

- Peek K et Gabbott PA** (1990). Seasonal cycle of lysosomal enzyme activities in the mantle tissue and isolated cells from the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **104** : 403-412.
- Pellerin-Massicotte J** (1994). Oxidative processes as indicators of chemical stress in bivalves. *J. Aquat. Ecosys. Health*, **3** : 101-111.
- Pellerin-Massicotte J, Vincent B et Pellerin E** (1993). Évaluation écotoxicologique de la qualité de la baie des Anglais (Québec). *Wat. Poll. Res. J. Can.*, **28** : 665-689.
- Philip B, Kurup PA** (1977). Cortisol and lysosomal stability in normal and atherosclerotic rats. *Atherosclerosis*, **27** : 129-139.
- Pipe RK** (1987). Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage-cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **96** : 519-528.
- Porta R, Niada R, Pescador R et al.** (1986). Gastroprotection and lysosomal membrane stabilization by suliglicotide. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **36** : 1079-1082.
- Regoli F** (1992). Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **84** : 63-69.
- Ricciutti MA** (1972). Myocardial lysosome stability in the early stages of acute ischemic injury. *Am. J. Cardiol.*, **30** : 492-497.
- Stauber WT, Canonico PG, Milanesi AA et Bird JWC** (1975). Lysosomal enzymes in aquatic species IV. *Comp. Biochem. Physiol.*, **50B** : 379-384.
- Tremblay R** (1992). *Variabilité à court terme de paramètres physiologiques chez Mya arenaria*. Mémoire de maîtrise présenté à l'Université du Québec à Rimouski.
- Tremblay R, Pellerin-Massicotte J** (1996). Effect of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **117A** : 99-104.
- Waldron-Edward D, Greenberg L** (1980). Lysosomal stability and mucosal resistance to injury. *Int. Congress Ser.*, **537** : 87-100.
- Warrier SBK, Ninjoor V, Sawant PL et al.** (1972). Differential release of latent lysosomal hydrolases in muscle of *Tilapia mosambica* by whole body gamma irradiation. *J. Biochem. Biophys.*, **9** : 278-279.
- Wilson JS, Korsten MA, Apte MV et al.** (1990). Both ethanol consumption and protein deficiency increase the fragility of pancreatic lysosomes. *J. Lab. Clin. Med.*, **115** : 749-755.
- Wilson JS, Apte MV, Thomas MC et al.** (1992). Effects of ethanol, acetaldehyde and cholesteryl esters on pancreatic lysosomes. *Gut*, **33** : 1099-1104.

BASES MOLÉCULAIRES, GÉNÉTIQUES ET POPULATIONNELLES DE LA RÉSISTANCE DES INSECTES AUX INSECTICIDES

M. AMICHOT, J.-B. BERGÉ, A. CUANY, N. PASTEUR, D. PAURON ET M. RAYMOND

Introduction

Tous les organismes vivants sont soumis, en permanence, à des stress qui peuvent être de nature physique, chimique ou biologique. Nombre d'entre eux sont d'origine « naturelle » (toxines alimentaires, etc.) ; d'autres sont dus aux activités humaines (industrie, agriculture, etc.). L'adaptation à ces stress est une condition nécessaire à la pérennité des espèces vivantes et la résistance qui est une adaptation héréditaire, en est l'une des conséquences (Sawicki et Denholm, 1984).

Ce chapitre traitera spécifiquement de la résistance des invertébrés, des insectes en particulier, aux insecticides. À l'heure actuelle, il est difficile de savoir si les gènes de résistance préexistent aux traitements ou s'ils sont le fruit de modifications génomiques (mutations), mais il est clair que leur sélection par les insecticides modifie profondément les caractéristiques génétiques des populations. La majorité des individus qui, avant le début des traitements, ont des allèles de sensibilité, sont remplacés, après quelques cycles de traitements, par des individus ayant des allèles de résistance. En ce sens, la résistance est une manifestation écotoxicologique de l'utilisation des pesticides. Peut-elle, pour autant, être utilisée comme biomarqueur ? Classiquement, la résistance est considérée comme un biomarqueur de sensibilité individuelle, traquant une réduction de la capacité des individus à répondre à l'exposition à des toxiques (Koeman *et al.*, 1993 ; Timbrell *et al.*, 1994). Les résultats expérimentaux qui seront présentés et discutés dans ce chapitre montrent, qu'à condition de la considérer comme une variable qui intégrerait « l'histoire toxicologique » de la population, la résistance peut être utilisée comme un biomarqueur d'effet à long terme d'expositions des populations naturelles à des toxiques dans leur environnement.

Les nombreuses recherches sur les mécanismes biochimiques de la résistance et sur les gènes qui les contrôlent [voir les ouvrages de Green *et al.* (1990), Roush et Tabashnik (1990) et Mullin et Scott (1992), et les synthèses de Poirié et Pasteur (1991) et Bergé *et al.* (1996)] sont à l'origine d'une grande partie des connaissances biochimiques et moléculaires sur les systèmes enzymatiques ou protéiques affectés par l'exposition aux pesticides : induction des enzymes de biotransformation (Terrerre, 1983, 1984 ; Cohen, 1986 ; Capua *et al.*, 1991 ; Lagadic, 1991 ; Lagadic *et al.*, 1993 ; Scott *et al.*, 1996 ; Amichot *et al.*, soumis) et inhibition d'enzymes-cibles (Yamamoto *et al.*, 1983 ; Devonshire et Moores, 1984 ; Raymond *et al.*, 1985 ; Hall et Spierer, 1986 ; Fournier *et al.*, 1993). Ces systèmes interagissent directement avec les xénobiotiques et la plupart présentent l'avantage de pouvoir être caractérisés au niveau individuel (Pasteur et Georghiou, 1989 ; Dary *et al.*, 1990, 1991 ; De Sousa *et al.*, 1995), ce qui constitue une condition essentielle pour qu'ils puissent être utilisés en tant que biomarqueurs de la présence, actuelle ou passée, de toxiques.

1. Les mécanismes biochimiques et génétiques de la résistance des insectes aux insecticides

Il y a plusieurs types de mécanismes de résistance des insectes aux insecticides. La résistance comportementale est très mal connue (Sparks *et al.*, 1989), mais mériterait certainement d'être mieux étudiée dans le cadre de la caractérisation de biomarqueurs d'exposition. Les mécanismes de résistance les plus fréquents sont d'origine « physiologique » et surtout « biochimique » (figure 1). Ils résultent d'une modification de la cible moléculaire des insecticides et/ou d'une augmentation de l'efficacité des systèmes protéiques impliqués dans la détoxification de ces produits (Brown, 1990 ; Soderlund et Bloomquist, 1990 ; Poirié et Pasteur, 1991 ; Bergé *et al.*, 1996).

1.1 Les cibles des insecticides

Les insecticides peuvent être classés en fonction de la cible protéique sur laquelle ils agissent. La très grande majorité d'entre eux perturbent le fonctionnement du système nerveux (figure 2). Organophosphorés et carbamates sont des anticholinestérasiques ; ils agissent en inhibant l'activité de l'AChE (Bocquené *et al.*, 1997) qui est une enzyme essentielle à la transmission du message nerveux dans les synapses cholinergiques localisées dans le système nerveux central. Les pyréthrinoides et certains organohalogénés comme le DDT agissent sur les canaux sodiques voltage dépendants ou CNV (Narahashi, 1986 ; Sattelle et Yamamoto, 1988 ; Soderlund et Bloomquist, 1989 ; Narahashi *et al.*, 1992 ; Bloomquist, 1993) dont l'intégrité fonctionnelle est indispensable à la dépolarisation des membranes nerveuses lors du passage du potentiel d'action. Les pyréthrinoides retardent la fermeture de ce canal et perturbent le fonctionnement de l'ensemble du système nerveux. La dernière classe d'insecticides dont le mode d'action est convenablement connu est celle des organohalogénés de type dieldrine. Ces molécules se lient au récepteur au GABA (GABA_A) et inhibent le fonctionnement du canal chlore qui lui est associé (Eidefrawi et Eidefrawi, 1988 ;

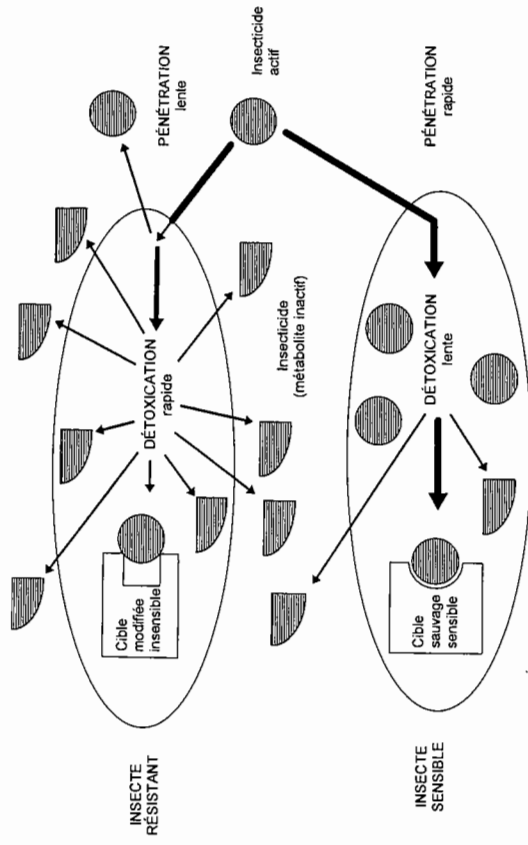


Figure 1 ■ Les différents mécanismes physiologiques et biochimiques de résistance des insectes aux insecticides : pénétration ralentie de l'insecticide dans l'insecte, détoxification par accroissement de la métabolisation de l'insecticide, et modification de la cible moléculaire des insecticides.

Lunt *et al.*, 1988 ; Sattelle, 1990 ; French-Constant *et al.*, 1991 ; Lee *et al.*, 1993). 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 sensibilité des cibles est fonction de leur affinité pour le pesticide ; elle dépend de la structure du site de liaison, elle-même fonction de la séquence en acides aminés de la protéine. Ceci explique pourquoi la (ou les) mutation(s) ponctuelle(s) qui diminue(nt) l'affinité de l'insecticide pour la protéine-cible se traduira par son « insensibilisation » vis-à-vis du toxique et par la résistance de l'animal qui porte cette cible mutée. Ainsi, par exemple, une mutation transformant une sérine en alanine est responsable de la résistance du GABA_A à la dieldrine chez tous les insectes diptères ou coléoptères étudiés à ce jour (French-Constant *et al.*, 1993a, 1994). De même, les AChE_s deviennent fortement résistantes quand plusieurs mutations, présentes en même temps, modifient la structure de la protéine (Muter *et al.*, 1994). La forte résistance du canal sodique aux pyréthrinoides et au DDT est également associée à un faible nombre de mutations (Taylor *et al.*, 1993 ; Williamson *et al.*, 1996) bien que dans certains cas de résistance faible, des mutations atypiques aient été identifiées (Amichot *et al.*, 1992).

Du fait que leur fonction peut être perturbée suite à l'interaction avec des insecticides, les cibles de ces molécules peuvent servir de biomarqueurs de la contamination

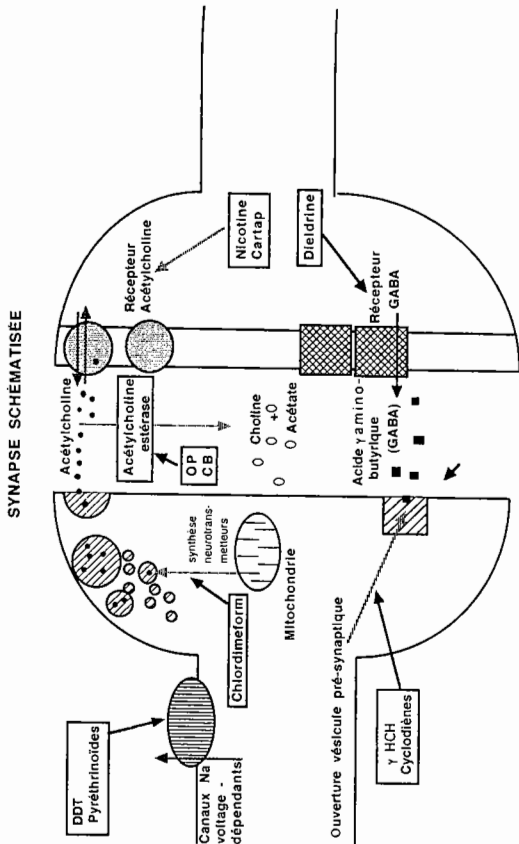


Figure 2 ■ Principaux modes d'action des insecticides actuellement utilisés sur des protéines-cibles dont la majorité se trouve au niveau des synapses du système nerveux. Les organophosphorés (OP) et carbamates (CB) agissent en inhibant l'activité de l'acétylcholinestérase. Les pyréthrinoides et le DDT agissent en maintenant ouvert le canal sodium voltage-dépendant. La dieldrine agit en empêchant l'ouverture du canal chlore associé au récepteur GABA. Le carptap et la nicotine agissent sur les récepteurs de l'acétylcholine. Le γ -HCH (lindane) et les cyclodienes agiraient sur l'ouverture de vésicules présynaptiques qui libèrent des neurotransmetteurs dans l'espace intersynaptique.

actuelle ou passée des organismes. L'étude des modifications fonctionnelles des cibles est relativement facile à mettre en œuvre quand la cible est une enzyme dont l'activité ou l'inhibition peut être mesurée. Dans le cas de l'AChE, par exemple, c'est l'inhibition qui est utilisée pour mettre en évidence une exposition à des substances anticholinestériques (Bocquené *et al.*, 1997). De tels paramètres, dont la réponse à l'exposition est rapide, voire même instantanée, sont surtout utilisés dans le milieu aquatique, sur poissons et mollusques lamellibranchés notamment (Bocquené *et al.*, 1997 ; voir Chapitre 6). Cependant, cette approche ne présente un intérêt que si la sensibilité des AChEs vis-à-vis des pesticides est connue. Des tests permettant de mesurer les caractéristiques d'inhibition des AChEs ont été mis au point chez les insectes (essentiellement pour des raisons agronomiques) dans le cadre de la détection des AChEs résistants. Ils pourraient être appliqués dans le domaine des tests écotoxicologiques (Byrne et Devonshire, 1991), afin de mettre en évidence les effets d'éventuelles expositions passées à des xénobiotiques, sans qu'il soit toutefois toujours possible d'identifier avec certitude la nature des produits à l'origine de la résistance de l'AChE.

La mesure de l'altération du fonctionnement des canaux ioniques est plus délicate car elle nécessite l'utilisation de techniques électrophysiologiques. Toutefois, si la (ou

les) mutation(s) responsable(s) de la résistance correspond(ent) à un site d'action d'enzyme de restriction de l'ADN, la résistance peut être détectée par des techniques RFLP relativement simples. C'est par exemple le cas, chez de nombreux insectes résistants, pour le récepteur GABA qui peut alors être considéré comme un biomarqueur potentiel (French-Constant *et al.*, 1993a ; Bloomquist, 1994 ; Cousteau et French-Constant, 1995).

1.2 Les enzymes de détoxification

Toute molécule qui pénètre dans un organisme, qu'il soit sensible ou résistant, se lie à des protéines et subit des transformations métaboliques. Les insecticides ne dérogent pas à cette règle. De nombreuses enzymes participent à la détoxification des insecticides, mais en ce qui concerne la résistance, trois types d'enzymes sont essentielles : les estérases, les glutathion *S*-transférases et les monooxygénases à cytochrome P450 (tableau 1). Le challenge posé à la recherche ces dix dernières années a été de comprendre pourquoi ces activités sont plus élevées chez les insectes résistants.

1.2.1 Les estérases

Les molécules des principales familles d'insecticides (organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides) portent au moins une fonction ester, indispensable à l'expression

Tableau 1 ■ Caractéristiques des principales enzymes de biotransformation connues pour intervenir dans la résistance des insectes aux insecticides.

| Enzyme | Abréviation | Réaction catalysée | Mécanisme de résistance | Exemples |
|----------------------------------|-------------|--|-------------------------|---|
| Estérases | EST | Hydrolyse de l'insecticide | Non | Résistance spécifique au malathion de <i>Tribolium castaneum</i> et de <i>Lucilia cuprina</i> |
| | | Piégeage des insecticides | Oui | Estérases A2, A4, A5, B1, B2, B4, B5 et B7 de moustiques |
| Monooxygénases à cytochrome P450 | MFO | Oxydation | Oui | Estérases E4 et FE4 de pucerons |
| Glutathion transférases | GST | Conjugaison de l'insecticide au glutathion | Oui | Estérase A1 de <i>Culex</i> |
| | | | Non | Résistance de la drosophile et de la mouche domestique |
| | | | Non | Résistance de la drosophile et de la mouche domestique |
| | | | Non | Résistance de la drosophile et de la mouche domestique |

sion de leur toxicité. Il existe deux types d'estérases impliquées dans le métabolisme des insecticides. Les premières hydrolysent des liaisons esters carboxyliques. Par exemple, le malathion contient deux liaisons esters éthyliques qui sont hydrolysées par une malathion-carboxylestérase (ou MCE) qui libère une ou deux fonction(s) carboxylique(s) dont la charge négative empêche la molécule de se positionner sur le site anionique de l'AcChE également chargé négativement. Certains insectes résistent au malathion grâce à une augmentation de l'activité de la MCE. La purification de cette estérase chez le coléoptère *Tribolium castaneum* a permis de montrer que la différence entre individus sensibles et résistants est due à une augmentation de son activité spécifique dont l'origine est probablement liée à une ou plusieurs mutations ponctuelles modifiant la séquence des acides aminés de l'enzyme (Haubrugge, 1995).

Le second type d'estérases est caractérisé par une forte activité vis-à-vis de substrats chromogènes (naphthylacétate par exemple) chez les individus résistants, alors que cette activité est très faible chez les animaux sensibles. En fait, chez le puceron (Devonshire et Moores, 1982) et le moustique (Fournier *et al.*, 1987; Mouchès *et al.*, 1987), l'augmentation d'activité est due à une surproduction des protéines présentant l'activité naphthylacétate-hydrolase, elle-même due, dans la majorité des cas, à une amplification des gènes de structure correspondant (Mouchès *et al.*, 1986; Field *et al.*, 1988; Devonshire et Field, 1991). Cette amplification peut atteindre des valeurs importantes : certaines souches résistantes de moustique ont 250 fois plus d'ADN codant pour ces estérases que les souches sensibles (Mouchès *et al.*, 1987). Chez les moustiques, il y a au moins deux loci (*est*) qui codent pour ces protéines responsables de la résistance aux organophosphorés. Le locus *est-3* produit les EST-A, alors que le locus *est-2* donne les EST-B. Chacun des loci présente plusieurs formes alléliques qui peuvent être différenciées par électrophorèse (EST-A1, EST-A2, etc.; EST-B1, EST-B2, etc.). Les insectes résistants sont souvent caractérisés par l'association de la surproduction d'allèles particuliers de deux loci (par exemple : EST-A2 est surproduit avec EST-B2, EST-A4 avec EST-B4, etc.). Dans ce cas, les gènes codant pour les deux types d'estérases sont coamplifiés (Rooker *et al.*, 1996). L'activité catalytique de ces estérases vis-à-vis des insecticides est relativement faible ; par contre, elles les fixent efficacement (Cuany *et al.*, 1993) jouant ainsi le rôle de protéines-pièges. Dans ces conditions, il est logique que les individus possédant une quantité importante d'estérases-pièges présentent un niveau de résistance élevé. Théoriquement, le niveau de résistance est corrélé au degré de surproduction de la protéine-piège, lui-même dépendant du niveau d'amplification du gène qui la code.

1.2.2 Les monoxygénases à cytochrome P450

Les monoxygénases à cytochrome P450 correspondent à un système enzymatique polyprotéique qui comprend le cytochrome P450 et des protéines de transfert d'électrons (la réductase du P450, un cytochrome b5 et sa réductase). Le P450 contient le site sur lequel se fixe le substrat ; il est donc responsable de la spécificité de substrat et du type de transformation qu'il va subir. Dans la plupart des cas, il est aussi l'élément limitant de la vitesse de réaction. Les monoxygénases à P450 sont présentes dans tous les organismes, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères supé-

rieurs, en passant par les plantes et les invertébrés. Elles peuvent métaboliser la plupart des substrats organiques. Certains de ces substrats sont d'origine endogène (hormones stéroïdiennes, acides gras, ...); d'autres sont des xénobiotiques (pesticides, toxines alimentaires, ...) (Estabrook, 1996). Ce manque de spécificité n'est qu'apparent car il existe, dans chaque organisme, un nombre élevé d'isoformes de P450. Près de 500 gènes codant pour des P450 ont en effet été séquencés (Nelson *et al.*, 1996). Cette grande diversité a nécessité la mise en place d'une nomenclature générale des P450, basée sur les homologues de séquences existant entre les protéines de cette superfamille appelée CYP (Cytochrome P450). Lorsque deux P450 ont plus de 40 % d'homologie, ils appartiennent à la même famille désignée par un chiffre arabe. Si l'homologie est supérieure à 60 %, les P450 appartiennent à la même sous-famille désignée par une lettre majuscule. Si l'homologue est supérieure à 80 %, il s'agit de gènes considérés comme identiques, à nouveau désignés par un chiffre arabe. Ainsi, CYP1A1 est la première protéine de P450 séquencée dans la sous-famille A et dans la famille 1. L'ADN codant pour les P450 est désigné par le même système mais en italique (le gène *CYP1A1* code pour la protéine CYP1A1). Le premier P450 d'insecte a été cloné chez la mouche domestique (Feyereisen *et al.*, 1989). Depuis, plusieurs autres ADN ont été isolés dans plusieurs familles. L'une d'elles, la famille CYP4, est relativement ubiquiste et comprend de nombreux gènes (Snyder et Davidson, 1983; Bradford *et al.*, 1991; Gandhi *et al.*, 1992; Frolov et Alatorsev, 1994; Amichot *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1994; Dunkov *et al.*, 1996). D'autres familles, comme CYP6 (Feyereisen *et al.*, 1989; Berebaum *et al.*, 1992; Carriño *et al.*, 1992, 1994; Waters *et al.*, 1992; Cohen et Feyereisen, 1995; Hung *et al.*, 1995; Maitra *et al.*, 1995; Tomita *et al.*, 1995; Xiao-Ping et Hobbs, 1995; Scott *et al.*, 1996), CYP9 (Hodgson *et al.*, 1995; Dunkov *et al.*, 1996) et CYP18 (Dunkov *et al.*, 1996), sont plus spécifiques des insectes.

Le système enzymatique à cytochrome P450 est essentiel pour l'adaptation des organismes aux variations, qu'elles soient « naturelles » ou liées à des activités humaines, de leur environnement. Ainsi, par exemple, certains insectes sont capables de se nourrir de plantes naturellement toxiques pour d'autres insectes parce qu'ils possèdent des P450 capables de dégrader les substances toxiques (phytoalexines notamment) synthétisées par les plantes pour se défendre contre ce type d'agression (Cohen *et al.*, 1989; Lee et Berenbaum, 1989). Les P450 sont souvent comparés aux composants des systèmes immunitaires du fait que, comme ces derniers, ils présentent une grande variabilité et sont impliqués dans des réactions de défense. Cette comparaison est d'autant plus valable que la biosynthèse de nombreux P450 est induite par la présence des molécules qu'ils métabolisent : c'est le phénomène d'induction (Ahmad *et al.*, 1986; Yu, 1986; Brattsten, 1988; Mullin, 1988; Snyder *et al.*, 1993).

Les connaissances sur l'induction des P450 chez les invertébrés sont moins importantes que celles acquises chez les vertébrés. En ce qui concerne les insectes, en particulier la drosophile, de nombreuses molécules sont connues pour induire une augmentation transitoire d'activités enzymatiques liées aux P450 : EROD, ECOD, hydroxylations de différents sites de la testostérone, etc. (Amichot *et al.*, soumis). Alors que chez les vertébrés, une augmentation d'activité vis-à-vis de certains de ces

substrats peut être attribuée spécifiquement à un P450 donné (ainsi, par exemple, l'activité EROD est représentative du CYP1A1), chez les invertébrés, de telles relations n'ont pas pu être clairement établies. Pour connaître la teneur spécifique en un P450, il faut utiliser des mesures immunologiques (*western blot*) ou de quantification de la teneur en ARN messagers (ARNm) (*northern blot*). Nous avons ainsi pu montrer que, chez la drosophile, certains produits comme le phénobarbital sont des inducteurs « généraux », provoquant la synthèse des ARNm de P450 de type CYP6A et CYP4, alors que d'autres, comme le prochloraz, sont plus spécifiques (Amichot *et al.*, 1994 ; Brun *et al.*, 1996). À l'heure actuelle, nous possédons des anticorps pour doser, chez la drosophile, le CYP6A et des sondes d'acides nucléiques pour doser les ARNm correspondant à de nombreux gènes des sous-familles CYP6A et CYP4D. Nous développons actuellement d'autres sondes pour être en mesure de doser un nombre plus important de P450 et permettre, à terme, la définition plus précise de la nature de leurs inducteurs.

En plus du phénomène d'induction, qui est une adaptation « instantanée » des organismes pour survivre à un xénobiotique toxique (Brattsten, 1988), certains individus présentent des génotypes adaptés de façon permanente à la présence de toxiques : c'est le phénomène de résistance qui existe chez tous les organismes (résistance des plantes aux herbicides, résistance des champignons aux fongicides, résistance des insectes aux insecticides, etc.) (Ford *et al.*, 1987). Dans la majorité des cas, la résistance des insectes aux insecticides liée à l'intervention des P450 se manifeste par une augmentation constitutive de la teneur en enzyme et par une modification de l'activité spécifique de l'enzyme vis-à-vis des insecticides (Brun, 1996 ; Scott, 1996). Dans la nature, les individus résistants aux insecticides par métabolisation P450-dépendante pourront être détectés par des méthodes qualitatives (analyse de l'activité spécifique) ou quantitatives (analyse de la teneur en CYP et/ou en ARNm spécifiques des P450).

Les P450 peuvent être utilisés comme biomarqueurs en raison de leur inducibilité et/ou du rôle qu'ils peuvent jouer dans la résistance aux pesticides (Lagadic *et al.*, 1994). L'utilisation de l'induction des P450 comme biomarqueur d'exposition à des polluants a été bien décrite chez de nombreux organismes, vertébrés et invertébrés (Monod, 1997, Narbonne et Michel, 1997 ; voir Chapitres 3 et 4). Le plus souvent, et en particulier dans le cas des invertébrés, le point limitant de l'utilisation de l'induction des P450 comme biomarqueur d'exposition à des toxiques est la méconnaissance des références et « points-zéro » car, à l'heure actuelle, trop peu d'informations sont disponibles sur les caractéristiques biologiques (polymorphisme enzymatique, niveau d'adaptation des systèmes de détoxication, etc.) des espèces chez lesquelles ce phénomène a pu être étudié. Ces connaissances sont pourtant fondamentales pour pouvoir utiliser une espèce comme espèce-sentinelle. Ainsi, par exemple, les P450 surexprimés constitutivement chez les insectes résistants aux insecticides n'étant plus inducibles, il semble évident que ces souches ne pourront être utilisées pour quantifier des biomarqueurs d'exposition de type P450. En revanche, lorsque la résistance est à l'origine d'une modification de l'activité spécifique du P450, ce dernier pourra éventuellement être utilisé en tant que biomarqueur de l'effet d'expositions répétées à des toxiques. Compte-tenu de la manière dont la résistance se développe (voir plus

loin), les activités P450-dépendantes des individus résistants peuvent restituer, comme nous l'avons évoqué au début de ce chapitre, une partie de « l'histoire toxicologique » de la population.

Dans un tel contexte, l'un des avantages à l'utilisation des invertébrés est la possibilité de pouvoir disposer de modèles de laboratoire aussi bien connus génétiquement que la drosophile (pour le milieu aérien) (Morton, 1993) ou que le nématode *Caenorhabditis elegans* (pour le milieu édaphique). Ces modèles pourront être utilisés soit sous forme de souches de laboratoire mises en situation sur le terrain au moyen d'un système de « caging » approprié, soit en recueillant les informations adéquates directement sur des populations autochtones car ces organismes sont relativement ubiquistes.

1.2.3 Les glutathion S-transférases

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent un autre type d'enzymes de biotransformation pouvant être impliquées dans la résistance des insectes aux insecticides (Clark, 1989, 1990 ; Vos et Van Bladeren, 1990 ; Yu, 1996). Malheureusement, peu d'éléments d'information sont actuellement acquis sur les mécanismes génétiques à l'origine de la résistance liée aux GSTs chez les insectes. Les quelques données disponibles chez la mouche domestique (Fournier *et al.*, 1992) laissent à penser qu'il s'agirait d'un mécanisme voisin de celui des P450, à savoir une augmentation de la quantité de GSTs sans amplification génique et un accroissement de l'activité d'une GST.

2. Les mécanismes populationnels de la dispersion des gènes de résistance aux insecticides

D'une manière générale, la résistance aux pesticides peut avoir des conséquences très importantes sur les équilibres écologiques. Dans le cas de la résistance chez les Arthropodes, un cas bien connu est celui des pullulations de ravageurs secondaires de certaines cultures, suite à l'apparition de résistance chez ces espèces mais pas chez leurs prédateurs naturels (Croft et Stricker 1983 ; Sawicki *et al.*, 1989). Toutefois, il existe peu d'études approfondies de ces phénomènes. L'une des voies de recherche actuelle concerne l'étude des conséquences de la résistance d'un insecte sur ses parasites, en particulier au travers des réponses immunologiques de l'hôte (Delpuech *et al.*, 1996).

2.1 Dynamique du développement de la résistance

Les recherches qui tentent d'identifier et de quantifier les facteurs qui influent sur la dynamique de la résistance dans les populations naturelles sont par contre plus développées. Phénoménologiquement, l'évolution spatiale de la résistance est toujours la même. La résistance apparaît dans une zone géographiquement limitée et, si

la pression de sélection est continue, elle s'étend peu à peu sur des zones de plus en plus vastes. Le facteur de résistance (FR), défini comme le rapport de la proportion d'individus résistants à celle des individus sensibles, augmente parallèlement à l'extension géographique de la résistance. Par exemple, le premier cas de résistance chez le moustique *Culex pipiens* dans le sud de la France a été identifié en 1972 près de Lunel dans l'Hérault. En 1978, les moustiques résistants étaient présents sur la zone côtière comprise entre la vallée du Rhône et la frontière espagnole, et le FR atteignait une valeur de 80. En 1992, la résistance avait envahi toute la côte française et existait également en Espagne, en Italie du Nord et en Corse ; le FR avait une valeur de 200.

2.2 Variabilité intra- et interspécifique

Tandis que certaines populations d'insectes-cibles développent rapidement des résistances à la très grande majorité des insecticides auxquels elles sont successivement exposées, de nombreuses autres populations de la même espèce ou d'espèces très proches demeurent relativement sensibles, bien qu'elles soient soumises à des rythmes de traitement similaires avec les mêmes produits (Roush et McKenzie, 1987). Les variations de la structure et de la taille des populations contribuent probablement à ces différences.

L'évolution de la résistance dépend en fait des interactions entre quatre facteurs :

- les mutations, qui sont à l'origine des allèles (ou gènes) de résistance ;
- les phénomènes de migration, qui permettent à ces gènes de se disperser hors de leur zone géographique d'origine ;
- la sélection, qui trie les gènes les mieux adaptés aux conditions environnementales ;
- la dérive génétique, qui est un phénomène aléatoire lié aux populations de faible effectif.

La nature des mutations à l'origine des allèles de résistance ayant été décrite dans la partie précédente, nous n'y reviendrons pas. Par contre, la question de leur fréquence se pose. Le cas de *C. pipiens* est l'un des mieux connus de ce point de vue, grâce à l'étude des estérases amplifiées dont la distribution géographique est très différente. Ainsi, les gènes coamplifiés *estA4* et *estB4*, ainsi que *estA5* et *estB5* n'existent qu'autour de la Méditerranée. Le gène amplifié *estB1* a une distribution relativement large : Amériques du Nord et du Sud, Caraïbes et Chine. Cependant, la plus grande distribution géographique reste celle des gènes coamplifiés *estA2* et *estB2* qui ont été trouvés dans pratiquement toute la zone de distribution de l'espèce. La variabilité de l'amplicon contenant ces gènes a été analysée chez des moustiques d'origines géographiques très variées, par deux méthodes indépendantes. Tout d'abord, les patrons de restriction de l'ADN s'hybridant avec un clone du gène *estB2* ont été étudiés avec 13 enzymes de restriction (Raymond *et al.*, 1991). Ensuite, un intron du gène *estA2* a été séquencé (Guillemaud *et al.*, 1996). Ces analyses n'ont révélé aucune variation, ni sur l'ADN codant, ni sur l'ADN non codant. Dans le premier cas, il pourrait s'agir d'une pression de sélection en faveur de la présence de ces estérases,

mais il est plus difficile d'utiliser le même argument pour l'ADN non codant qui n'est soumis à aucune pression de sélection connue. Malheureusement, jamais un haplotype non amplifié contenant les allèles codant *estA2* et *estB2* n'a été trouvé. La comparaison de ce résultat avec ceux obtenus chez des moustiques dont les estérases A et B ne sont pas amplifiées apporte cependant des informations intéressantes. Toutes les études (Qiao et Raymond, 1995 ; Guillemaud *et al.*, 1996) révèlent une très forte variabilité tant au niveau d'une localité qu'entre différentes régions. La probabilité pour que l'amplicon portant les gènes codant *estA2* et *estB2* ait été amplifié deux fois est inférieure à 10^{-10} . Il est donc probable que cette amplification s'est produite une seule fois, et que sa distribution mondiale actuelle est le résultat de la migration du gène. Dans le sud de la France, où les gènes de résistance sont cartographiés régulièrement depuis 1974, ces estérases sont apparues en 1986 près de Marseille (probablement à Marignane). En l'espace de huit ans, elles ont remonté la vallée du Rhône jusqu'à Lyon et se sont étendues vers l'Est et vers l'Ouest jusqu'à Montpellier (Rivet *et al.*, 1993). Ces résultats sont compatibles avec les études qui ont montré que les flux géniques sont très importants dans le sud de la France (Chevillon *et al.*, 1995). La migration passive associée aux activités humaines de transport maritime et aérien peut expliquer la présence de ces estérases sur des continents différents et dans des îles isolées (Pasteur *et al.*, 1995).

2.3 Gènes de résistance et facteurs de l'environnement

Il n'est plus à démontrer qu'en présence d'insecticides, les gènes de résistance sont sélectionnés et, peu à peu, augmentent en fréquence ; les échecs de traitements insecticides sont là pour en témoigner. Par contre, la nature des forces de sélection qui agissent sur ces gènes quand les traitements sont interrompus est encore très mal connue.

Le degré avec lequel des variations environnementales modifient l'expression phénotypique d'un génotype est connu sous le nom de plasticité phénotypique (Hoffmann et Parsons, 1991). Un génotype phénotypiquement plastique est considéré comme capable de maintenir des niveaux relativement élevés de *fitness* (= d'adaptabilité) dans diverses conditions environnementales. Cependant, d'une manière générale, les niveaux de plasticité phénotypique élevés sont associés avec de faibles niveaux de résistance au stress. Hoffmann et Parsons (1991) suggèrent que, si la plasticité de la réponse et la variation génétique en présence d'un stress sont sous la dépendance d'un même mécanisme, l'augmentation de la résistance au stress pourrait réduire le niveau de plasticité. Une augmentation de la tolérance au stress pourrait ainsi conduire à une diminution de *fitness* lors du retour à des conditions non stressantes. Il est en effet bien établi que les génotypes qui présentent un très bon *fitness* dans des conditions environnementales données peuvent souvent avoir un faible *fitness* dans des conditions différentes (Mueller *et al.*, 1991). Si la capacité d'une population à s'adapter à une modification de l'environnement nécessite une certaine variabilité génétique, la réduction de la variabilité génétique sous l'effet de polluants peut conduire à une augmentation de résistance à des polluants spécifiques, mais peut

aussi avoir pour conséquence de réduire la capacité de la population à supporter d'autres types de polluants ou des stress d'origine naturelle (French-Constant *et al.*, 1993b). L'évaluation de la sensibilité de chaque « phénotype » après exposition à des toxiques, couplée à la détermination des proportions relatives de chaque « phénotype » dans les populations naturelles exposées *in situ*, peut fournir des informations sur la façon dont les effets populationnels évoluent (Depledge, 1990).

Nos études chez le moustique *C. pipiens* sur un transect de 800 kilomètres, entre Valence (Espagne) et la frontière italienne, ont montré une forte homogénéité du polymorphisme de plusieurs gènes non sélectionnés par les insecticides (gènes neutres vis-à-vis de la sélection), ce qui montre que les échanges génétiques entre moustiques des différents points de cette zone sont très importants (Chevillon *et al.*, 1995). En d'autres termes, ces résultats indiquent que tout nouveau gène apparaissant en un endroit précis envahira très rapidement l'ensemble de la zone. Or, l'étude des gènes de résistance montre au contraire une très forte hétérogénéité : leur fréquence est extrêmement élevée dans les populations des régions traitées et beaucoup plus faible dans les régions non traitées. Cela suggère que, dans les régions non traitées, les gènes de résistance sont contre-sélectionnés. Des recherches sont en cours pour mesurer l'intensité de la contre-sélection agissant sur les gènes de résistance. Par exemple, l'étude des variations de la fréquence des gènes de résistance chez les femelles hibernantes se révèle particulièrement intéressante puisqu'au cours de l'hiver, il n'y a aucun traitement contre les moustiques. Il a ainsi été montré que, si la fréquence des gènes codant pour les estérases surproduites (*estA4/estB4*) ne subit aucune modification chez ces individus, celle du gène codant pour l'ACHé résistante passe de 25 % à 9 %, ce qui traduit une mortalité des porteurs de cet allèle d'environ 1 % par jour (Chevillon, 1994).

3. Signification écotoxicologique de la résistance

Dans un ouvrage traitant de l'utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie, la résistance des organismes aux pesticides peut *a priori* apparaître comme assez étrange au thème. Nous pensons au contraire que ce phénomène est l'une des premières manifestations écotoxicologiques « durables » de l'emploi des pesticides. En effet, la résistance aux polluants modifie de façon importante les génomes des organismes et les équilibres génétiques au sein d'isolats spécifiques dans les populations.

Au moins d'un point de vue théorique, l'évolution de la résistance est plus rapide dans les populations subdivisées, de petite taille, que dans les populations panmixtiques, de grande taille. Ceci est particulièrement vrai lorsque la résistance est liée à des caractères récessifs. Cependant, si l'immigration d'individus sensibles est importante, la fréquence de la résistance peut s'accroître plus lentement que pourrait le laisser supposer l'intensité des traitements pesticides (Tabashnik, 1990). En même temps que la taille de la population est réduite par l'impact des traitements, le nombre de gènes dans le pool génique de la population diminue. Des effets liés à la consanguinité peuvent apparaître lorsque la population devient homozygote pour des gènes

létaux récessifs (Maynard Smith, 1989). Un tel « effet fondateur », qui se produit lorsque la taille de la population se trouve considérablement réduite, peut accélérer la spéciation. Ceci pourrait expliquer pourquoi des peuplements composés d'espèces opportunistes ayant des caractéristiques génétiques convergentes se rencontrent dans des environnements fortement contaminés (Gray, 1989).

3.1 Résistance et fitness écologique

Les modifications du génome associées à la résistance peuvent être importantes, comme par exemple dans le cas de l'amplification génique des estérases. Avant traitement, les allèles de résistance, s'ils existent, sont « minoritaires » ; après traitement, ce sont les plus fréquents. Cette modification du génome peut concerner la sélection d'allèles, ce qui, *a priori*, ne doit pas perturber de façon sensible la physiologie de l'individu, encore que nous ayons montré que certains allèles pouvaient avoir un effet notable sur le *fitness* écologique de la population du fait du surcoût génétique qu'ils engendrent (Chevillon, 1994).

Les nombreuses études réalisées de ce point de vue (voir les synthèses de Roush et McKenzie, 1987 et Roush et Daly, 1990) ont fait apparaître des relations intéressantes entre la diminution du *fitness* et les mécanismes de résistance. Outre le fait que les désavantages les plus sérieux sont généralement associés avec la résistance liée aux estérases, probablement parce que ces enzymes représentent une proportion relativement importante de l'ensemble des protéines des individus résistants (Devonshire et Moores, 1982 ; Mouchès *et al.*, 1987), les souches résistantes de *Myzus persicae* pourraient être plus exposées à la prédation que les pucerons sensibles en raison d'une diminution de la réponse à la phéromone d'alarme (Dawson *et al.*, 1983). En revanche, la résistance ne semble pas affecter de façon importante le *fitness* lorsqu'elle est liée à une augmentation de l'activité des monoxygénases. Ainsi, l'efficacité reproductrice de souches résistantes de *Metaseiulus occidentalis* (Roush et Hoy, 1981 ; Roush et Plapp, 1982a), *Musca domestica* (Roush et Plapp, 1982b) ou *Helicoverpa armigera* (Daly *et al.*, 1988) n'est que peu ou pas affectée, confirmant le fait que l'intervention des monoxygénases microsomales n'engendre pas un coût énergétique important (Neal, 1987 ; Brattsten, 1988). De la même manière, peu ou pas de désavantages reproducteurs ont pu être mis en relation avec les mécanismes de type *kdr* chez *Musca domestica* et *Boophilus microplus*, avec les mécanismes d'altération de l'ACHé chez *Tetranychus urticae*, ou bien avec les MCE chez *Anopheles arabiensis* et *Tribolium castaneum* (Roush et Daly, 1990).

Il convient toutefois de noter que l'ensemble de ces observations proviennent d'études de laboratoire qui, même lorsqu'elles sont réalisées avec des souches résistantes directement issues du terrain, ne sont pas forcément représentatives des effets réels de la résistance sur le *fitness* des individus au sein des populations naturelles. Des déclin massifs de la fertilité, de la viabilité et d'autres composants du *fitness* peuvent se produire dans les populations naturelles dont la diversité génétique se trouve réduite à la suite de stress. Ce type d'effet pourrait, dans une certaine mesure, rendre compte de l'état de l'écosystème dans son ensemble (Rapport, 1989).

3.2 Perspectives

Les polluants chimiques présents dans l'environnement imposent une pression de sélection sur les organismes vivants et une telle sélection peut conduire à des modifications de la fréquence des génotypes au sein des populations et à une augmentation subséquente de la tolérance des populations dans leur ensemble (Forbes et Forbes, 1994).

Désormais, une meilleure prise en compte de la résistance dans le cadre de l'évaluation des effets écotoxicologiques des pesticides dépend de l'intensification des recherches d'une part sur l'effet des traitements pesticides sur les organismes non cibles et d'autre part sur les répercussions de la sélection d'individus résistants sur les caractéristiques des populations autres que les seules caractéristiques génétiques, voire sur les peuplements dont ces populations font partie. Le premier point sera bientôt une nécessité en ce qui concerne la faune auxiliaire en raison du renforcement de la réglementation relative à la mise sur le marché de nouveaux pesticides. Pour les autres organismes non cibles, il semble que seules les espèces présentant des particularités, liées notamment à leur facilité d'étude, aux connaissances déjà acquises sur leur écologie et leurs caractéristiques génétiques, ou bien encore au fait qu'elles sont caractéristiques de certains peuplements, pourront permettre des études plus approfondies. L'une des espèces de choix pour ces études est *D. melanogaster*, du fait de sa très large distribution géographique et surtout de l'état avancé des connaissances actuelles de son génome (Morton, 1993). Par ailleurs, le fait que les parasites de cette espèce soient bien étudiés l'identifie comme un excellent modèle pour analyser l'impact de la résistance sur les défenses immunitaires mises en place par les insectes pour se défendre contre les parasites, que nous avons évoqué précédemment. D'autres insectes, comme par exemple la mouche domestique (*Musca domestica*) ou des noctuelles du cotonnier (*Spodoptera* spp.), chez lesquels les phénomènes d'induction et de résistance sont également bien connus, peuvent constituer des modèles plus particulièrement adaptés à l'évaluation des risques écotoxicologiques en zones agricoles.

Les travaux sur la résistance des invertébrés aux pesticides ont permis de caractériser les systèmes protéiques impliqués dans les phénomènes d'intoxication et de détoxication. En particulier, ils ont montré la nécessité d'acquérir des connaissances précises sur ces systèmes afin d'élaborer des tests biochimiques fiables pour détecter la résistance ou pour les utiliser comme biomarqueurs. En effet, il ne suffit pas de constater qu'il existe une différence d'activité du système enzymatique considéré (AChE, P450, GST, ...) entre individus sensibles et résistants ou entre individus exposés ou non exposés pour discriminer entre ces phénotypes. Ainsi, par exemple, l'activité P450-dépendante sera la même chez un individu sensible après induction que chez un individu résistant jamais exposé à un inducteur (Lagadic et Cresteil, 1993 ; Amichot *et al.*, soumis) ; la même constatation a été effectuée pour la teneur en ARNin et en protéines spécifiques des P450 (Brun *et al.*, 1996). De même, si le modèle biologique possède des AChEs peu ou pas sensibles naturellement à un type de pesticide, aucun phénomène d'inhibition ne sera observé, même si ce pesticide est présent en concentration élevée dans l'environnement.

4. Conclusion

La résistance des insectes aux pesticides est la résultante d'un problème écotoxicologique. Compte-tenu de la façon dont elle se développe au sein des populations, la résistance peut être considérée comme un biomarqueur de l'effet à long terme des pesticides, offrant une image intégrée de l'histoire écotoxicologique d'un site donné. En outre, lorsqu'elles sont induites par les pesticides, les enzymes qui sont à la base de l'acquisition de cette résistance peuvent être utilisées comme des biomarqueurs traduisant l'effet instantané de l'exposition à des toxiques. Quel que soit le sens donné à la résistance en tant que biomarqueur, sa validité *in situ* dépendra des connaissances fondamentales acquises sur les répercussions de sa réponse au niveau populationnel.

Références bibliographiques

- Ahmad S, Brattsten LB, Mullin CA et Yu SJ (1986). Enzymes involved in the metabolism of plant allelochemicals. In : Brattsten LB, Ahmad S (eds), *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*. Plenum Press, New York, 73-151.
- Amichot M, Castella C, Cuany A *et al.* (1992). Target modification as a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 44 : 183-190.
- Amichot M, Brun A, Cuany A *et al.* (1994). Expression study of CYP genes in *Drosophila* strains resistant or sensitive to insecticides. In : Lechner MC (ed), *Cytochrome P-450. 8th. International Conference*. John Libbey Eurotext, Paris, 689-692.
- Amichot M, Brun A, Cuany A *et al.* (1996). Variations of microsomal activities in insecticide susceptible or resistant *Drosophila* strains using drugs and various xenobiotics as inducers and several diagnostic substrates. *Comp. Biochem. Physiol.* (soumis pour publication).
- Berenbaum MR, Cohen MB et Schuler MA (1992). Cytochrome P450 monoxygenase genes in oligophagous lepidoptera. In : Mullin CJ, Scott JG (eds), *Molecular Basis of Insecticide Resistance : Diversity Among Insects*. American Chemical Society Symposium Series 505, ACS, Washington DC, 114-124.
- Bergé JB, Chevillon C, Raymond M et Pasteur N (1996). Résistance des insectes aux insecticides : Mécanismes moléculaires et épidémiologie. *C.R. Soc. Biol.*, 190 : 445-454.
- Bloomquist JR (1993). Neuroreceptor mechanisms in pyrethroid mode of action and resistance. *Rev. Pestic. Toxicol.*, 2 : 185-230.
- Bloomquist JR (1994). Cyclo-diène résistance at the insect GABA receptor/chloride channel complex confers broad cross resistance to convulsants and experimental phenylpyrazole insecticides. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 26 : 69-79.
- Bocquené G, Galgani F et Walker CH (1997). Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. In : Lagadic L, Caquet Th, Amiard JC et Ramade F (eds), *Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, 209-239.
- Bradfield JY, Lee YH et Keeley LL (1991). Cytochrome P450 family 4 in a cockroach : Molecular cloning and regulation by hyper-trehalosemic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 4558-4562.
- Brattsten LB (1988). Potential role of plant allelochemicals in the development of insecticide resistance. In : Barbosa P, Letourneau DK (eds), *Novel Aspects of Insect-Plant Interactions*. John Wiley, New York, 313-348.
- Brown TM (1990). Biochemical and genetic mechanisms of insecticide resistance. In : M.B. Reen MB, Lebaron HM et Moberg WK (eds), *Managing Resistance to Agro-*

- chemicals. *From Fundamental Research to Practical Strategies*. American Chemical Society Symposium Series No. 421. ACS, Washington DC, 61-76.
- Brun A** (1996). *Étude de l'expression des cytochromes P450: Analyse de la résistance au DDT d'une souche de Drosophila melanogaster*. Thèse de l'Université de Nice.
- Brun A, Cuany A, Le Mouél T, Bergé JB et Amichot M** (1996). Inducibility of the Drosophila melanogaster cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **26**: 697-703.
- Byrne FJ, Devonshire AL** (1991). *In vivo* inhibition of esterase and acetylcholinesterase activities by profenofos treatments in the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Genn): Implications for routine biochemical monitoring of these enzymes. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **40**: 198-204.
- Capua S, Cohen E et Gerson U** (1991). Induction of aldrin epoxidation and glutathione S-transferase in the mite *Rhizoglyphus robini*. *Entomol. Exp. Appl.*, **59**: 43-50.
- Cariño F, Koener JF, Plapp FW Jr et Feyerisen R** (1992). Expression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in the house fly, *Musca domestica*. In: Mullin CJ, Scott JG (eds), *Molecular Basis of Insecticide Resistance: Diversity Among Insects*. American Chemical Society Symposium Series 505. ACS, Washington DC, 31-40.
- Cariño F, Koener JF, Plapp FW Jr et Feyerisen R** (1994). Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **24**: 411-418.
- Chevillon C, Pasteur N, Marquie M et al.** (1995). Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, **49**: 997-1007.
- Chevillon C** (1994). *Évolution de mécanismes adaptatifs: flux génétiques, sélection et contre-sélection. Cas de la résistance de Culex pipiens aux insecticides organophosphorés*. Thèse de l'Université de Montpellier II.
- Clark AG** (1989). The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**: 419-446.
- Clark AG** (1990). The glutathione S-transferases and resistance to insecticides. In: Hayes JD, Pickett CB et Mantle TJ (eds), *Glutathione S-transferases and Drug Resistance*. Taylor and Francis, London, 369-378.
- Cohen E** (1986). Glutathione-S-transferase activity and its induction in several strains of *Tribolium castaneum*. *Entomol. Exp. Appl.*, **41**: 39-44.
- Cohen MB, Berenbaum MR et Schuller MA** (1989). Induction of cytochrome P-450-mediated metabolism of xanthoxin in the black swallowtail. *J. Chem. Ecol.*, **15**: 2347-2355.
- Cohen MB, Feyerisen R** (1995). A cluster of cytochrome P450 genes of the CYP6 family in the housefly. *DNA Cell Biol.*, **14**: 73-82.
- Cousteau C, ffrench-Constant RH** (1995). Detection of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations by a single-stranded conformational polymorphism analysis. *Pestic. Sci.*, **43**: 267-271.
- Croft BA, Strickler K** (1983). Natural enemy resistance to pesticides: documentation, characterization, theory and applications. In: Georgiou GP, Saito T (eds), *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press, New York, 669-702.
- Cuany A, Handani J, Bergé JB et al.** (1993). Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **45**: 1-6.
- Daly JC, Fisk JH et Forrester NW** (1988). Selective mortality in field trials between strains of *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant and susceptible to pyrethroids: functional dominance of resistance and age class. *J. Econ. Entomol.*, **81**: 1000-1007.
- Dary O, Georgiou GP, Parsons E et Pasteur N** (1990). Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *J. Econ. Entomol.*, **83**: 2187-2192.
- Dary O, Georgiou GP, Parsons E et Pasteur N** (1991). Dot-blot test for identification of insecticide-resistant acetylcholinesterase in single insects. *J. Econ. Entomol.*, **84**: 28-33.
- Dawson GW, Griffiths DC, Pickett JA et Woodcock CM** (1983). Decreased response to alarm pheromone by insecticide-resistant aphids. *Naturwissenschaften*, **70**: 254-255.
- Delpuech JM, Frey F et Carton Y** (1996). Action of insecticides on the cellular immune reaction of *Drosophila melanogaster* against the parasitoid *Leptopilina bouleardi*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**: 2267-2271.
- Depledge MH** (1990). New approaches in ecotoxicology: Can inter-individual physiological variability be used as a tool to investigate pollution effects? *Ambio*, **19**: 251-252.
- De Sousa G, Cuany A, Amichot M et al.** (1995). A fluorometric method for measuring ECOD activity on individual abdomen of *Drosophila melanogaster*: Application to the study on resistance of insects to insecticides. *Anal. Biochem.*, **229**: 86-91.
- Devonshire AL, Field LM** (1991). Gene amplification and insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.*, **36**: 1-23.
- Devonshire A, Moores GD** (1982). A carbonyl esterase with a broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **18**: 235-246.
- Devonshire A, Moores GD** (1984). Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house flies (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **21**: 336-340.
- Dunkov B, Rodrigaiz-Arnaiz R, Pittendrigh B et al.** (1996). Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genetics*, **251**: 290-297.
- Eldefrawi ME, Eldefrawi AT** (1988). Action of toxicants on GABA_A and glutamate receptors. In: Lunt GG (ed), *Molecular Basis of Drug and Pesticide Action*. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), 207-221.
- Estabrook RW** (1996). The remarkable P450s: A historical overview of these versatile heme protein catalysts. *FASEB J.*, **10**: 202-204.
- Feyerisen R, Koener JF, Farnsworth DE et Nebert DW** (1989). Isolation and sequence of a cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **86**: 1465-1469.
- ffrench-Constant RH, Morlock DP, Shaffer CD et al.** (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 7209-7213.
- ffrench-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC et Chalmers AE** (1993a). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, **363**: 449-451.
- ffrench-Constant RH, Steichen JC et Ode PJ** (1993b). Cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* (Meigen) is associated with a temperature-sensitive phenotype. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **46**: 73-77.
- ffrench-Constant RH, Steichen JC et Brun LO** (1994). A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera; Scolitidae). *Bull. Ent. Res.*, **84**: 11-16.
- Field LM, Devonshire AL et Forde BG** (1988). Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.*, **251**: 309-312.
- Forbes VE, Forbes TL** (1994). *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Ecotoxicology Series 2. Chapman & Hall, London.
- Ford MG, Holloman DW, Khambay BPS et Sawicki RM** (1987). *Combating Resistance to Xenobiotics. Biological and Chemical Approaches*. Ellis Horwood Series in Biomedicine. Ellis Horwood Ltd, Chichester.
- Fournier D, Bride JM, Mouchès C et al.** (1987). Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* complex. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**: 211-217.
- Fournier D, Bride JM, Poinié M et al.** (1992). Insect glutathione-transferases. Biochemical characteristics of the major form from houseflies susceptible and resistant to insecticides.

- tant to insecticides. *J. Biol. Chem.*, **267** : 1840-1845.
- Fournier D, Mutero A, Pralavorio M et Bride JM** (1993). *Drosophila* acetylcholinesterase : mechanism of resistance to organophosphates. *Chem. Biol. Interactions*, **87** : 233-238.
- Frolov MV, Alatorse VE** (1994). Cluster of cytochrome P450 genes on the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *DNA Cell Biol.*, **13** : 663-668.
- Gandhi R, Varak E et Goldberg ML** (1992). Molecular analysis of cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *DNA Cell Biol.*, **11** : 394-404.
- Gray JS** (1989). Effects of environmental stress on species rich assemblages. *Biol. J. Linn. Soc.*, **37** : 19-32.
- Green MB, Lebaron HM et Moberg WK** (1990). *Managing Resistance to Agrochemicals. From Fundamental Research to Practical Strategies*. American Chemical Society Symposium Series No. 421. ACS, Washington DC.
- Guillemaud T, Rooker S, Pasteur N et Raymond N** (1996). Testing the unique amplification event and the worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. *Hereditas*, **77** : 535-543.
- Hall LMC, Spierer P** (1986). The *Ace* locus of *Drosophila melanogaster* : Structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.*, **5** : 2949-2954.
- Haubruge E** (1995). *Étude des phénomènes responsables de la résistance spécifique au malathion chez Tribolium castaneum HERBST (Col., Tenebrionidae)*. Thèse. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.
- Hodgson E, Rose RL, Thompson DM et al.** (1995). Expression of cytochrome P450 in insects. *9th Int. Conference on Cytochrome P450 : Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*. Zurich. Abstr. SL-32, p. 259.
- Hoffmann AA, Parsons PA** (1991). *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford Science Publications, Oxford.
- Hung CF, Harrison TL, Berenbaum MR et Schuler MA** (1995). CYP6B3, a second furanocoumarin-inducible cytochrome P450 expressed in *Papilio polyxenes*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25** : 149-160.
- Koeman JH, Köhler-Günther A, Kurelec et al.** (1993). Applications and objectives of biomarkers research. In : Peakall DB, Shugart LR (eds), *Biomarkers. Research and Application in the Assessment of Environmental Health*. NATO Advanced Science Institutes Series, Vol. H 68. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-13
- Lagadic L** (1991). *Induction, par le lindane, des enzymes de biotransformation chez Spodoptera littoralis (Boisd.) (Lepidoptera : Noctuidae) : Conséquences sur la toxicité et la métabolisation in vivo de la cyfluthrine*. Thèse Doctorat en Sciences, Université Paris XI, Orsay.
- Lagadic L, Cresteil T** (1993). Enhanced *in vitro* metabolism of testosterone by microsomes from insecticide-resistant *Spodoptera littoralis* larvae. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, **23** : 475-480.
- Lagadic L, Caquet Th et Ramade, F** (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, **3** : 193-208.
- Lagadic L, Cuany A, Bergé JB et Echautbard M** (1993). Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from insecticide-resistant and lindane-induced susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, **23** : 467-474.
- Lee HJ, Rocheteau T, Zhang HG et al.** (1993). Expression of a *Drosophila* GABA receptor in a baculovirus insect cell system - Functional expression of insecticide susceptible and resistant GABA receptors from the cyclodiene resistance gene rdl. *FEBS Lett.*, **335** : 315-318.
- Lee K, Berenbaum MR** (1989). Action of antioxidant enzymes and cytochrome P-450 monooxygenases in the cabbage looper in response to plant phototoxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **10** : 151-162.
- Lunt GG, Brown MCS, Riley K et Rutherford DM** (1988). The biochemical characterization of insect GABA receptors. In : Lunt GG (ed), *Molecular Basis of Drug and Pesticide Action*. Elsevier Science Publishers BV (Biochemical Division), 185-192.
- Maitra S, Dombrowski SM, Waters LC et Ganguly R** (1995). Isolation and characterization of new family genes and their expression in insecticide resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *3rd Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity, Woods Hole*. Abstr. II-4.
- Maynard Smith J** (1989). *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Monod G** (1997). L'induction du cytochrome P4501A1 chez les poissons. In : Lagadic L, Caquet Th, Amiard JC et Ramade F (eds), *Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, 33-54.
- Morton RA**, (1993). Evolution of *Drosophila* insecticide resistance. *Genome*, **36** : 1-7.
- Mouchès C, Pasteur N, Bergé JB et al.** (1986). Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, **233** : 778-780.
- Mouchès C, Magnin M, Bergé JB et al.** (1987). Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 2113-2116.
- Mueller LD, Guo P et Ayala FJ** (1991). Density-dependent natural selection and trade-offs in life history traits. *Science*, **253** : 433-435.
- Mullin CA** (1988). Adaptive relationships of epoxide hydrolase in herbivorous arthropods. *J. Chem. Ecol.*, **14** : 1867-1888.
- Mullin CJ, Scott JG** (1992). *Molecular Basis of Insecticide Resistance : Diversity Among Insects*. In : *American Chemical Society Symposium Series* 505. ACS, Washington DC, 114-124.
- Mutero A, Pralavorio M, Bride J-M et Fournier D** (1994). Resistance associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** : 5922-5926.
- Narahashi T** (1986). Mechanisms of action of pyrethroids on sodium and calcium channel gating. In : Ford MG, Lunt GG, Reay RC et Usherwood PNR (eds), *Neuropharmacology and Pesticide Action*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England, 36-60.
- Narahashi T, Frey JM, Ginsburg KS et Roy ML** (1992). Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicol. Lett.*, **64/65** : 429-436.
- Narbonne JF et Michel X** (1997). Systèmes de biotransformation chez les mollusques. In : Lagadic L, Caquet Th, Amiard JC et Ramade F (eds), *Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, 11-31.
- Neal JJ** (1987). Metabolic costs of mixed function oxidase induction in *Heliothis zea*. *Entomol. Exp. Appl.*, **43** : 175-179.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki et al.** (1996). P450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, **6** : 1-42.
- Pasteur N, Georghiou GP** (1989). Improved filter paper test for detecting and quantifying increased esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera : Culicidae). *J. Econ. Entomol.*, **82** : 347-353.
- Pasteur N, Marquine M, Rousset F et al.** (1995). The role of passive migration in the dispersal of resistance genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* within French Polynesia. *Genet. Res.*, **66** : 139-146.
- Poirié M, Pasteur N** (1991). La résistance des insectes aux insecticides. *Lett. Recherch.*, **22** : 874-882.
- Qiao CL, Raymond M** (1995). The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China. *Hereditas*, **74** : 339-345.
- Rappart DJ** (1989). Symptoms of pathology in the Gulf of Bothnia (Baltic Sea) : Ecological system response to stress from human activity. *Biol. J. Linn. Soc.*, **37** : 33-49.
- Raymond M, Callaghan A, Fort P et Pasteur N** (1991). Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, **350** : 151-153.
- Raymond M, Pasteur N, Fournier D et al.** (1985). Le gène d'une acetylcholinestérase insensible au propoxur détermine la résistance de *Culex pipiens* L. à cet insecticide. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **300** : 509-512.
- Rivet Y, Marquine M et Raymond M** (1993). French mosquito populations invaded by A2-B2 esterases causing insecticide

- resistance. *Biol. J. Linnean Soc.*, **49** : 249-255.
- Rooper S, Guillemaud T, Bergé JB et al.** (1996). Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity*, **77** : 555-561.
- Roush RT, Daly JC** (1990). The role of population genetics in resistance research and management. In : Roush RT, Tabashnik BE (eds). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall, New York and London, 97-152.
- Roush RT, Hoy MA** (1981). Laboratory, glasshouse, and field studies of artificially selected carbaryl resistance in *Metastelidius occidentalis*. *J. Econ. Entomol.*, **74** : 142-147.
- Roush RT, Mckenzie JA** (1987). Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.*, **32** : 361-380.
- Roush RT, Plapp FW Jr** (1982a). Biochemical genetics of resistance to aryl carbamate insecticide in the predaceous mite, *Metastelidius occidentalis*. *J. Econ. Entomol.*, **75** : 304-307.
- Roush RT, Plapp FW Jr** (1982b). Effects of insecticide resistance on biotic potential of the house fly (Diptera : Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, **75** : 708-713.
- Roush RT, Tabashnik BE** (1990). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall, New York and London.
- Sattelle DB** (1990). GABA receptors of insects. *Adv. Insect Physiol.*, **22** : 1-113.
- Sattelle DB, Yamamoto D** (1988). Molecular targets of pyrethroid insecticides. *Adv. Insect Physiol.*, **20** : 147-213.
- Sawicki RM, Denholm I** (1984). Adaptation of insects to insecticides. In : Evered D, Collins GM (eds). *Origins and Development of Adaptation*. Ciba Foundation Symposium Series 102. Pitman Books, London, 152-166.
- Sawicki RM, Denholm I, Forrester NW et Kershaw CD** (1989). Present insecticide-resistance management strategies in cotton. In : Green MB, Lyon DJ De B (eds). *Pest Management in Cotton*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, 31-43.
- Scott JG** (1996). Cytochrome P450 monooxygenase-mediated resistance to insecticides. *J. Pestic. Sci.*, **21** : 241-245.
- Scott JG Collins FH et Feyerisen R** (1994). Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205** : 1452-1459.
- Scott JG Sridhar P et Liu N** (1996). Adult specific expression and induction of cytochrome P450_{1pr} in house flies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **31** : 313-323.
- Snyder MJ, Davidson N** (1983). Two gene family clustered in a small region of the *Drosophila* genome. *J. Biol. Mol.*, **166** : 101-118.
- Snyder MJ, Hsu EL et Feyerisen R** (1993). Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Chem. Ecol.*, **19** : 2903-2916.
- Soderlund DM, Bloomquist JR** (1989). Neurotoxic actions of pyrethroids insecticide. *Annu. Rev. Entomol.*, **34** : 77-96.
- Soderlund DM, Bloomquist JR** (1990). Molecular mechanisms of insecticide resistance. In : Roush RT, Tabashnik BE (eds). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall, New York and London, 58-96.
- Sparks TC, Lockwood JA, Byford RL et al.** (1989). The role of behavior in insecticide resistance. *Pestic. Sci.*, **26**, 383-399.
- Tabashnik BE** (1990). Modeling and evaluation of resistance management tactics. In : Roush RT, Tabashnik BE (eds). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall, New York and London, 153-182.
- Taylor MFJ, Heckel DG, Brown TM et al.** (1993). Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium channel locus in the tobacco budworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **23**, 763-775.
- Terriere LC** (1983). Enzyme induction, gene amplification and insect resistance to insecticides. In : Georghiou GP, Saito T (eds). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press, New York, 265-298.
- Terriere LC** (1984). Induction of detoxication enzymes in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, **29**, 71-88.
- Timbrell JA, Draper R et Waterfield, CJ** (1994). Biomarkers in toxicology : new uses for old molecules. *Toxicol. Ecotoxicol. News*, **1** : 4-14.
- Xiao-Ping W, Hobbs AA** (1995). Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a pyrethroid inducible cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25** : 1001-1009.
- Yamamoto I, Takahashi Y et Kiyomura N** (1983). Suppression of altered acetylcholinesterase of the green rice leafhopper by *N*-propyl and *N*-methyl carbamate combinations. In : Georghiou GP, Saito T (eds). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press, New York, 579-594.
- Yu SJ** (1986). Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. In : Brattsten LB, Ahmad S (eds). *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*. Plenum Press, New York, 153-174.
- Yu SJ** (1996). Insect glutathione S-transferases. *Zool. Stud.*, **35** : 9-19.
- Tomita T, Scott JG** (1995). cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1 : The putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25** : 275-283.
- Vos RME, Van Bladeren PJV** (1990). Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.*, **75** : 241-265.
- Waters LC, Zehlf AC, Shaw BJ et Ch'ang LY** (1992). Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89** : 4855-4859.
- Williamson MS, Martínez-Torres D, Bell CA et Devonshire AL** (1996). Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knock-down resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molec. Genet.*, **252** : 51-60.