le pesticide et donneront naissance à une population résistante. De telles modifications de la pénétration de l'insecticide à travers la cuticule ont été mises en évidence chez plusieurs insectes : *Musca domestica* (Sawicki, Farnham, 1968), *Culex pipiens* (Stone, Brown, 1969), *Tribolium castaneum* (Walter, Price, 1989), *Heliothis virescens* (Lee *et al.*, 1989).

Les mécanismes moléculaires de la pénétration n'ont été que peu étudiés : les seules données expérimentales connues portent sur le bilan de la pénétration en mesurant, après un certain temps, la quantité d'insecticide marqué radioactivement présente à l'intérieur ou à l'extérieur de l'insecte. Cependant, plusieurs auteurs ont tenté de comprendre ce mécanisme physiologique de résistance, notamment en étudiant la composition de la cuticule chez des souches sensibles ou résistantes de *Musca domestica* (Benezet, Forgash, 1972). On n'observe aucune différence quantitative ou qualitative dans la composition en hydrocarbures de la cuticule entre les deux souches. Par contre, la cuticule de deux souches résistantes de *Musca domestica*, contiendrait plus de phospholipides (entre 1,6× et 1,9×) que chez une souche sensible (Patil, Guthrie, 1979).

D'autres barrières, de type membranaire et non cuticulaire, existent également chez les insectes résistants comme la blatte germanique, *Blattella germanica*. Alors qu'il n'existe aucune différence de pénétration de la dieldrine au niveau de la cuticule de *Blattella germanica*, la chaîne nerveuse abdominale de la souche sensible contient davantage de lipides que celle de la souche résistante (Matsumura, 1983).

Excrétion des insecticides

Chez *Sitophilus granarius* et *Rhyzopertha dominica*, on observe un phénomène d'excrétion directe sans biotransformation, respectivement du bromure de méthyle et du phosphore d'aluminium (Chaudry, 1997). Ce type de résistance est mal connu chez les insectes ; il est cependant intéressant de noter que chez *Caenorhabditis elegans*, un cas de résistance au vanadate et au thiabendazole est associé au gène SKS I (+) (Multi Drug Resistance). Celui-ci est surexprimé et la protéine, synthétisée, expulse rapidement le toxique hors du nématode (Usui *et al.*, 1995). Ce type de gène a été également décrit chez la drosophile (Wu *et al.*, 1991). Ceci peut ouvrir une nouvelle voie d'approche pour l'étude de ce type de résistance.

LA RÉSISTANCE BIOCHIMIQUE AUX INSECTICIDES

Au moment où l'insecte entre en contact avec l'insecticide, ce dernier pénètre dans l'organisme et atteint, plus ou moins rapidement, au niveau cellulaire, les protéines et les enzymes cibles dont il entrave le fonctionnement normal. On distingue à cet égard deux types de modifications : (a) une activité accrue des systèmes de dégradation des xénobiotiques (et donc des insecticides), et (b) une modification de la cible de l'insecticide devenant capable de fonctionner correctement malgré la présence d'insecticide.

Augmentation de l'activité des systèmes de détoxification

De nombreuses toxines possèdent un caractère lipophile et peuvent devenir plus hydrosolubles par biotransformation dans l'insecte, et de ce fait plus facilement excrétables. Les possibilités qu'ont les insectes de dégrader les insecticides sont associées aux systèmes enzymatiques de détoxification (Figure 2). Chez les invertébrés, les voies métaboliques concernées sont très voisines de celles décrites chez les mammifères. On y retrouve deux types de réactions classiques :

- les réactions de la phase I (hydrolyse et oxydation), appelées réactions de fonctionnalisation, incluent l'activation et/ou la conversion des molécules exogènes en un composé plus polaire. L'introduction de groupes fonctionnels augmente la solubilité dans l'eau et permet, soit leur stockage loin des tissus sensibles, soit leur excrétion. Ces métabolites issus des xénobiotiques peuvent être pris en charge par les enzymes impliquées dans la phase II ;
- les réactions de la phase II, ou réactions de conjugaisons, qui permettent la combinaison des groupements fonctionnels ainsi introduits ou des groupements préexistants, avec des métabolites endogènes fortement hydrophiles (glycosides, glutathion ou acides aminés), ce qui en favorise l'excrétion.

Dans le cas des insecticides, cette métabolisation se traduit souvent par une perte d'activité des produits avec développement de phénomènes de résistance. Trois types d'enzymes participent à ce processus : les cytochromes P-450 qui introduisent un atome d'oxygène dans leurs substrats ; les glutathion S-transférases qui catalysent la conjugaison de molécules ayant un centre électrophile avec le groupement thiol du glutathion et enfin, les hydrolases qui clivent les esters et les amides, augmentant ainsi la polarité des métabolites.

Les cytochromes P-450. Les monooxygénases à cytochromes P-450 (P450) sont des enzymes impliquées chez les insectes dans le métabolisme d'hormones

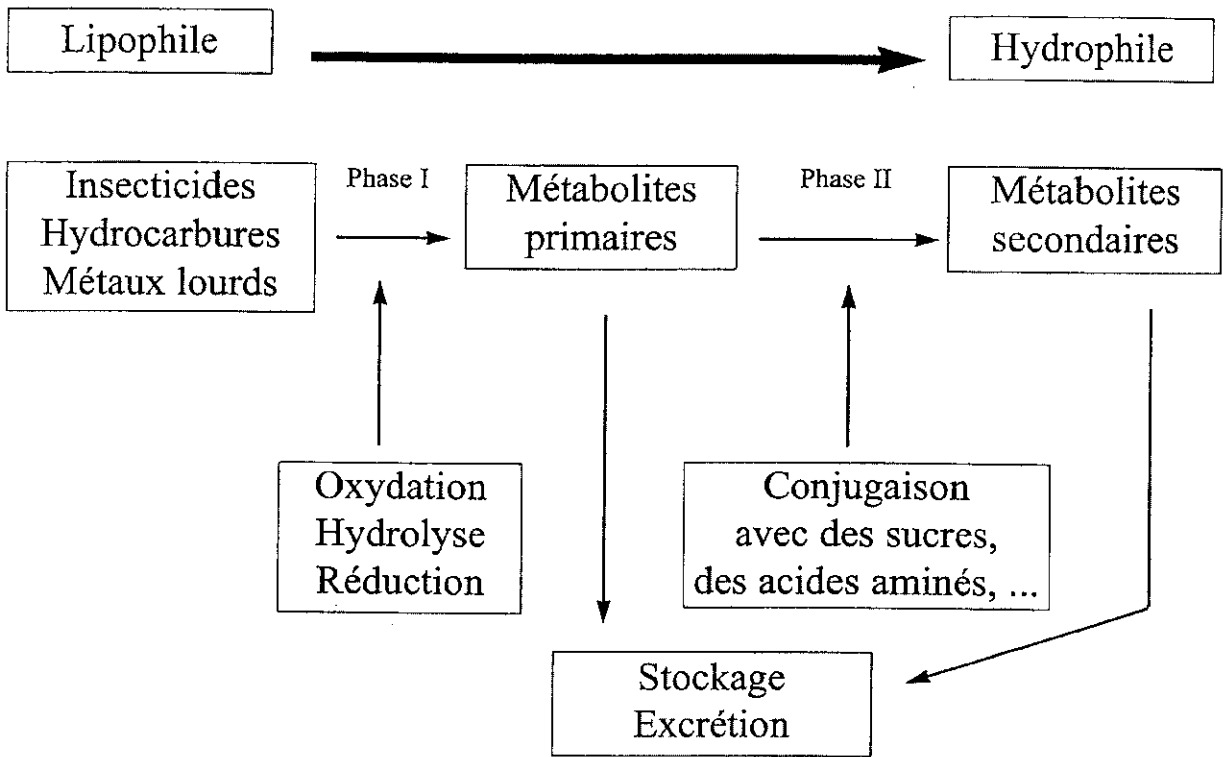


Figure 2. Processus biochimiques mis en œuvre pour métaboliser les substances toxiques absorbées par l'insecte — *Biochemical processes involved to metabolize the toxic substances absorbed by the insect.*

juvéniles et d'ecdyses, dans la synthèse des phéromones et la protection vis-à-vis de substances toxiques d'origine végétale. Les systèmes enzymatiques à cytochromes P-450 sont souvent comparés aux composants des systèmes immunitaires du fait que, comme ces derniers, ils sont impliqués dans des réactions de défense. Cette comparaison est d'autant plus valable que la synthèse de nombreux P450 est induite par la présence des substances toxiques qu'ils métabolisent. Elles ont également attiré l'attention par leur rôle dans l'activation et la détoxification des insecticides.

Les P450 sont les ultimes accepteurs d'une chaîne de transporteurs d'électrons. Cette chaîne comporte une flavoprotéine : la NADPH-cytochrome P-450 réductase qui transfère les deux électrons du NADPH au P450. Dans certains cas, le couple NADH-cytochrome *b5* réductase/cytochrome *b5* peut intervenir comme transporteur supplémentaire d'électrons, l'accepteur final étant toujours le P450. Les P450 greffent un atome d'oxygène sur leur substrat qui peut se réorganiser spontanément pour donner le(s) produit(s) final(aux). Le large spectre d'action des P450 est dû à l'existence de nombreux isozymes de cytochromes P-450 dans une seule espèce, dont

chacune possède une affinité à l'égard d'un ou quelques substrats caractéristiques et spécifiques (Fisher, Mayer, 1984 ; Moldenke *et al.*, 1984). Ce complexe enzymatique est fixé sur le reticulum endoplasmique des cellules, plus rarement dans les mitochondries. On le trouve principalement dans les cellules du tube digestif, des tubes de Malpighi et des corps gras de l'insecte.

Les molécules inhibitrices de l'activité des mono-oxygénases (pypéronyl butoxide ou sésamex) jouent un rôle dans la résistance à un grand nombre d'insecticides. La résistance au carbaryl chez *Musca domestica*, caractérisée en 1971, disparaît lorsque les mouches sont traitées avec un mélange de carbaryl et sésamex (1:10). De même, le pypéronyl butoxide (PB) inhibe la résistance au m-isopropylphényl N-méthylcarbamate. On qualifie alors ces molécules de synergistes de l'action des insecticides.

L'implication des P450 dans la résistance de la mouche domestique aux insecticides est clairement établie (Tsukamoto *et al.*, 1965). Chez les souches résistantes, la métabolisation de plusieurs carbamates est en relation avec une forte activité des mono-oxygénases à cytochromes P-450 laquelle est associée à la fraction microsomale ainsi qu'au cofacteur

NADPH et susceptible d'être bloquée par le pypéronyl butoxide. Les monoxygénases à cytochromes P-450 ont été quantifiées chez les insectes d'une souche de *Musca domestica* résistante à la perméthrine (Scott, Lee, 1993). On les trouve principalement au niveau des corps gras (4,92 pmol/abdomen) et dans l'intestin antérieur (3,24 pmol/abdomen).

Grâce à l'utilisation de synergistes, on a pu montrer que pratiquement tous les insecticides sont concernés par la résistance due aux monoxygénases à cytochromes P-450 : DDT (Oppenoorth, 1965), lindane (Tanaka, 1981), carbamates (Tsukamoto, Casida, 1967), organophosphorés (El Bashir, Oppenoorth, 1969), pyréthriinoïdes (Nicholson, Sawicki, 1980), méthoprène (Hammock, 1985) et diflubenzuron (Pimprikar, Georghiou, 1979). L'intervention du système P450 dans la résistance aux pesticides chez d'autres invertébrés que la mouche domestique et la drosophile a été peu étudiée. Ce complexe enzymatique intervient dans la résistance de *Culex pipiens* au propoxur (Shrivastata *et al.*, 1970), de *Trichoplusia ni* à l'égard du DDT (Kuhr, 1971), de *Tribolium castaneum* vis-à-vis du malathion (Cohen, 1982), d'*Heliothis virescens* et d'*Helicoverpa armigera* à l'égard des pyréthriinoïdes (Pittendrigh *et al.*, 1997) et d'*Anopheles albimanus* aux pyréthriinoïdes (Brogdon *et al.*, 1997).

La résistance liée à l'augmentation de l'activité monoxygénase est souvent associée à l'accroissement de la quantité totale de cytochromes P-450, quelquefois combinée à l'augmentation des quantités de cytochromes *b5* et de réductases (Scott, 1996). Une souche de *Musca domestica* résistante à la perméthrine a été sélectionnée ; celle-ci possède 3,8 fois plus de cytochromes P-450, 1,5 fois plus de cytochromes *b5* et 2,8 fois plus de réductases que la lignée sensible (Scott, Lee, 1993).

L'hyperactivité des P450 serait associée, soit à leur surproduction dans plusieurs souches de mouche ou de drosophile résistantes aux insecticides (Feyereisen *et al.*, 1989), soit à un accroissement de leur affinité vis-à-vis du pesticide comme c'est le cas pour la résistance au DDT chez la drosophile (Brun *et al.*, 1996).

Les glutathion S-transférases (GST). Les glutathion S-transférases ont un rôle important dans la détoxification de substances xénobiotiques et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances au glutathion endogène. Ceci résulte en la synthèse d'un acide mercapturique qui est ensuite facilement excrétable. Il existe deux formes de GST chez les insectes. Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules des corps gras et des muscles alaires (Franciosa, Bergé, 1995).

Depuis la découverte des glutathion S-transférases dégradant des organophosphorés (Fukami, Shishido,

1966), de nombreuses études montrent l'importance de ce système enzymatique dans la résistance aux insecticides. La présence de hautes teneurs en GST a été mise en évidence chez des souches de *Musca domestica* résistantes au diazinon (Lewis, 1969). Une forte dégradation du parathion catalysée par les GST a été observée dans une souche résistante de *M. domestica* (Motoyama, Dauterman, 1972). On retrouve en effet trois métabolites provenant de réactions de déalkylation et de déarylation : le parathion déséthyle, l'acide diéthyle phosphorothioïque et le glutathion éthyl. Concernant le métabolisme de l'azinphos-méthyle, une différence significative existe, en présence de glutathion, entre la fraction soluble de la souche sensible et celle de la lignée résistante RUTGERS de *M. domestica*. De plus, chez cette souche résistante, l'activité des GST à l'égard de l'azinphos-méthyle, du diazinon, de l'iodure de méthyle et du 3,4-dichloronitrobenzène est élevée (Motoyama, Dauterman, 1972).

Il existe également des correspondances similaires chez une lignée d'*Heliothis virescens* résistante au diméthyle p-méthylsulphonyl phényle phosphate (Bull, Whitten, 1972), chez une souche de *Tribolium castaneum* résistante au malathion (Cohen, 1982) et à la cyfluthrine (Reddy *et al.*, 1990), chez des souches d'*Oryzaephilus surinamensis* vis-à-vis du fénitrothion (Rose, Wallbank, 1988), chez une lignée de *Spodoptera littoralis* à l'égard du lindane (Lagadic *et al.*, 1993) et chez une souche d'*Anopheles albimanus* résistante au DDT (Hemingway *et al.*, 1997).

Les recherches concernant la métabolisation des pesticides par ces enzymes sont compliquées. En effet, les molécules conjuguées ne sont pas faciles à détecter et à analyser. De plus, l'activité des GST est souvent couplée à d'autres mécanismes de détoxification dans la résistance aux organophosphorés chez *Musca domestica* (Motoyama, Dauterman, 1972), *Tribolium castaneum* (Cohen, 1982) et *Oryzaephilus surinamensis* (Rose, Wallbank, 1988).

Les estérases. Les estérases constituent un groupe important d'enzymes qui catalysent l'introduction d'une molécule d'eau au niveau d'une liaison, ester ou amide, spécifique du substrat. En ce qui concerne la résistance aux insecticides, on distingue deux catégories : (a) les carboxylestérases ayant une action directe dans la dégradation d'organophosphorés et (b) les estérases non spécifiques qui fixent l'insecticide sans le dégrader.

Chez les insectes, les estérases sont impliquées dans la reproduction, dans le métabolisme des hormones, dans la digestion ainsi que dans la neurotransmission. Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme et sur le reticulum endoplasmique des cellules du tube digestif, des tubes de Malphigi, du système reproducteur et du corps gras.

L'étude des estérases impliquées dans la détoxification des insecticides peut se faire en utilisant des pesticides marqués et en caractérisant leur activité catalytique vis-à-vis de substrats qui, après métabolisation, donnent des produits colorés ou qui peuvent être couplés à des molécules chromogènes. C'est le cas d'estérases qui hydrolysent des substrats à base d'acétate de naphthyle, libèrent du naphtol qui, après couplage à un diazonium, donnent naissance à un dérivé diazonique. Grâce à cette technique, deux types de carboxylestérases impliquées dans la résistance aux pesticides ont été mis en évidence.

– *Les carboxylestérases à activité accrue à l'égard de l'ester de naphthyle.* Une corrélation positive a été établie entre le facteur de résistance des souches du puceron *Myzus persicae* et l'activité estérasique à l'égard de l'acétate de naphthyle (Devonshire, Moore, 1982). Il a été montré que le gène codant cette estérase est présent sous forme de copie multiple et qu'il est dérégulé dans les populations résistantes. Des souches du moustique *Culex pipiens* résistantes aux organophosphorés possèdent une quantité d'estérases 250 fois plus élevée que les souches sensibles (Mouchès *et al.*, 1986). Ici aussi, le gène a été l'objet d'un phénomène d'amplification. Dans ces deux cas, les estérases agissent en piégeant l'insecticide. Ce phénomène de "séquestration" des pesticides par une estérase E_0 amplifiée a été récemment observé chez une souche de *Blattella germanica* résistante au chlorpyrifos, au méthyl-parathion, au propoxur et à la cyperméthrine (Prabhakaran, Kamble, 1996).

Chez d'autres espèces, la résistance aux organophosphorés est due à l'augmentation de la dégradation enzymatique de l'insecticide par des estérases. C'est le cas de *Nephotettix cincticeps* (Kojima *et al.*, 1963 ; Ozaki, 1969), *Laodelphax striatellus* (Ozaki, Kasai, 1970) et *Culex tarsalis* (Prabhaker *et al.*, 1987). Le(s) phénomène(s) à l'origine de ces surproductions d'enzymes ne sont pas connus.

– *Les carboxylestérases ne présentant pas d'activité accrue vis-à-vis de l'ester de naphthyle.* L'hydrolyse des fonctions ester éthyliques du malathion constitue une voie de détoxification de ce pesticide. Chez *Anopheles albimanus* (Hemingway, 1982) et chez *Anopheles arabiensis* (Hemingway, 1985), la résistance est inhibée par l'utilisation du triphényle de phosphate et s'accompagne d'une diminution de l'activité des estérases vis-à-vis de l'acétate de naphthyle.

En ce qui concerne *Anopheles stephensi* (Scott, Georghiou, 1986), *Culex tarsalis* (Ziegler *et al.*, 1987) et *Culex quinquefasciatus* (Malcolm, Boddington, 1989), des estérases dégradent spécifiquement le malathion tant chez les souches sensibles que chez les souches résistantes, avec une affinité similaire vis-à-vis de l'acétate de naphthyle. De plus, chez *Musca*

domestica l'augmentation de l'hydrolyse du pesticide est corrélée à une diminution de l'hydrolyse de l'acétate de naphthyle (Oppenoorth, 1985). Ce mécanisme de résistance spécifique au malathion a aussi été mis en évidence chez *Tribolium castaneum* (Dyte, Rowlands, 1968), *Plodia interpunctella* (Beeman, Schmidt, 1982) et *Lucilia cuprina* (Parker *et al.*, 1991). Il s'agirait de carboxylestérases qui peuvent cliver rapidement le malathion, et présentent des propriétés physiques et cinétiques altérées, avec des modifications d'affinité vis-à-vis de l'acétate de naphthyle et de susceptibilité vis-à-vis des synergistes.

Modification des cibles

Plus de 90 % des insecticides de synthèse sont des organophosphorés, des carbamates et des pyréthri-noïdes, avec des sites d'action localisés dans le système nerveux. Parmi les cibles moléculaires, les trois plus importantes sont : le canal sodium "voltage-dépendant" (C_{svd}), l'acétylcholinestérase (AChE) et le récepteur de l'acide gamma aminobutyrique (GABA_R).

Le canal sodium "voltage-dépendant" (C_{svd}). Les pyréthri-noïdes et le DDT provoquent chez l'insecte un effet "knock down" (kd). L'arthropode présente des mouvements non coordonnés et entre ensuite en ataxie plus ou moins réversible suivant l'insecticide et la dose utilisée. L'effet kd représente la traduction symptomatologique de la sensibilité du système nerveux de l'insecte vis-à-vis du pesticide. D'un point de vue moléculaire, de nombreuses données montrent que l'effet kd est dû à la fixation des pyréthri-noïdes ou du DDT sur le C_{svd}. Cette protéine est située sur la membrane plasmique des cellules nerveuses. Elle change de conformation lorsqu'elle est soumise à une variation de potentiel de membrane. La conformation induite donne à la protéine une structure en forme de pore à travers lequel s'engouffrent les ions sodium. Ce phénomène est à l'origine de la phase ascendante des potentiels d'action. Les données pharmacologiques indiquent que le DDT et les pyréthri-noïdes se fixent sur l'un des six sites d'action où s'ancrent les substances neurotoxiques, empêchant la fermeture du canal et perturbant la transmission synaptique (Lombet *et al.*, 1988).

La résistance au kd est la forme la plus anciennement connue de résistance à l'égard du DDT et des pyréthri-noïdes. La première description de cette résistance a été faite chez une souche de mouche domestique (Milani, Travaglini, 1957). Cette diminution de la sensibilité du système nerveux de la mouche domestique est liée à un gène récessif nommé *kdr* situé sur le chromosome 3 (Tsukamoto *et al.*, 1965). Ce type de résistance a été établi chez d'autres insectes dont : *Culex quinquefasciatus* (Priester, Georghiou, 1980),

Anopheles stephensi (Omer *et al.*, 1980), *Culex pipiens* (Plapp, Hoyer, 1968), *Blattella germanica* (Scott, Matsumura, 1981 ; Dong, 1997), *Drosophila melanogaster* (Amichot *et al.*, 1993), *Heliothis virescens* (Park *et al.*, 1997), *Haematobia irritans* (Guerero *et al.*, 1997).

La résistance croisée vis-à-vis du DDT et des pyréthriinoïdes due au gène *kdr* est responsable de la rapidité avec laquelle certaines souches d'insectes ont développé des résistances aux pyréthriinoïdes. Le gène *kdr* bien qu'ayant pratiquement disparu au Danemark après l'abandon du DDT en 1952, a été resélectionné en quelques mois par les pyréthriinoïdes (Keiding, 1977).

Les études effectuées sur *M. domestica* attribuent la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT à une diminution de l'affinité des insecticides pour les C₅vd, liée à une modification structurale de la protéine. Une souche de *D. melanogaster* résistante à la deltaméthrine montre que le facteur *kdr* est lié au chromosome 2 sur lequel est localisé un gène codant pour un C₅vd (Amichot *et al.*, 1992).

L'acétylcholinestérase (AChE). La protéine la mieux connue en tant que cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase. Cette enzyme est indispensable au bon fonctionnement des synapses cholinergiques. Chez les insectes, elle se trouve essentiellement dans le système nerveux central. L'influx nerveux arrivant dans la terminaison pré-synaptique entraîne une libération d'acétylcholine (ACh) qui se fixe sur des récepteurs placés sur la membrane post-synaptique. Cette fixation permet l'ouverture des canaux sodium et potassium, laquelle entraîne la dépolarisation à l'origine de l'influx nerveux sur l'élément post-synaptique. Le rôle de l'acétylcholinestérase est d'hydrolyser l'acétylcholine ce qui permet la fermeture des canaux associés au récepteur du neurotransmetteur. Si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post-synaptique se trouve continuellement excitée. Les organophosphorés et les carbamates agissent en inhibant l'activité catalytique de l'AChE. Ils se fixent en effet sur le site actif de l'enzyme, à la place de l'acétylcholine. L'accumulation de l'ACh dans la région synaptique provoque une hyperexcitation des liaisons cholinergiques causant finalement la mort de l'insecte.

Chez certains insectes comme *Culex pipiens*, de fortes concentrations d'organophosphorés et de carbamates, avoisinant parfois même la limite de solubilité, n'inhibent plus l'AChE (Raymond *et al.*, 1985). Chez les acariens, on a trouvé une résistance au diazoxon associée à une modification de l'acétylcholinestérase (Smitsaert, 1964). Ce mécanisme a été également identifié chez d'autres acariens et insectes : *Musca domestica* (Tripathi, O'Brien, 1973), *Spodoptera littoralis* (Zaazou *et al.*, 1973), *Anopheles albimanus*

(Ayad, Georghiou, 1975), *Drosophila melanogaster* (Fournier *et al.*, 1992a), *Tetranychus kanzawai* (Kuwahara *et al.*, 1982), *Nephotettix cincticeps* (Hama, Iwata, 1971), *Culex pipiens* (Raymond *et al.*, 1985), *Culex pipiens* (Bourguet *et al.*, 1997), *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu, Clark, 1993) et *Rhyzopertha dominica* (Guedes *et al.*, 1997).

Les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA_r). Les GABA_r sont les cibles de nombreux insecticides organohalogénés, dont la dieldrine et le lindane. Ces insecticides se fixent au récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique et inhibent le fonctionnement du canal chlore qui lui est associé. L'ouverture de ce canal induit une hyperpolarisation de la membrane nerveuse et son inactivation, lorsqu'elle se prolonge, perturbe l'ensemble du fonctionnement du système nerveux.

La résistance à la dieldrine a été mise en évidence chez *Musca domestica*, *Aedes aegypti* et *Periplaneta americana* mais aussi chez *Lucilia cuprina* (Hughes, Mc Kenzie, 1987). Ce type de résistance est bien conservé entre les invertébrés et le poisson mouche *Gambusia affinis* (Yarborough *et al.*, 1986). De plus, il présente une résistance croisée avec le picrotoxine, alcaloïde antagoniste des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique au niveau des canaux chlorure (Deng *et al.*, 1991).

Les résultats pharmacologiques ont ensuite permis de montrer que la résistance à la dieldrine est associée à une modification de l'affinité de l'insecticide vis-à-vis du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique, notamment chez *Tribolium castaneum* et *Drosophila melanogaster* (French-Constant *et al.*, 1993).

Autres cibles. De nouveaux insecticides, naturels ou synthétiques, sont constamment testés. Quels qu'ils soient, nous pouvons déjà prévoir que nous serons confrontés à des phénomènes de résistance. Il existe déjà des souches de drosophiles qui résistent au parasitisme par encapsulation effectué par des micro-hyménoptères. Les larves de *Spodoptera exigua* peuvent devenir insensibles aux inhibiteurs de protéinases présents dans les feuilles de tabac génétiquement modifié (Jongsma *et al.*, 1995). Or, l'utilisation de parasitoïdes et de plantes génétiquement transformées sont des voies explorées pour trouver des alternatives à la méthode de lutte chimique.

Un autre exemple bien documenté de résistance aux biopesticides concerne les toxines protéiques produites par *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus sphaericus*. Ces toxines se fixent sur des récepteurs spécifiques du tube digestif de lépidoptères. Ceci a pour effet d'induire la destruction de ce tissu entraînant ainsi la mort de l'insecte. Si l'on sélectionne des insectes pour leur résistance envers une ou

plusieurs toxines bactériennes, on obtient une souche résistante vis-à-vis de *B. sphaericus* et *B. thuringiensis* ; la résistance est associée à une réduction de l'affinité du récepteur de type aminopeptidase au niveau du tube digestif (Van Rie *et al.*, 1990). Ce phénomène, bien qu'observé en laboratoire, n'a pas encore été rencontré dans des conditions naturelles. Ceci est probablement dû au fait que les traitements par épandage de bactéries produisent un mélange de toxines. Il en sera probablement autrement lorsque l'on travaillera avec une seule toxine, comme dans le cas des plantes transgéniques produisant une seule de ces toxines.

Les bases moléculaires de la résistance aux insecticides

La biologie moléculaire a permis de mettre en évidence deux mécanismes responsables des phénomènes observés.

Surproduction de protéines. Chez *Culex pipiens* et *Myzus persicae*, la production élevée d'estérase détoxifiant les insecticides est liée à une amplification génique. Chez *Myzus persicae*, le gène d'une estérase (E4), détoxifiant les organophosphorés et les carbamates, est présent à raison de 12 copies dans le génome (Field *et al.*, 1996). Une souche de *Culex quinquefasciatus* résistante aux organophosphorés (facteur de résistance de 800X) possède jusqu'à 250 copies d'un gène codant pour une estérase appelée "Estérase B1" (Mouchès *et al.*, 1990).

La résistance liée aux cytochromes P-450 peut aussi être due à une surproduction d'une ou plusieurs P450. Ce phénomène a été clairement identifié dans des souches de mouche (Feyereisen *et al.*, 1989 ; Cariño *et al.*, 1994), de drosophile (Waters *et al.*, 1992 ; Brun *et al.*, 1996) ou de *Heliothis virescens* et de *Helicoverpa armigera* (Pittendrigh *et al.*, 1997) résistantes à différents insecticides. Dans ce cas, il s'agit probablement d'un facteur de régulation agissant en trans qui est altéré. La combinaison de sa surexpression avec la présence de mutations ponctuelles conduirait à l'existence de drosophiles capables de survivre sur du DDT cristallisé (Brun *et al.*, 1996). La disponibilité de plusieurs séquences codant pour des cytochromes P-450 d'insectes pourrait accélérer les recherches sur la structure, la diversité et la régulation des cytochromes P-450 et permettre la compréhension des mécanismes moléculaires en cause (Waters *et al.*, 1992 ; Tomita, Scott, 1995).

En ce qui concerne les glutathion S-transférases, les données disponibles, chez la mouche domestique, laissent penser qu'il s'agirait d'un mécanisme voisin de celui des cytochromes P-450 à savoir une surexpression de GST sans amplification génique et un

accroissement de l'activité spécifique d'une ou plusieurs GST, lié à une insertion de nucléotides causant l'addition d'acides aminés au niveau de la protéine (Fournier *et al.*, 1992b ; Franciosa, Bergé, 1995).

Mutations ponctuelles. Une ou plusieurs mutations ponctuelles peuvent modifier l'activité d'une enzyme de façon à ce qu'elle métabolise mieux les insecticides. Cette possibilité est très probable pour les P450s et les GSTs ; son existence a été démontrée pour les estérases.

L'hypothèse de la mutation au niveau des estérases avait été émise pour expliquer que certaines souches de *Musca domestica* étaient devenues résistantes aux organophosphorés (Oppenoorth, Van Asperen, 1960). L'enzyme mutée aurait perdu une partie de son activité vis-à-vis de l'ester de naphtyle et dégraderait préférentiellement l'insecticide. Les travaux effectués sur *Lucilia cuprina* et *Culex tarsalis* semblent confirmer cette théorie (Whyard *et al.*, 1994a ; 1994b). Une carboxylestérase dégradant spécifiquement le malathion (MCE) a été purifiée à partir d'une souche résistante de *Lucilia cuprina*. L'activité catalytique élevée vis-à-vis du malathion suggère une modification qualitative de cette enzyme ; en effet, la MCE dégrade cet insecticide mille fois plus rapidement que les estérases de *Myzus persicae* hydrolysant les organophosphorés. Les propriétés cinétiques de l'enzyme chez la souche sensible et la souche résistante n'ont cependant pas été directement comparées. Une MCE purifiée à la fois chez la souche sensible et chez la souche résistante de *Tribolium castaneum* possède une affinité plus élevée pour le malathion et une moins bonne affinité à l'égard de l'ester de naphtyle, chez la souche résistante que chez la souche sensible.

Bien entendu, si une mutation peut rendre une enzyme capable de dégrader un insecticide, le même type de modification peut diminuer la sensibilité d'une cible envers un insecticide. Celle-ci dépend de la structure du site de liaison, elle-même fonction de la séquence en acides aminés de la protéine.

Le séquençage du gène codant pour le C₅vd révèle deux substitutions (d'une leucine en phénylalanine et d'une méthionine en thréonine) chez plusieurs souches résistantes de type super-*kdr* chez *Musca domestica*, induisant la perte d'une charge négative qui serait responsable de la diminution de la toxicité du pyréthrinoloïde à l'égard de cette souche (Williamson *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été observés chez une souche de drosophile résistante à la delta-méthrine (Amichot *et al.*, 1992). La résistance serait liée chez l'insecte à la présence d'une ou plusieurs mutations ponctuelles, entraînant un changement d'un ou de plusieurs acides aminés. Au niveau du gène codant pour le C₅vd, on a pu identifier une mutation

d'une leucine en histidine chez *Heliothis virescens* (Park *et al.*, 1997) et d'une leucine en phénylalanine chez *Blattella germanica* (Dong, 1997) et chez *Haematobia irritans* (Guerrero *et al.*, 1997).

Dans le cas de l'acétylcholinestérase, les mutations affecteraient la structure de l'enzyme de telle sorte que l'accès au site catalytique est rendu plus difficile pour l'insecticide. Ainsi, chez la drosophile, la résistance au malathion provient d'une mutation ponctuelle où la phénylalanine en position 368 est remplacée par la tyrosine (Fournier, Mutero, 1994). Quant à la résistance élevée aux organosphosphorés chez *Drosophila melanogaster*, elle implique plusieurs mutations (Fournier *et al.*, 1992a). Ce phénomène moléculaire peut être également observé pour la résistance à l'égard d'insecticide ayant le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique pour cible. La comparaison des séquences du gène du récepteur codant pour les allèles issus de souches sensibles ou résistantes à la dieldrine a montré que les substitutions d'une alanine en glycine ou en sérine constituent les seules différences entre une souche sensible ou résistante (ffrench-Constant *et al.*, 1993). Les mesures électrophysiologiques montrent d'une part, que le GABA_A muté *in vitro* présente la même pharmacologie que celle du GABA_A obtenu à partir d'une souche résistante et d'autre part, qu'il est insensible à la dieldrine. Lorsqu'on considère des résistances de niveau élevé par modification du GABA_A, c'est toujours la même mutation qui induit la résistance, quel que soit l'insecte: *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica*, *Aedes aegypti*, *Tribolium castaneum* (ffrench-Constant, 1994 ; Thompson *et al.*, 1993).

LA RÉSISTANCE AUX INSECTICIDES ET SES PERSPECTIVES

Les pesticides utilisés contre les arthropodes constituent un groupe majeur d'intrants de l'agriculture moderne. Leur utilisation intensive contre les ravageurs a été à la base de la sélection d'individus capables de survivre et de se reproduire en présence de pesticides. Les conséquences de ce phénomène sont désastreuses pour les utilisateurs qui se trouvent souvent démunis devant le développement de ces populations d'insectes résistants. Au niveau de l'industrie phytosanitaire, ce phénomène a conduit à plus ou moins long terme à la disparition de familles entières de pesticides. Au niveau de l'environnement, l'augmentation des doses appliquées et la diversification non contrôlée des insecticides utilisés sont à la base de contaminations importantes des sols et des nappes aquifères.

En combinant la gestion raisonnée de la résistance aux insecticides (Insecticide Resistance Management ou IRM) et l'utilisation de nouveaux pesticides ou de substances non biocides possédant des modes d'action différents de ceux couramment employés, on devrait

permettre de retarder l'apparition et la dispersion des gènes de résistance. Une gestion adéquate ne peut se réaliser que si l'on connaît bien les facteurs biotiques et abiotiques influençant l'évolution et la dispersion des gènes de résistance dans les populations naturelles. La mise au point de tests déterminant l'activité des enzymes impliquées ou le dosage des protéines et des ARN messagers correspondants avec des sondes immunologiques et/ou nucléiques, devrait permettre, dans la plupart des cas, d'identifier les allèles de chaque gène de résistance chez chacun des individus échantillonnés. En conditions naturelles, l'utilisation de ces tests permettra de déterminer si l'augmentation de résistance au sein d'une population est due à une modification de la fréquence d'un gène particulier ou à l'apparition d'un nouveau gène.

Une des motivations de la lutte biologique est de limiter le développement de la résistance aux insecticides. Souvent, lors d'une application d'insecticides, les insectes auxiliaires (micro-hyménoptères, coccinelles, syrphes,...) sont éliminés en même temps que les insectes ravageurs. Dans un premier temps, une sélection d'insectes auxiliaires a permis d'obtenir des souches résistantes à certains insecticides, notamment avec des acariciens (Phytoseiidae) prédateurs de *Tetranychus urticae* (Avella *et al.*, 1985). Mais les résultats obtenus, quoique décevants, stimuleront les expériences de transformation d'insectes auxiliaires au moyen de gènes de résistance déjà clonés. Des drosophiles sensibles aux insecticides peuvent être transformées par injection d'allèles résistants des gènes de l'AChE (Fournier, Mutero, 1994). Le progrès dans ce domaine dépend toutefois de l'identification de vecteurs permettant de transformer d'autres insectes.

Les connaissances dans le domaine des systèmes enzymatiques de biotransformation impliqués dans la résistance aux insecticides peuvent être également utilisées dans le domaine de l'écotoxicologie. Le concept de biosurveillance, basé sur la réponse biologique des organismes aux polluants, est en plein essor. Les marqueurs biologiques, ou biomarqueurs, chez les animaux et les plantes, jouant le rôle de "sentinelles", constituent une nouvelle approche pour évaluer les effets d'une contamination de l'environnement sur les écosystèmes et sur la santé humaine (Lafaurie, 1995). C'est une véritable "toxicologie de l'environnement" qui se développe. La connaissance des symptômes permet de diagnostiquer l'impact du polluant. L'exposition des organismes aux polluants peut modifier la synthèse de certaines familles de protéines (métallothionéines, enzymes de biotransformation, protéines de stress), altérer l'intégrité de l'ADN, perturber la fonctionnalité de systèmes moléculaires clés de la physiologie des organismes, créer des dommages cellulaires, etc.

Les enzymes de biotransformation des substances xénobiotiques (P-450, GST et estérases) sont inducibles ou inhibées par ces composés organiques qui pénètrent à l'intérieur des organismes. On peut utiliser cette propriété pour savoir si un organisme a été exposé à des xénobiotiques comme les hydrocarbures polycycliques (PAHs), le polychlorobenzène (PCB) ou des pesticides. Cette méthode est en cours de développement surtout sur poissons d'eau douce et marins ; elle est également à l'étude sur nématodes, ce qui pourrait pallier ainsi le manque d'animaux modèles capables d'être utilisés comme espèces "sentinelles" du sol.

Remerciements.

Les auteurs tiennent à remercier Messieurs G. Berben, JC. Gilson, B. Staquet et C. Wonville pour leur aide dans la réalisation de ce manuscrit.

Bibliographie

- Amichot M., Castella C., Cuany A., Berge JB., Pauron D. (1992). Target modification as a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **44**, p. 189-190.
- Amichot M., Castella C., Bergé JB., Pauron D. (1993). Transcriptions analysis of para gene by *in situ* hybridization and immunological characterization of its expression product in wild-type and mutant strains of *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, p. 381-390.
- Avella M., Fournier D., Pralavorio M., Bergé JB. (1985). Sélection pour la résistance à la deltaméthrine d'une souche de *Phytoseiulus persimilis*. *Agronomie* **5**, p. 177-180
- Ayad H., Georghiou GP. (1975). Resistance to organophosphate and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *J. Econ. Entomol.* **68**, p. 295-297.
- Beeman RW., Schmidt BA. (1982). Biochemical and genetic aspects of malathion-specific resistance in the Indian meal Moth. *J. Econ. Entomol.* **75**, p. 945-949.
- Benezet HJ., Forgash AJ. (1972). Reduction of malathion penetration in houseflies pretreated with silicic acid. *J. Econ. Entomol.* **65**, p. 895-896.
- Bourguet D., Raymond M., Berrada S., Fournier D. (1997). Interaction between acetylcholinesterase and choline acetyltransferase - a hypothesis to explain unusual toxicological responses. *Pestic. Sci.* **51**, p. 276-282.
- Brodgon WG., Mcallister JC., Vulule J. (1997). Heme peroxydase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **13**, p. 233-237.
- Bull DL., Whitten CJ. (1972). Factors influencing organophosphorus insecticide resistance in tobacco budworms. *J. Org. Food Chem.* **20**, p. 561-564.
- Brun A., Cuany A., Le Mouel T., Bergé JB., Amichot M. (1996). Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P-450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, p. 697-703.
- Cariño FA., Koener JF., Plapp FW., Feyereisen R. (1994). Constitutive overexpression of the cytochrome P-450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, p. 411-418.
- Chaudry MQ. (1997). A review of mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. *Pestic. Sci.* **49**, p. 213-219.
- Cohen E. (1982). Studies on several microsomal enzymes in two strains of the flour beetle. *Comp. Biochem. Physiol.* **71b**, p. 123-126.
- Davidson G. (1953). Experiments on the effect of residual insecticides in houses against *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Bull. Entomol. Res.* **44**, p. 231-245.
- Deng Y., Palmer CJ., Casida JE. (1991). House fly brain GABA receptors: target for multiple classes of insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, p. 60-65.
- Devonshire AL., Moore GD. (1982). A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamates and pyrethroid resistance in peach-potato aphids. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**, p. 235-246.
- Dong K. (1997). A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in german cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, p. 93-100.
- El Bashir S., Oppenoorth FJ. (1969). Microsomal oxidations of organophosphate insecticides in some resistant strain of houseflies. *Nature* **223**, p. 210.
- Feyereisen R., Koenen JF, Farnsworth DE, Nebert DN (1989). Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1465-1469.
- Field LM., Devonshire AL., Tylersmith C. (1996). Analysis of amplicons containing the esterase genes responsible for insecticide in *Myzus persicae*. *Biochem. J.* **313**, p. 543-547.
- Fisher CW., Mayer RT. (1984). Partial purification and characterization of phenobarbital-induced housefly cytochrome P-450. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **1**, p. 127-138.
- Fournier D., Bride JM., Hoffmann F., Karch F. (1992a). Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.* **267**, p. 14270-14274.
- Fournier D., Bride JM., Poirie M., Bergé JB., Plapp FW. (1992b). Insect glutathione S-transferases: biochemical characterization of the major forms from houseflies

- susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* **267**, p. 1840–1845.
- Fournier D., Mutero A. (1994). Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.* **108 c**, p. 19–31.
- French-Constant RH. (1994). The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, p. 335–345.
- French-Constant RH., Streichen JC., Rocheleau TA., Aronstein K., Roush RT. (1993). A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, p. 1957–1961.
- Franciosa H., Bergé JB. (1995). Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and GST-2 families. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, p. 311–317.
- Fukami J., Shishido T. (1966). Nature of a soluble, glutathione-dependent enzyme system active in cleavage of methyl parathion to desmethyl parathion. *J. Econ. Entomol.* **59**, p. 1338–1349.
- Georghiou GP. (1990). Overview of Insecticide Resistance. *In* Georghiou GP. *Managing resistance to agrochemicals from fundamental research to practical strategies*. Washington: American Chemical Society, ACS Symposium Series **421**, p. 18–41.
- Guedes RNC., Kambhampati S., Dover BA., Zhu KY. (1997). Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* populations from the United States and Brazil. *Bull. Entomol. Res.* **87**, p. 581–586.
- Guerrero FD., Jamroz RC., Kammlah D., Kunz SE. (1997). Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*, identification of *kdr* and super-*kdr* point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, p. 745–755.
- Hama H., Iwata T. (1971). Studies on the inheritance of carbamate resistance in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. Relationships between insensitivity of acetylcholinesterase and cross-resistance to carbamate and organophosphate insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* **13**, p. 190–202.
- Hammock BD. (1985). Regulation of juvenile hormone titer: degradation. *In* Kerkut GA., Gilbert LI. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Oxford UK: Pergamon **12**, p. 431–472.
- Hemingway J. (1982). The biochemical nature of malathion resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**, p. 149–155.
- Hemingway J. (1985). Malathion carboxylesterase enzymes in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**, p. 309–313.
- Hemingway J., Penilla RP., Rodriguez AD., James BM., Edge W., Rogers H., Rodriguez MH. (1997). Resistance management strategies in malaria vector mosquito control – a large scale field trial in Southern Mexico. *Pestic. Sci.* **51**, p. 375–382.
- Hughes PB., Mc Kenzie JA. (1987). Insecticide resistance in *Lucilia cuprina*: speculation, science and strategies. *In* Devonshire AL. *Combating resistance to xenobiotics: Biological and chemical approaches*. Chichester, UK: Horwood p. 162–177
- Jongsma MA., Bakker PL., Peters J., Bosch D., Stiekema WJ. (1995). Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, p. 8041–8045.
- Keiding J. (1977). Resistance in the housefly in Denmark and elsewhere. *In* Watson DL., Brown AWA. *Pesticide management and insecticide resistance*. New York: Academic Press, p. 261–302.
- Kojima K., Ishizuka T., Kitakata S. (1963). Mechanism of resistance to malathion in the green rice leafhopper. *Botyu-Kagaku* **28**, p. 17–25.
- Kuhr RJ. (1971). Comparative metabolism of carbaryl by resistant and susceptible strains of the cabbage looper. *J. Econ. Entomol.* **64**, p. 1373–1378.
- Kuwahara M., Miyata T., Saito T., Eto M. (1982). Activity and substrate specificity of the esterase associated with organophosphorus insecticide resistance in the Kanzawa spider mite *Tetranychus kanzawai*. *Appl. Entomol. Zool.* **17**, p. 82–91.
- Lafaurie M. (1995). La PCR au service de l'environnement. *Biofutur* **142**, p. 22–26.
- Lagadic L., Cuany A., Berge JB., Echaubard M. (1993). Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from insecticide resistant and lindane induced susceptible *Spodoptera littoralis* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, p. 467–474.
- Lee KS., Walker CH., McCaffery A., Ahmad M., Little E. (1989). Metabolism of trans-Cypermethrin by *Heliothis armigera* and *H. virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **34**, p. 49–57.
- Lewis JB. (1969). Detoxification of diazinon by subcellular fractions of diazinon resistant and susceptible houseflies. *Nature* **224**, p. 917–918.
- Lockwood JA., Sparks TC., Story RN. (1984). Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behaviour. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **30**, p. 41–51.
- Lombet A., Mourre C., Ladzunski M. (1988). Interactions of insecticides of pyrethroid family with specific binding sites on the voltage-dependent sodium channel from mammalian brain. *Brain Res.* **459**, p. 44–48.
- Malcolm CA., Boddington RG. (1989). Malathion resistance conferred by a carboxylesterase in *Anopheles culicifacies* GILES (species B). *Bull. Entomol. Res.* **79**, p. 193–199.
- Matsumura F. (1983). Penetration, binding and target insensitivity as causes of resistance to chlorinated hydrocarbon insecticides. *In* Georghiou GP., Saito T.

- Pest resistance to pesticides: challenges and prospects.* New York: Plenum Press, p. 367–386.
- Milani R., Travaglino A. (1957). Ricerche genetiche sulla resistenza al DDT in *Musca domestica* concatenazione del gene *kdr* (knockdown-resistance) con due mutanti morfologici. *Riv. Parasitol.* **18**, p. 199–202.
- Moldenke AF., Vincent DR., Farnsworth DE., Ferriere LC. (1984). Cytochrome P-450 in insects. 4. Reconstitution of cytochrome P-450-dependent monooxygenase activity in the housefly. *Pestic. Biochem. Physiol.* **21**, p. 358–367.
- Motoyama N., Dauterman WC. (1972). In vivo metabolism of azinphosmethyl in susceptible and resistant houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2**, p. 113–122.
- Mouchès C., Pasteur N., Bergé JB., Hyrien O., Raymond M., Vincent BRS., Silvestri M., Georghiou GP. (1986). Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science* **233**, p. 778–782.
- Mouchès C., Pauplin Y., Agarwal M., Lemieux L., Herzog M., Abadon M., Beyssat-Arwonty V., Hyrien O., de Saint-Vincent BR., Georghiou GP., Pasteur N. (1990). Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, p. 2574–2578.
- Nicholson SA., Sawicki RM. (1980). Genetic and biochemical studies of resistance to permethrin in a pyrethroid-resistant strain of the housefly (*Musca domestica* L.). *Pestic. Sci.* **13**, p. 357–366.
- Omer SM., Georghiou GP., Irving SN. (1980). DDT/pyrethroid resistance inter-relationships in *Anopheles stephensi*. *Mosq. News* **40**, p. 200–209.
- Oppenoorth FJ. (1965). Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* **10**, p. 185–206.
- Oppenoorth FJ. (1985). Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In Kerkut GA., Gilbert LI. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Oxford, UK: Pergamon **12**, p. 731–733.
- Oppenoorth FJ., Van Asperen K. (1960). Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science* **132**, p. 298–299.
- Ozaki K. (1969). The resistance to organophosphorus insecticides of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* and the smaller brown plant hopper *Laodelphax striatellus*. *Rev. Plant Prot. Res.* **2**, p. 1–15.
- Ozaki K., Kasai T. (1970). Biochemical genetics of malathion resistance in the smaller brown plant hopper (*Laodelphax striatellus*). *Entomol. Exp. Appl.* **13**, p. 162–172.
- Park Y., Taylor MFJ., Fyereisen R. (1997). A valine421 to methionine in IS6 of the HSCP voltage-gated sodium channel associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **239**, p. 688–691.
- Parker AG., Russell RJ., Delves AC., Oakeshott JG. (1991). Biochemistry and physiology of esterases in organophosphate-susceptible and-resistant strains of the Australian Sheep Blowfly, *Lucilia cuprina*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, p. 305–318.
- Patil VL., Guthrie FE. (1979). Cuticular lipids of two resistant and a susceptible strains of houseflies. *Pestic. Sci.* **10**, p. 399–406.
- Pimprikar GD., Georghiou GP. (1979). Mechanisms of resistance to diflubenzuron in the house fly. *Pestic. Biochem. Physiol.* **12**, p. 10–22.
- Pittendrigh B., Aronstein K., Zinkovsky E., Andreev O., Campbell B., Daly J., Trowell S., French-Constant RH. (1997). Cytochrome P-450 genes from *Helicoverpa armigera*: expression in a pyrethroid-susceptible and-resistant strain. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, p. 507–512.
- Plapp FW., Hoyer RF. (1968). Possible pleiotropism of a gene conferring resistance to DDT, DDT analogs and pyrethrins in the housefly and *Culex tarsalis*. *J. Econ. Entomol.* **61**, p. 761–765.
- Prabhakaran SK., Kamble ST. (1996). Biochemical characterization and purification of esterases from three strains of german cockroach, *Blattella germanica*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **31**, p. 73–86.
- Prahbaker N., Georghiou GP., Pasteur N. (1987). Genetic association between highly active esterases and organophosphate resistance in *Culex tarsalis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **3**, p. 473–475.
- Priester TM., Georghiou GP. (1980). Cross-resistance spectrum in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Pest. Sci.* **11**, p. 617–624.
- Raymond M., Fournier D., Bergé JB., Cuany A., Bride JM., Pasteur N. (1985). Single-mosquito test to determine genotypes with an acetylcholinesterase insensitive to inhibition to propoxur insecticide. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1**, p. 425–427.
- Reddy GF., Rose HA., Viseton S., Murray M. (1990). Increased glutathione transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **36**, p. 269–276.
- Rose HA., Wallbank BE. (1988). Mixed-function oxidase and glutathione-transferase activity in a susceptible fenitrothion-resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis*. *J. Econ. Entomol.* **70**, p. 896–899.
- Sawicki RM., Farnham AW. (1968). Examination of the isolated autosomes of the SKA strain of houseflies for resistance to several insecticide with and without pretreatment with sesamex and TBTP. *Bull. Entomol. Res.* **59**, p. 409.
- Scott JG. (1996). Cytochrome P-450 monooxygenase-mediated resistance to insecticides. *J. Pestic. Sci.* **21**, p. 241–245.
- Scott JG., Matsumura F. (1981). Characteristic of a DDT induced case of cross-resistance to permethrin in *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**, p. 21–27.

- Scott JG., Georghiou GP. (1986). Malathion specific resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, p. 29–32.
- Scott JG., Lee ST. (1993). Tissue distribution of microsomal cytochrome P-450 monooxygenases and their inducibility by phenobarbital in the insecticide resistant LPR strain of house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, p. 729–738.
- Shrivastata SP., Georghiou GP., Metcalf RL., Fukuto TR. (1970). Carbamate resistance in mosquitoes: the metabolism of propoxur by susceptible and resistant larvae of *Culex pipiens fatigans*. *Bull. World Health Organ.* 42, p. 931–942.
- Smissaert HR. (1964). Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science* 143, p. 129–131.
- Sparks JC., Lockwood JA., Byford RL., Graves JB., Leonard BR. (1989). The role of behaviour in insecticide resistance. *Pestic. Sci.* 26, p. 383–399.
- Stone BF., Brown AWA. (1969). Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens*. *Bull. Organ. Mond. Santé* 40, p. 401–408.
- Tanaka K. (1981). The mechanism of resistance to lindane and hexadecylated lindane in third Yumenoshima strain of houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16, p. 149–157.
- Thompson M., Steichen JC., French-Constant RH. (1993). Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. *Insect Mol. Biol.* 2, p. 149–154.
- Tomita T., Scott JG. (1995). cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for a cytochrome P-450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, p. 275–283.
- Tripathi RK., O'Brien RD. (1973). Insensitivity of acetylcholinesterase as a factor in resistance of houseflies to the organophosphate Rabon. *Pest. Biochem. Physiol.* 6, p. 30–34.
- Tsukamoto M., Narahashi T., Yamasaki T. (1965). Genetic control of low nerve sensitivity to DDT in insecticide-resistant houseflies. *Botyu-Kagaku* 30, p. 128–132.
- Tsukamoto M., Casida JE. (1967). Metabolism of methylcarbamate insecticides by the NADPH₂ requiring system from houseflies. *Nature* 213, p. 49–51.
- Usui T., Yoshida M., Honda A., Beppu T., Horinouchi S. (1995). A K-252A-resistance gene, SKS1 (+) encodes a protein similar to *Caenorhabditis elegans* F37 A4.5 gene product and confers multidrug resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 161, p. 93–96.
- Van Rie J., Mc Faughey WH., Johnson DE., Barnett BD., Van Mellaert D. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247, p. 72–74.
- Walter CM., Price NR. (1989). The uptake and penetration of pirimiphos-methyl into susceptible and resistant strains of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94c, p. 419–423.
- Waters LC., Zelfhof AC., Shaw BJ., Chang LY. (1992). Possible involvement of a long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P-450 gene in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, p. 22–27.
- Whyard S., Downe AER., Walker VK. (1994a). Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, p. 819–827.
- Whyard S., Russell RJ., Walker VK. (1994b). Insecticide resistance and malathion carboxylesterase in *Lucilia cuprina*. *Biochem. Genet.* 32, p. 9–24.
- Williamson MS., Martinez-Torres D., Dick CA., Devonshire AL. (1996). Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*Kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252, p. 51–60.
- Wu CT., Budding M., Griffin MS., Croop J. (1991). Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologs. *Mol. Cell Biol.* 11, p. 3940–3948.
- Yarbrough JD., Roush RT., Bonner JC., Wise DA. (1986). Monogenic inheritance of cyclodiene insecticide resistance in mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Experientia* 42, p. 851–853.
- Zaazou MH., Ali AM., Abdallah MD., Riskallah MR. (1973). In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase and aliesterase in susceptible and resistant strains of *Spodoptera littoralis*. *Bull. Entomol. Soc. Egypt. Econ.* 7, p. 25–30.
- Zhu KY., Clark M. (1993). Purification and characterization of acetylcholinesterase from *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, p. 245–251.
- Ziegler R., Whyard S., Downe AER., Wyatt GR., Walker VK. (1987). General esterase, malathion carboxylesterase and malathion resistance in *Culex tarsalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28, p. 213–225.