THE 40

THESE : *présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (I.N.P.T.) Spécialité : AGROCHIMIE*

PINCHARD Véronique

LABORATOIRE : *Unité de Recherche " Entomologie appliquée "*
Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD-CA)

TITRE DE LA THESE :

ÉTUDE DES MÉCANISMES DE RESISTANCE A LA DELTAMETHRINE CHEZ UN RAVAGEUR DU COTONNIER : *SPODOPTERA LITTORALIS* (Boisd.) (*Lepidoptera, Noctuidae*).

SOUTENANCE LE : *5 Novembre 1993*
Amphithéâtre du CIRAD à Montpellier.

DIRECTEUR DE RECHERCHE : **Professeur Jean CALMON**

JURY :

Pr. Jean CALMON	*Président*
M. Jean-Baptiste BERGE	*Rapporteur*
M. Bernard MAUCHAMP	*Rapporteur*
M. Maurice VAISSAYRE	*Examinateur*
M. Robert DELORME	*Examinateur*
M. Jean-Pierre DEMOUTE	*Examinateur*

THESE : *présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (I.N.P.T.) Spécialité : AGROCHIMIE*

PINCHARD Véronique

LABORATOIRE : *Unité de Recherche " Entomologie appliquée "*
Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD-CA)

TITRE DE LA THESE :

ÉTUDE DES MÉCANISMES DE RESISTANCE A LA DELTAMETHRINE CHEZ UN RAVAGEUR DU COTONNIER : *SPODOPTERA LITTORALIS* (Boisd.) (*Lepidoptera, Noctuidae*).

SOUTENANCE LE : *5 Novembre 1993*
Amphithéâtre du CIRAD à Montpellier.

DIRECTEUR DE RECHERCHE : **Professeur Jean CALMON**

JURY :

Pr. Jean CALMON	*Président*
M. Jean-Baptiste BERGE	*Rapporteur*
M. Bernard MAUCHAMP	*Rapporteur*
M. Maurice VAISSAYRE	*Examinateur*
M. Robert DELORME	*Examinateur*
M. Jean-Pierre DEMOUTE	*Examinateur*

A mes parents,

pour leur grande complicité
et leur tendresse tout au long de cette épreuve.
Merci également pour leur soutien matériel
tout au long de mon parcours " Recherche "...

REMERCIEMENTS

Cette thèse étant une étude pluridisciplinaire elle a été effectuée dans plusieurs laboratoires :

- le laboratoire de DL50 de l'Unité de Recherche en Entomologie Appliquée du CIRAD-CA à Montpellier dirigé par Monsieur VAISSAYRE ;

- le laboratoire de Phytopharmacie de l'INRA de Versailles dirigé par Monsieur DELORME ;

- le laboratoire de Biologie et de Génétique des Invertébrés de l'INRA d'Antibes dirigé par Monsieur BERGE ;

- le laboratoire de Biochimie de ROUSSEL UCLAF PROCIDA à Marseille dirigé par Monsieur BOTHAM.

J'aimerais tout d'abord remercier Monsieur CAUQUIL Responsable de l'Unité de Recherche en Entomologie Appliquée (UR.EA) du CIRAD-CA pour m'avoir accordé sa confiance dans la réalisation de mon travail, pour m'avoir communiqué de nombreux renseignements sur la protection phytosanitaire du cotonnier, et pour m'avoir sollicité afin de participer activement à de nombreuses réunions, en France et en Outre-Mer sur le cotonnier.

Je remercie également le Professeur Jean CALMON (ENSA-INP Toulouse) d'avoir diriger ma thèse et d'en présider le jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur BERGE qui m'a permis de réaliser plusieurs séjours dans son laboratoire de l'INRA-Antibes et qui a accepté d'être rapporteur de mon travail. Toute ma gratitude, est acquise à toute l'équipe de ce laboratoire et plus particulièrement à André CUANY pour sa disponibilité, sa compétence et sa bonne humeur.

Je remercie Monsieur DELORME pour m'avoir accueillie à plusieurs reprises dans son laboratoire de l'INRA-Versailles où j'ai pu réaliser une partie de mon travail avec l'aide précieuse et l'entrain de Danielle AUGE, et de Jacqueline DUBROCA, je remercie également Robert DELORME pour ses nombreux conseils et pour avoir accepté d'examiner mon manuscrit.

Je remercie Monsieur MAUCHAMP (INRA-Lyon) pour avoir accepter d'être rapporteur de mon travail et pour ses remarques pertinentes qui m'ont aidée dans la rédaction de mon manuscrit.

Je remercie Monsieur VAISSAYRE responsable du laboratoire de DL50 depuis un an pour avoir accepté d'examiner mon travail et m'avoir dirigée dans mes recherches.

Je tiens également à remercier plusieurs membres du Centre de recherche de ROUSSEL UCLAF ; Monsieur BENOIT qui a fourni au CIRAD la souche de S. littoralis résistante, Monsieur ROCHE pour ses conseils ainsi que pour m'avoir permis de réaliser des mesures d'électrophysiologie, Monsieur DEMOUTE qui m'a très souvent donné des matières actives et qui a accepté d'examiner mon travail.

J'aimerais aussi remercier Monsieur JACQUEMARD (CIRAD-CA) pour avoir proposé ce sujet de thèse et pour son aide quant à la mise en place du projet.

Je remercie également Monsieur VASSAL (CIRAD-CA) pour avoir suivi mes travaux pendant les deux premières années de ma thèse, pour ses conseils et ses encouragements.

Je remercie Monsieur BOURNIER pour sa disponibilité, et ses conseils en Entomologie.

Je remercie également Madame Nicole PASTEUR (CNRS Montpellier) qui a été disponible malgré ses nombreuses occupations pour me conseiller et me faire profiter de sa compétence scientifique.

Mes remerciements s'adressent aussi à Laurent LAGADIC, pour ses précieux conseils, sa compétence sur le sujet et sa sympathie.

Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel de l'UR.EA qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser mon travail dans une ambiance chaleureuse et qui m'ont aidé dans les moments difficiles.

Enfin, je ne peux terminer ces remerciements sans exprimer toute ma reconnaissance aux membres de ma famille qui m'ont soutenue et entourée pendant la réalisation de ce travail et sans qui je n'aurais pu arriver jusque là.

SOMMAIRE GENERAL

SOMMAIRE GENERAL

LISTE DES ABREVIATIONS 5

INTRODUCTION GENERALE . . . . . 6 à 10

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE . . . . . 11 à 46

A. LES PYRÉTHRINOIDES 12

1. LEUR ORIGINE 12
2. LA DELTAMÉTHRINE 15
3. MODE D'ACTION DES PYRÉTHRINOIDES CHEZ LES INSECTES 17
4. UTILISATION DES PYRÉTHRINOIDES EN AGRICULTURE . . 23

B. LA RÉSISTANCE AUX PYRÉTHRINOIDES 23

1. GENERALITES 23
2. MÉCANISMES BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE LA RÉSISTANCE AUX PYRETHRINOÏDES 26

C. *SPODOPTERA LITTORALIS* ET LA RÉSISTANCE AUX INSECTICIDES . 37

1. *S. LITTORALIS* 37
2. DIFFÉRENTES MÉTHODES DE LUTTE UTILISÉES SUR COTONNIER 39
3. *S. LITTORALIS* ET LA RÉSISTANCE AUX INSECTICIDES . . 42
4. CONCLUSION 45

D. BUT DE NOTRE ÉTUDE 46

CHAPITRE II : BIOLOGIE ET CONDITIONS D'ÉLEVAGE DE *S. LITTORALIS* : . . . . . 47 à 57

1. PRÉSENTATION DU RAVAGEUR 48
2. TECHNIQUES D'ELEVAGE DE *S. LITTORALIS* 53

CHAPITRE III : SPECTRE D'ACTIVITE DE DIFFERENTS INSECTICIDES SUR LES DEUX SOUCHES 58 à74

1. INTRODUCTION 59
2. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR UN TEST INSECTICIDE 59

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION 65
3.1. Toxicité de la deltaméthrine 66
3.2. Toxicité de la cyperméthrine 68
3.3. Toxicité du chlorpyriphos-éthyl 69
3.4. Toxicité du DDT 71
3.5. Héritabilité de la résistance 72
4. CONCLUSION 74

CHAPITRE IV : RECHERCHE DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX PYRÉTHRINOIDES CHEZ *S. LITTORALIS* ... 75 à 129

A. ÉTUDE DE LA PÉNÉTRATION CUTICULAIRE DE LA DELTAMÉTHRINE CHEZ *S. LITTORALIS* 76

1. INTRODUCTION 76
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 77
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION 79
4. CONCLUSION 81

B. RÉSISTANCE MÉTABOLIQUE 82

1. UTILISATION DE SYNERGISTES 82
2. ÉTUDE ENZYMATIQUE 88

2.1. Les estérases 88
2.2. Les mono-oxygénases à cytochrome P450 93
2.3. Les gluthation-S-transférases 99
2.4. Conclusion 100

3. EXPÉRIENCES DE MÉTABOLISATION 102

3.1. Métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine 102
3.2. Expériences de métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine 108
3.3. Métabolisation *in vitro* du DDT 113
3.4. Métabolisation *in vitro* de la testostérone 117
3.5. Conclusion de l'étude du métabolisme 122

C. MESURE DE SENSIBILITE DU SYSTEME NERVEUX A LA DELTAMETHRINE *IN SITU* CHEZ S. *LITTORALIS* 124

1. INTRODUCTION 124
2. MATERIEL ET METHODES 124
3. RESULTATS ET DISCUSSION 126

CONCLUSION GENERALE ..... 130 à 136

ANNEXES ..... 137 à 155

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 156 à 174

SOMMAIRE DETAILLE ..... 175 à 182

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX et PLANCHES PHOTO. ..... 183 à 185

LISTE DES ABREVIATIONS

B.t.	*Bacillus thuringiensis*
C.A.M.	Chloroforme, Acétate d'éthyle, Méthanol (Solvants)
C.C.M.	Chromatographie Couche Mince
cDNA	Acide désoxyribonucléïque monoacaténaire
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzène
CO	Monoxyde de carbone
C14	Carbone quatorze
CR	Coefficient de Résistance
Cyt.P450	Cytochrome P450
DCNB	1,2-dichloro-4-nitrobenzène
DEF	S-S-S-tributyl phosphorotrithioate (Defoliant)
DDT	p.p'. dichloro-diphényl-trichloroéthane
DL50	Dose létale 50
DO	Densité Optique
DTT	Dithiotréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
GABA	Acide Gamma-Aminobutyrique
GST	Glutathion-S-Transférases
HCH	Hexachlorocyclohexane
KD	"Knock down" (effet de choc)
kdr	"Knock down resistance" (résistance au KD)
LV	"Low volume" (bas volume)
m.a.	matière active
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Potentiel d'action
PB	Butoxyde de pipéronyle
PEG	Polyéthylène glycol
PMSF	Phénylméthylsulfoxyde fluoride
PPSE	Potentiel post-synaptique excitateur
PPSI	Potentiel post-synaptique inhibiteur
R	Résistante
Rf	Référence du front
S	Sensible
SDS	Sodium duodécyl sulfate
SN	Système nerveux
ULV	Ultra low volume (ultra bas volume)
UV	Ultra violets
VPN	Virus de la polyhédrose nucléaire
7-EC	7-éthoxycoumarine
7-OH	7-hydroxycoumarine
6-dOHT	6-déshydrotestostérone
2α-OH	2α-hydroxytestostérone
6ß-OH	6ß-hydroxytestostérone
7α-OH	7α-hydroxytestostérone
16α-OH	16α-hydroxytestostérone
15α-OH	15α-hydroxytestostérone

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La culture du cotonnier n'est pas seulement la principale ressource mondiale de fibre naturelle, avec un emblavement de trente quatre millions d'hectares, soit 2,5 % des terres cultivées, c'est aussi une composante économique importante dans les pays où elle s'est développée (ALCOCK et *al.*, 1991).

Un des facteurs qui a permis le développement de cette culture est l'intensification des techniques culturales, et notamment de la protection phytosanitaire. En effet le cotonnier subit une forte pression parasitaire, aussi bien pendant la phase végétative (insectes piqueurs-suceurs et chenilles phyllophages) que pendant les phases de floraison et de fructification (chenilles carpophages principalement) (CAUQUIL, 1986).

Sans traitement insecticide les pertes de récolte varient entre 50% et 90 % de la production potentielle (PEARSON, 1958). C'est pourquoi, la culture du cotonnier consomme 12 % du marché mondial des produits phytosanitaires et 25 % de celui des pyréthrinoïdes (RIBA et SILVY, 1989).

Si l'utilisation des pesticides a permis une augmentation de la production, elle a entraîné de nombreux problèmes : la résurgence ou l'émergence de nouveaux ravageurs, la destruction de la faune utile, la contamination de l'environnement et l'induction de **phénomènes de résistance** des ravageurs aux insecticides.

La résistance aux insecticides est un problème complexe qui a pris une importance croissante au cours de la dernière décennie (groupes de travail, revues spécialisées et conférences sont consacrés exclusivement au sujet). Le faible nombre de nouvelles familles d'insecticides apparues depuis la mise sur le marché des pyréthrinoïdes à la fin des années soixante dix en est certainement la principale raison.

A cette époque, ces insecticides apparaissaient comme la solution à de nombreux problèmes posés par les principaux ravageurs des cultures. En 1985, suite à une utilisation croissante et intensive des pyréthrinoïdes, on dénombrait déjà prés de quarante cas de résistance à cette nouvelle famille (GEORGHIOU, 1985). En 1990, le nombre de cas est passé à 70 (GEORGHIOU, 1990).

Face à l'ampleur du phénomène, des stratégies visant à la gestion de la résistance ont été mises en place (avec l'aide de certains organismes comme l'IRAC) dans de nombreux pays, soit pour prévenir l'apparition de résistance (Egypte, Zimbabwé), soit pour limiter son extension et faire revenir les populations d'insectes à des niveaux de sensibilité économiquement acceptables (Australie, Etats-Unis), (ROUSH et TABASHNIK, 1990).

Au départ, ces programmes étaient basés sur la réduction de l'utilisation des pesticides afin de diminuer la pression de sélection exercée sur les ravageurs (FORRESTER et CAHILL, 1986).

Actuellement, l'étude des facteurs intervenant dans l'apparition de la résistance et l'étude des mécanismes de résistance permettent d'améliorer sensiblement ces stratégies (ROUSH et TABASHNIK, 1990).

C'est dans cette optique, que notre étude a été mise en place.
Le modèle de Lépidoptère que nous avons choisi pour l'étude des mécanismes de la résistance est la noctuelle *Spodoptera littoralis* (Boisdduval).

Bien que *S. littoralis* soit un ravageur secondaire du cotonnier, ce déprédateur cause de sérieux dégâts sur coton dans plusieurs pays : Madagascar, Egypte, Israël, et Turquie.

Le but de notre étude est d'essayer de **caractériser les mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes** chez une souche d'origine égyptienne, hautement résistante à la deltaméthrine.

La démarche suivie au cours de cette étude s'appuie sur la comparaison des caractéristiques toxicologiques, biochimiques, métaboliques et électrophysiologiques de cette souche résistante avec celles d'une souche de référence sensible aux insecticides.

Le **premier chapitre** rappelle les caractéristiques et le mode d'action des pyréthrinoïdes. Les différents mécanismes impliqués dans le phénomène de résistance aux pyréthrinoïdes sont ensuite décrits. La dernière partie de ce chapitre rassemble différentes données sur le ravageur : son importance économique, les moyens de lutte utilisés, ainsi que les problèmes de résistance observés sur le terrain.

Le **deuxième chapitre** de notre étude décrit la biologie de *S. littoralis*, la mise en place de méthodes d'élevage de cet insecte ainsi que la présentation des différentes souches qui nous permettront de réaliser toutes nos expérimentations.

Dans un **troisième chapitre**, nous avons évalué le spectre de résistance de la souche étudiée, afin de savoir s'il existait ou non des résistances croisées entre les pyréthrinoïdes et d'autres insecticides, et déterminé les coefficients de résistance de la souche égyptienne. Cette souche présentant une forte résistance aux pyréthrinoïdes, nous avons tenté de mettre en évidence les différents mécanismes de résistance responsables de ce phénomène.

Le **quatrième chapitre** de notre étude est consacré à l'étude biochimique de ces différents mécanismes.

Ce dernier chapitre est divisé en trois grandes parties ; chacune de ces parties est consacrée à un type de mécanisme.

Dans un premier temps, nous avons comparé la cinétique de la pénétration de la deltaméthrine chez les deux souches afin de savoir si ce mécanisme intervenait dans le phénomène de résistance.

Dans un deuxième temps le rôle du métabolisme a été étudié.

Nous avons tout d'abord, effectué des tests de toxicité de la deltaméthrine vis-à-vis des deux souches en présence d'inhibiteurs d'enzymes de détoxification afin de savoir si certaines de ces enzymes intervenaient dans la résistance.

Les résultats de ces tests préliminaires semblaient indiquer que la résistance était en partie d'ordre métabolique.

Les caractéristiques et les propriétés des principaux systèmes enzymatiques pouvant intervenir dans la résistance ont ensuite été étudiés chez les deux souches.

Une étude comparative de la métabolisation de divers substrats par les systèmes enzymatiques des deux souches permettra de conclure quant à la résistance métabolique.

Une troisième et dernière partie de ce chapitre est consacrée à une étude physiologique de la sensibilité de la cible de la deltaméthrine chez les deux souches pouvant mettre en évidence une éventuelle modification de la cible chez la souche résistante.

La recherche des mécanismes de résistance étant une étude pluridisciplinaire utilisant des techniques assez différentes, nous avons choisi de décrire les méthodes et les résultats pour chaque mécanisme.

La **conclusion** de notre étude, mettra en évidence les différents mécanismes responsables de la résistance aux pyréthrinoïdes chez la souche égyptienne de *S. littoralis*.

La connaissance de ces mécanismes permettra de proposer des solutions pour la gestion de la résistance et de discuter des conditions d'apparition de ce phénomène.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. LES PYRÉTHRINOIDES

Dans ce chapitre, une première partie sera consacrée à un résumé de l'historique des pyréthrinoïdes. Une seconde partie présentera le mode d'action des molécules de cette famille de pesticides chez les insectes.

1. LEUR ORIGINE

C'est en 1924 que STAUDINGER et RUZICKA isolent les pyréthrines naturelles (pyrèthre) à partir d'extraits de poudre de fleurs séchées de deux espèces du genre *Chrysanthemum* : *C. roseum* et *C. cineriaefolium* (STAUDINGER et RUZICKA, 1924).

Les pyréthrinoïdes de synthèse dérivent du pyrèthre.

Les propriétés insecticides de cette poudre sont dûes à la présence de six esters d'acide cyclopropane carboxylique (Figure (Fig.) I.1), les pyréthrines (I et II), les cinérines (I et II) et les jasmolines (I et II), ces dernières étant les plus abondantes. Le principal défaut des pyréthrines naturelles, réside dans leur photoinstabilité, ce qui oblige à augmenter la fréquence des traitements.

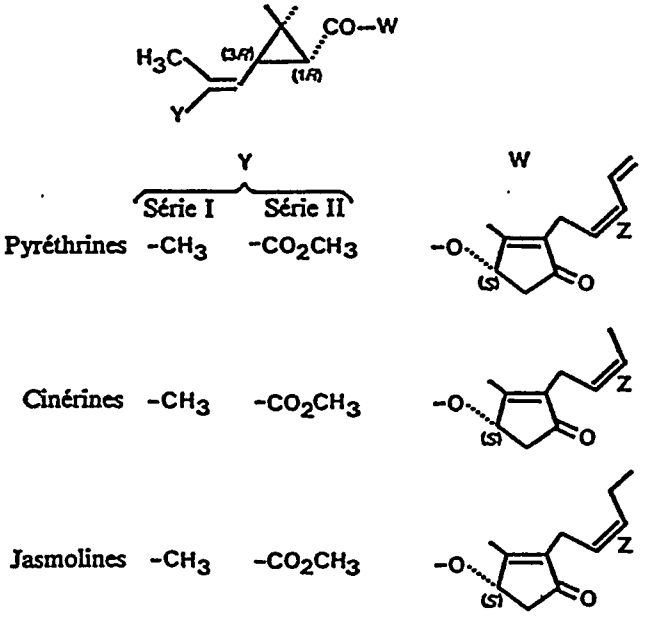


Fig. I.1 - Les constituants du pyrèthre
Source : (TESSIER, 1982a)

Dans les années 50, SCHECHTER et *al.* (1949) créent les premiers analogues synthétiques des pyréthrines ; il s'agit des alléthrines synthétisées à partir de l'acide chrysanthémique et d'une réthrolone synthétique, l'alléthrolone (Fig. I.2).

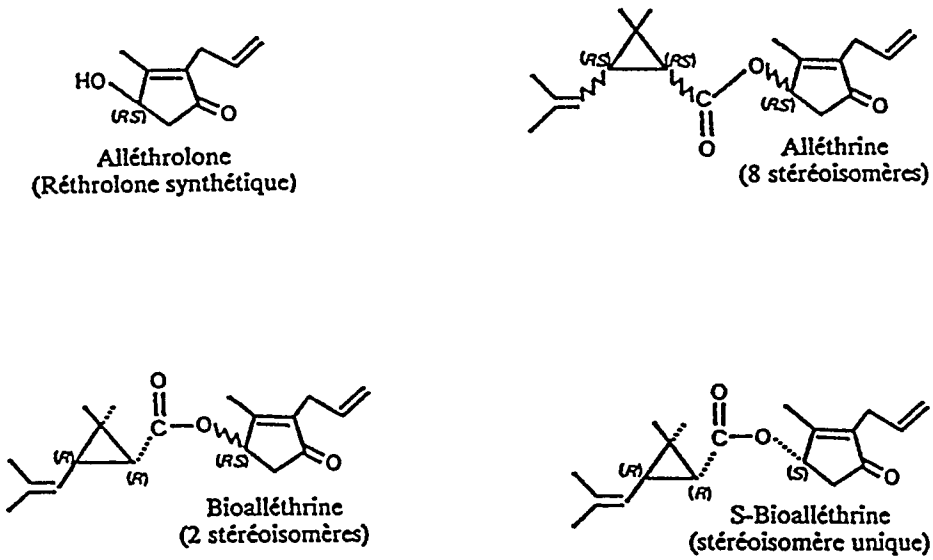


Fig. I.2 - Les alléthrines
Source : (TESSIER, 1982$_a$)

Pendant les années 50 à 70, les travaux sur les molécules ont conduit à des esters pyréthrinoïdes issus d'alcools primaires hétérocycliques comme la bioresméthrine (ELLIOTT et *al.*, 1967) moins toxique pour les mammifères et plus insecticide pour les arthropodes (Fig. I.3).

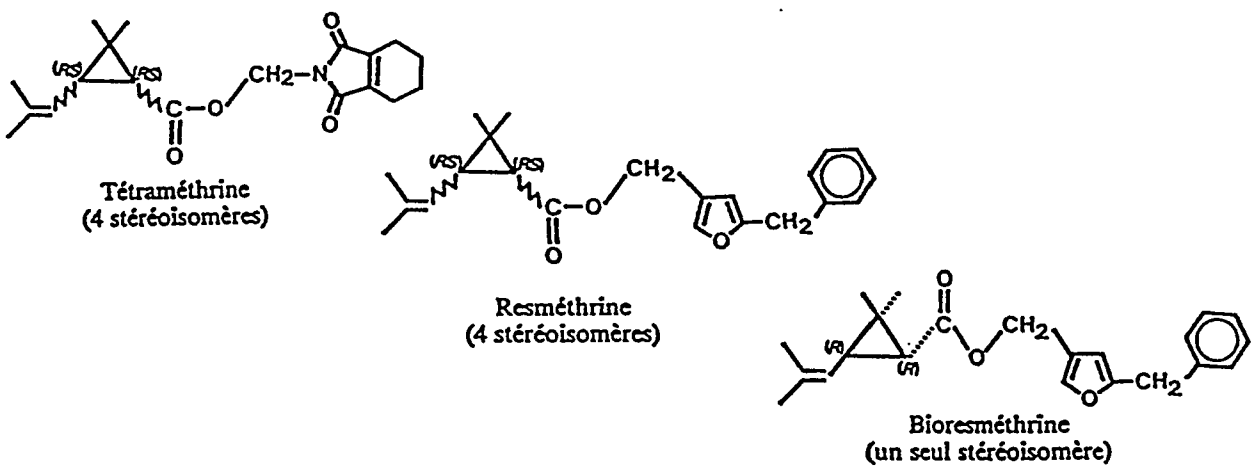


Fig. I.3 - Esters pyréthrinoïdes
Source : (TESSIER, 1982$_a$)

De 1970 à 1980, l'activité insecticide et la photostabilité des pyréthrinoïdes de synthèse ont été améliorées (ELLIOTT et *al.*, 1973). Les modifications structurales ont porté sur l'introduction d'un groupe cyano en position benzylique, ainsi que l'introduction d'une nouvelle copule acide (OHNO, 1973).

On assiste alors à l'apparition de molécules comme la cyperméthrine le fenvalérate et la bioperméthrine (Fig. I.4).

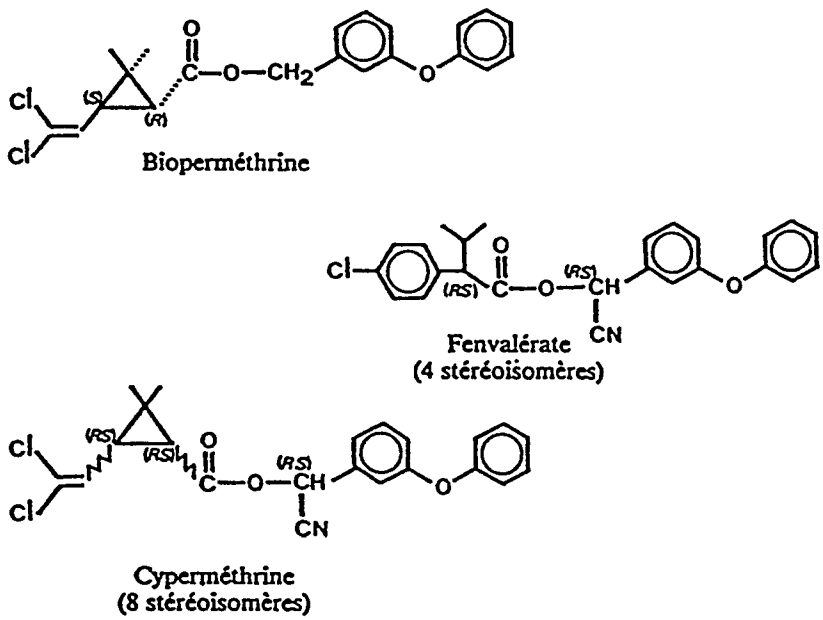


Fig. I.4 - Structures de pyréthrinoïdes photostables
Source : (TESSIER, 1982$_a$)

La sélection du stéréoisomère d'activité maximum a conduit au produit culminant de la série : la deltaméthrine (Fig. I.5) ; ce composé est considéré comme l'un des insecticides les plus efficaces actuellement.

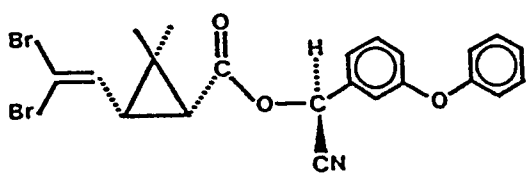


Fig. I.5 - La deltaméthrine
Source : (TESSIER, 1982$_a$)

Les principales propriétés de la deltaméthrine seront rappelées dans le paragraphe qui suit.

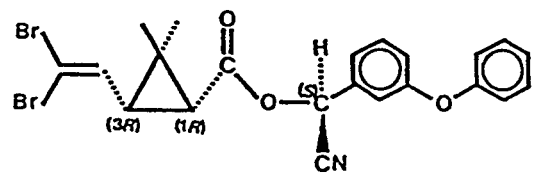
2. LA DELTAMÉTHRINE

2.1. Propriétés physico-chimiques

En 1982, TESSIER décrit les propriétes physico-chimiques de la deltaméthrine (TESSIER, 1982_b).

✡Structure de la molécule

La structure moléculaire du stéréoisomère le plus actif de la deltaméthrine est la suivante :



$C_{22}H_{19}Br_2NO_3 = 505,2$

Nommenclature : (1R,3R)-3(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane carboxylate de (S)-α-cyano-3-phénoxybenzyle.

Fig. I.6 - Stéréoisomère le plus actif de la deltaméthrine
Source : (ELLIOTT et *al.*, 1977)

✡Caractéristiques physicochimiques

La deltaméthrine se présente sous la forme d'un solide blanc, dont le point de fusion est de 101-102°C et la pression de vapeur est à 25°C de 3.10^{-10} mm Hg. La molécule est peu polaire, donc peu soluble dans l'eau et dans les solvants polaires.

2.2. Toxicité de la deltaméthrine vis-à-vis des vertébrés supérieurs

La deltaméthrine est peu toxique pour les mammifères et les oiseaux (Tableau (Tab.) I.1), (GLOMOT, 1982).

Tab. I.1 - Toxicité aiguë par voie orale de la deltaméthrine

Espèce animale	Solvant	Sexe	DL50 en mg/Kg
RAT	Huile de sésame	Mâle	129
		Femelle	139
	PEG 200	Mâle	67
		Femelle	86
SOURIS	Huile de sésame	Mâle	33
		Femelle	34
	PEG 200	Mâle	21
		Femelle	19
POULE	Huile de maïs		5 000
	Huile de sésame		2 500

Le coefficient de sécurité du produit décrit par ELLIOTT : *" le rapport de la toxicité sur rat sur la toxicité obtenue sur mouche domestique par voie orale "*. On note que la deltaméthrine est 2 600 à 5 500 fois plus toxique sur mouche que sur rat (Tab. I.2).

Tab. I.2 - Toxicité relative mouche/rat de divers insecticides
** Source : (H. MARTIN et C.R. WORTHING "Pesticide Manuel" 4th Edition 1974)

Produits	DL50 chez l'insecte en µg/g**	DL50 orale chez le rat en µg/g	Rapport DL50 rat / DL50 mouche
DDT	10,0	113	11,3
Malathion	0,9	3,6 à 13	4 à 14
Diméthoate	0,9	320 à 380	356 à 422
Deltaméthrine	0,025	67 à 139	2 680 à 5 560

3. MODE D'ACTION DES PYRÉTHRINOIDES CHEZ LES INSECTES

Les pyréthrinoïdes agissent au niveau du système nerveux des insectes.

3.1. Symptômes d'intoxication

Les symptômes d'intoxication des pyréthrinoïdes sont différents suivant le type de pyréthrinoïde appliqué.

Les pyréthrines et les pyréthrinoïdes les plus anciens (S-bioalléthrine, resméthrine, kadéthrine, phénothrine et perméthrine) appelés **pyréthrinoïdes de type I**, entraînaient les symptômes suivants :

* une phase de latence avant le déclenchement des premiers symptômes,
* une phase d'excitation,
* une phase de tremblements,
* une phase de prostration ou abattement " Knock Down " (KD),
* la mort ou effet létal " Kill ".

Les pyréthrinoïdes plus récents (fenvalérate, cyfluthrine, cyperméthrine, deltaméthrine) sont des molécules α-cyanées nommées **pyréthrinoïdes de type II**. Ces molécules entraînent :

* une phase de latence,
* une phase d'excitation,
* une phase d'incoordination,
* une phase de convulsions accompagnée d'une forte salivation,
* une phase de prostation (KD) et la mort.

Ces phases se déroulent selon des cinétiques déterminées dont les principaux facteurs de variation sont : le type de molécule, la dose, le solvant, le mode d'administration et la localisation du toxique sur l'animal.

A certaines doses, les pyréthrinoïdes présentent des propriétés "répulsives" (BERNARD, et *al.*, 1991). Dans d'autres cas, ils engendrent une inhibition de prise alimentaire ou une répression de la ponte.

A des doses extrêmement réduites, les pyréthrinoïdes peuvent induire des modifications physiologiques profondes altérant divers équilibres internes comme la régulation hydrique, la fécondité et la longévité imaginale (HAYNES, 1988).

La nature apolaire des pyréthrinoïdes favorise chez les insectes une pénétration rapide du produit d'où une action rapide au niveau du système nerveux.

Chez les mammifères, après administration par voie orale, les pyréthrinoïdes sont très rapidement métabolisés par les systèmes oxydasiques ou très facilement hydrolysés en métabolites polaires qui sont éliminés dans les faeces ou l'urine, (Fig. I.7).

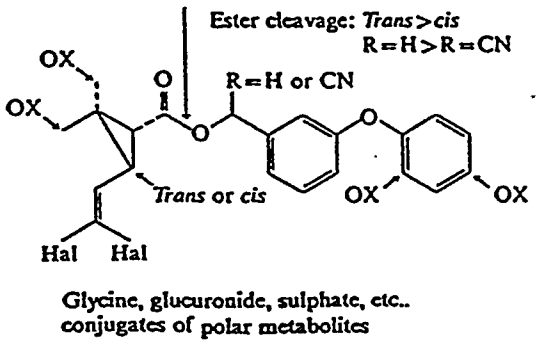


Fig. I.7 - Métabolisme des pyréthrinoïdes
Source : (DEMOUTE, 1989)

3.2. Mode d'action des pyréthrinoïdes

Des expériences réalisées sur la blatte *Periplaneta americana* ont permis de classer les pyréthrinoïdes en deux groupes suivant leur structure chimique et leur action neurotoxique (GAMMON et *al.*, 1981 ; HUE, 1985 ; PELHATE, 1985).

Les pyréthrinoïdes de type I induisent des décharges répétitives au niveau des fibres nerveuses sans dépolarisation membranaire, ni blocage de la conduction de l'influx, ils agissent au niveau du système nerveux périphérique (NARAHASHI, 1962).

Les pyréthrinoïdes de type II provoquent une dépolarisation de la membrane axonale et un blocage de la transmission synaptique avec induction de décharges postsynaptiques et ont une action au niveau du système nerveux central. (GAMMON et *al.*, 1981 ; NARAHASHI, 1986).

Avant de préciser les cibles moléculaires des pyréthrinoïdes au niveau du système nerveux, nous ferons un bref rappel sur la structure et le fonctionnement du système nerveux chez les insectes.

3.2.1. L'excitabilité membranaire

L'élément de base du système nerveux (SN) est la cellule nerveuse ou neurone qui comporte un corps cellulaire, des dendrites, et un axone.

Les signaux utilisés par le système nerveux pour transmettre des informations sont de nature électrique en dehors des synapses.

L'activité électrique dans le SN dépend du mouvement d'ions à travers la membrane des cellules nerveuses.

Au repos, il existe une différence de potentiel entre le milieu extracellulaire et intracellulaire qui correspond au potentiel de repos.

Cette différence de potentiel varie de 40 à 90 mV selon les cellules et est due à une répartition inégale de certains ions de part et d'autre de la membrane cellulaire : le milieu extracellulaire est riche en ions Na^+ et pauvre en ions K^+, et inversement pour le milieu intracellulaire.

Au repos la membrane est perméable uniquement aux ions K^+.

Lorsque la membrane est brusquement dépolarisée au delà d'un certain seuil, le potentiel transmembranaire s'inverse : c'est le potentiel d'action (PA) (Fig. I.8).

Les canaux sodium s'ouvrent, et il y a une entrée massive d'ions Na^+ qui entraîne une augmentation de potentiel, les canaux Na^+ se referment et la perméabilité de la membrane vis-à-vis du K^+ augmente pour retrouver l'équilibre.

La membrane cellulaire peut faire varier le potentiel d'action (PA) le long des axones et ainsi il se propage (Fig. I.8).

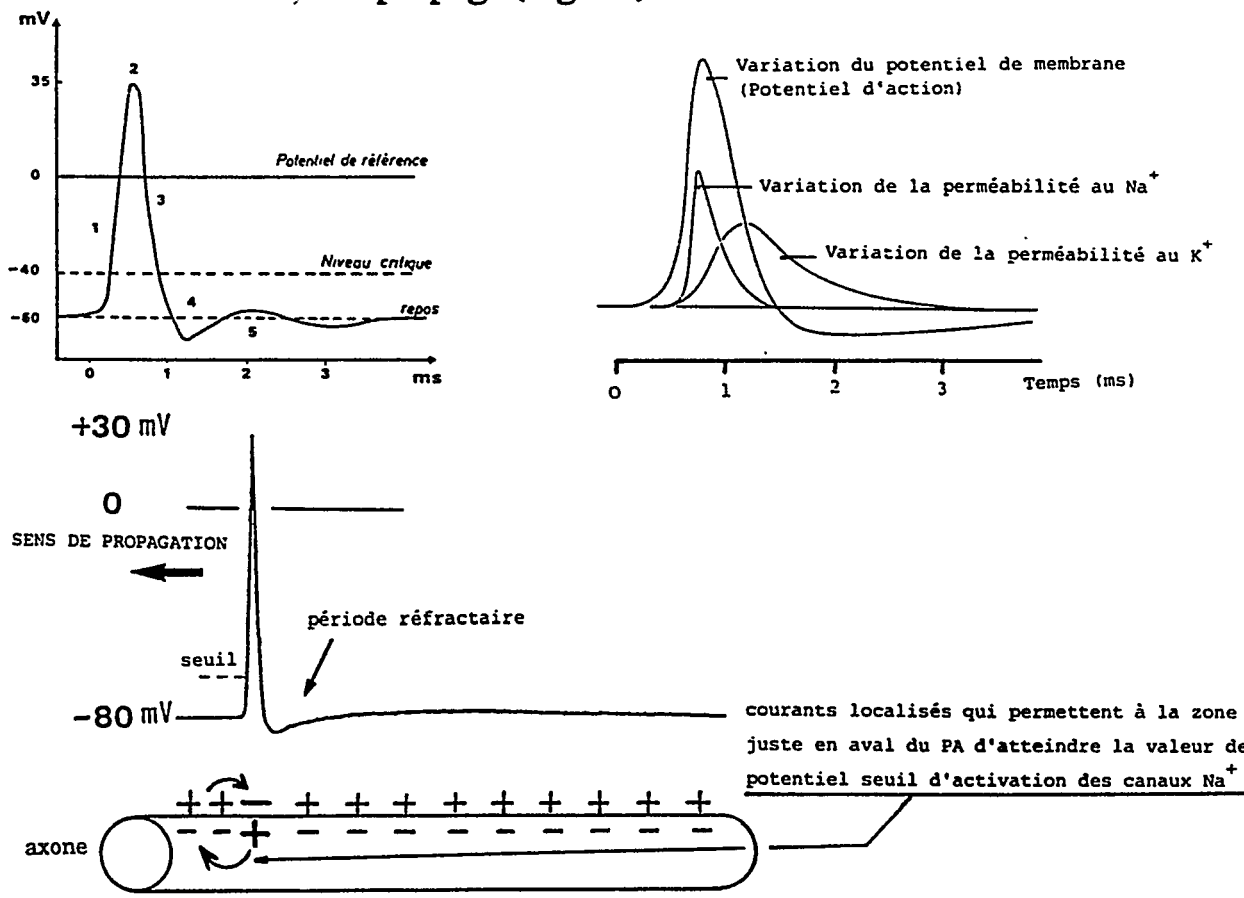


Fig. I.8 : L'excitabilité membranaire
Source :(DELORME et MAUCHAMP, 1987 ; ROCHE, 1990)

3.2.2. La synapse et les neuromédiateurs

Au niveau des synapses, l'information électrique est transmise par l'intermédiaire de substances chimiques appelées neuromédiateurs.

Lorsque le potentiel d'action arrive au niveau des terminaisons présynaptiques il y a augmentation de la perméabilité aux ions calcium Ca^{++} ; ceci entraîne la libération de neurotransmetteurs dans l'espace synaptique.

Ces neurotransmetteurs se fixent ensuite sur des récepteurs spécifiques de la membrane post-synaptique associés à des canaux ioniques chimiodépendants.

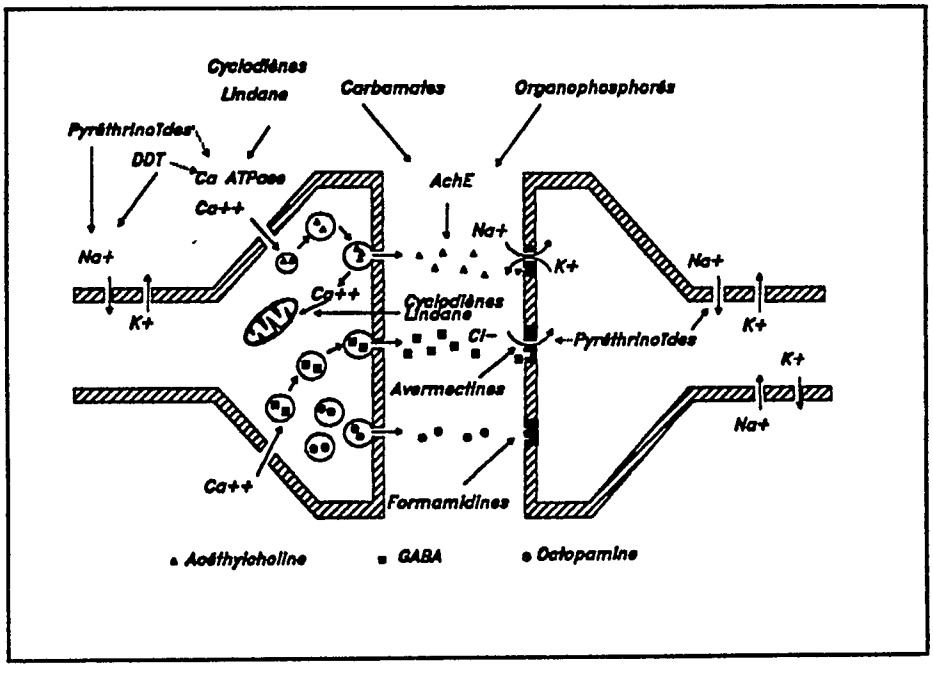


Fig I.9 : Mode d'action des insecticides au niveau de la synapse
Source : (PINCHARD, 1991)

Ce phénomène entraîne pendant quelques millisecondes une augmentation de la perméabilité ionique membranaire.

Ceci se traduit par une excitation (dépolarisation) ou une inhibition (hyperpolarisation).

Dans le premier cas il y a formation d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) qui permet la propagation de nouveaux potentiels d'action.

Dans le second cas, il y a formation d'un potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI) par l'intermédiaire de l'acide gamma amino-butyrique (GABA), dû à une augmentation de la perméabilité aux ions Cl^-.

Les neuromédiateurs, après avoir déclenché les potentiels post-synaptiques sont détruits et recapturés.

3.2.3. Sites d'action des pyréthrinoïdes

Le site d'action des pyréthrinoïdes est le système nerveux et la cible principale au niveau moléculaire se situe au niveau du canal Na^+ (PELHATE, 1985 ; VIJVERBERG et DE WEILLE, 1985). Le mode d'action précis sur le canal Na^+ est encore mal connu.

3.2.3.1. Cible principale des pyréthrinoïdes : Action sur les canaux Na^+

A faibles concentrations les pyréthrinoïdes auraient une action sur les canaux Na^+. En fait il y aurait une prolongation de l'ouverture des canaux sodiques qui varie suivant le type de pyréthrinoïde utilisé (LAUFER et *al.*, 1984, 1985 ; PELHATE et *al.*, 1985 ; NARAHASHI, 1986 ; SODERLUND et BLOOMQUIST, 1989).

Cette entrée massive de sodium détermine un accroissement d'amplitude et de durée du post-potentiel de dépolarisation qui à son tour provoque l'induction de décharges répétitives.

A fortes concentrations, les pyréthrinoïdes α-cyanés bloquent totalement la perméabilité membranaire.

Il existe probablement des sites de fixation stéréospécifique aux pyréthrinoïdes au niveau du canal Na^+ (SODERLUND, 1979, 1980).

Au niveau moléculaire, des enregistrements par la technique de " Patch-clamp " ont montré que les pyréthrinoïdes maintenaient les canaux sodiques ouverts (*In* NARAHASHI, 1992).

Les différences au niveau des symptômes d'action des pyréthrinoïdes de types I et II s'expliqueraient par une différence de cinétiques d'action des deux types de molécules au niveau de la pompe à Na^+ (NARAHASHI, 1992).

Les sites de fixation de différentes toxines ont été identifiés au niveau du canal Na^+.
A l'heure actuelle, cinq sites de fixations de toxines ont été identifiés dont chacun est spécifique d'une toxine (*In* : NARAHASHI, 1992).

Des études de flux de $^{22}Na^+$ ont montré que les pyréthrinoïdes ne se fixaient pas sur ces sites mais sur un sixième site.

Des études sur la fixation de toxines marquées au tritium ont permis d'estimer le nombre de canaux sodium dépendants chez la mouche (PAURON et *al.*, 1985 ; 1989 ; AMICHOT et *al.*, 1992).

D'autres auteurs ont montré par la même technique, une synergie entre l'action des pyréthrinoïdes α-cyanés et certaines toxines agissant au niveau du canal Na^+ (JACQUES, et *al.*, 1980).

D'après toutes ces études la cible principale est le canal Na^+, mais le site de fixation n'est pas encore connu.

3.2.3.2. Cibles secondaires

Action sur les récepteurs GABA

Les récepteurs GABA seraient des cibles secondaires des pyréthrinoïdes de type II. (FORSHAW et *al.*, 1993 ; SATTELLE, 1990 ; SATTELLE et YAMAMOTO, 1988 ; SODERLUND et BLOOMQUIST, 1989).

L'action des pyréthrinoïdes sur le récepteur GABA ne se produirait qu'en présence de fortes concentrations.

Actions sur les canaux Ca^{++}

Les ATPases Ca^{++} seraient également des sites secondaires de l'action des pyréthrinoïdes (CLARK et MATSUMURA, 1982 ; MATSUMURA, 1982).

3.3. Conclusion

Les pyréthrinoïdes ont donc un effet neurotoxique qui s'explique par des modifications des propriétés cinétiques des canaux sodium au niveau des membranes nerveuses. Ces modifications provoquent ainsi, des décharges répétitives et à forte dose, un blocage de l'excitabilité.

Ces molécules agissent également au niveau des pompes à calcium. Au niveau synaptique, les pyréthrinoïdes modifient la fixation des neuro-médiateurs comme l'acide kaïnique, la nicotine ou l'acide GABA.

La sensibilité du système nerveux aux pyréthrinoïdes peut entraîner certaines réactions au niveau des cellules neurosécrétrices (ORCHARD, 1980; DYBALL, 1982).

Enfin, les pyréthrinoïdes peuvent agir sur les systèmes non neuraux en stimulant des neurosécrétions naturelles (autotoxines) (NORMANN, 1979) ou les enzymes de détoxication (In CARLE, 1985).

4. UTILISATION DES PYRÉTHRINOIDES EN AGRICULTURE

Les pyréthrinoïdes sont caractérisés par un effet choc ou " knockdown " et une activité létale. Ils ont un spectre assez large et une bonne activité résiduelle ; ils possèdent également un pouvoir répellant et anti-appétant.

Grâce à ces caractéristiques, ces molécules sont très largement utilisées en protection des plantes, dans de nombreuses régions et donc sur des cultures très variées.

En protection des cultures, leur principale utilisation a permis de contrôler les chenilles carpophages et les chenilles phyllophages sur coton, mais elles sont également très utilisées pour le contrôle de nombreux lépidoptères ravageurs de fruits et légumes, ou d'aphides sur céréales (HIRANO, 1989). Certains pyréthrinoïdes ont également une forte activité acaricide.

Les pyréthrinoïdes sont également utilisés pour la protection des denrées stockées (COLAS, 1982).

Depuis le développement en 1973 de pyréthrinoïdes ayant un fort pouvoir insecticide, une faible toxicité envers les mammifères et une bonne stabilité sur des surfaces inertes, ces molécules ont remplacé des molécules plus anciennes de la famille des organochlorés (DDT).

De plus, la variété des modes d'application (aérosol, poudrage, pulvérisation, addition aux peintures) permet de lutter contre les nuisibles en hygiène domestique (blattes) (CARLE, 1982).

Elles sont aussi utilisées dans le contrôle des vecteurs de grandes maladies dans le domaine de la Santé Publique (moustiques, mouches) (CARTER, 1989).

B. *LA RÉSISTANCE AUX PYRÉTHRINOIDES*

1. GENERALITES

Les plus grandes familles d'insecticides utilisés aujourd'hui en agriculture sont : les organophosphorés (37% du marché mondial), les carbamates (21,5%), les pyréthrinoïdes (18,5%), les organochlorés (6,1%), et les régulateurs de croissance (dont les benzoyl urées, < 1%).

Depuis 1945, date où le DDT a été commercialisé, l'utilisation d'insecticides en protection des cultures et dans la lutte contre les vecteurs de grandes endémies n'a cessé de croître.

Si leur utilisation est efficace dans la lutte contre de nombreux ravageurs, des phénomènes de résistance sont cependant notés.

En 1947, les premiers phénomènes de résistance aux insecticides de synthèse apparaîssent (*In :* POIRIE et PASTEUR, 1991).

La majorité des espèces résistantes sont des espèces importantes pour les cultures mais il existe aussi des cas de résistance des espèces d'importance médicale ou vétérinaire comme les mouches et les moustiques (FORGASH, 1984).

A l'heure actuelle, toutes les familles d'insecticides citées posent des problèmes de résistance chez les insectes.

En effet, plus de 500 cas d'espèces d'insectes résistantes aux insecticides ont été recensés (ROUSH et TABASHNIK, 1990 ; GEORGHIOU, 1990), (Tab. I.3).

Tab. I.3 - Evolution du nombre d'espèces d'insectes résistants aux pesticides
Source : (GEORGHIOU, 1990)

Années	Nombre d'espèces	Total
1908	1	1
1909-1918	2	3
1919-1928	2	5
1929-1938	2	7
1939-1948	7	14
1949-1957	62	76
1958-1967	148	224
1968-1978	190	414
1979-1988	90	504

Comme il est particulièrement difficile de recenser tous les cas de résistance, le nombre de 504 espèces résistantes aux pesticides (Fig. I.10) est vraisemblablement sous-estimé, : parfois des échecs de traitements sont peut être des cas de résistance et inversement, des cas de résistance supposés n'en sont pas (techniques d'application, quantité d'eau et de bouillie pulvérisée).

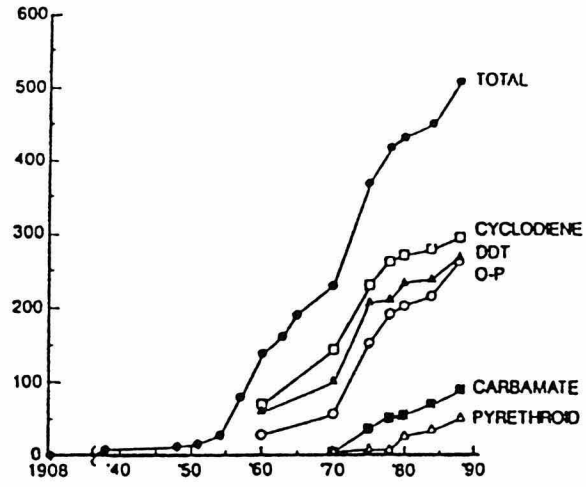


Fig. I.10 - Évolution de la résistance aux insecticides
Source : (GEORGHIOU, 1990)

Tab. I.4 - Nombre d'espèces résistantes suivant les différents groupes chimiques de pesticides
Source : GEORGHIOU, 1990

Groupe chimique	Nombre d'espèces	Pourcentage total
Cyclodiène	291	57,7
DDT	263	52,2
Organophosphoré	260	51,6
Carbamate	85	16,9
Pyréthrinoïde	48	9,5
Fumigant	12	2,4
Autres	40	7,9

On ne peut pas parler de résistance sans donner une définition de ce phénomène.

En 1957, pour l'OMS :

" La résistance d'une souche (ou race) d'insecte vis-à-vis d'un insecticide correspond au développement d'une capacité de tolérer des doses de toxiques qui seraient létales pour la majorité des individus d' une population normale de la même espèce."

Ce phénomène serait une évolution génétique des populations (CROW, 1957) :

" La résistance marque un changement génétique dans la réponse d'un insecte à un insecticide."

Comment peut on expliquer le phénomène de résistance ?

L'exposition des insectes aux insecticides agirait comme une force de sélection (pression de sélection) concentrant progressivement divers facteurs génétiques préexistants au sein des populations et conférant la résistance par des modifications biochimiques et physiologiques.

2. MÉCANISMES BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE LA RÉSISTANCE AUX PYRETHRINOïDES

L'application d'un insecticide de contact sur un insecte se déroule suivant les étapes suivantes :

- **la pénétration de l'insecticide** à travers la cuticule de l'insecte et sa distribution ;

- **la métabolisation** qui transforme l'insecticide liposoluble en molécules hydrosolubles qui seront éliminées plus facilement ;

- **la toxicité** proprement dite de l'insecticide c'est-à-dire l'action au niveau du **site d'action** qui est généralement le système nerveux de l'insecte.

La plupart des mécanismes de résistance connus s'expliquent par la modification d'une ou de plusieurs de ces étapes, (Fig. I.11).

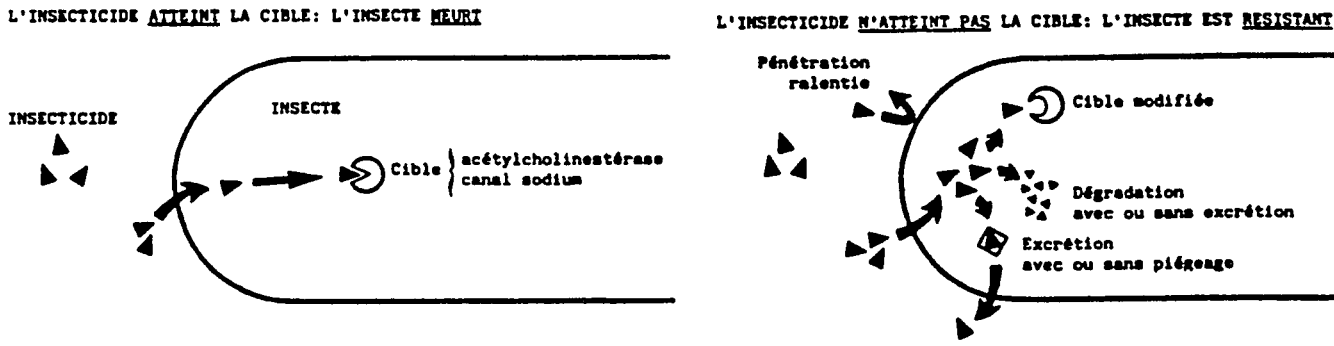


Fig. I.11 - Les mécanismes de résistance aux insecticides
Source : (D'après POIRIE et PASTEUR, 1991)

Les différentes étapes citées, sont contrôlées par au moins un gène dont il peut exister des variants, ou allèles, apparus par mutation.

Les allèles responsables d'une résistance sont ceux qui correspondent à une modification de comportement de l'insecte pour éviter le contact avec l'insecticide ; ces allèles sont appelés "gènes de résistance", (POIRIE et PASTEUR, 1991).

2.1. Modification de la pénétration

Le mécanisme de résistance par modification de la cinétique de pénétration de l'insecticide est un mécanisme qui a été décrit pour la première fois, chez la mouche domestique en 1968.

Le gène correspondant à ce phénomène est appelé gène *pen* (SAWICKI et FARNHAM, 1968 ; PLAPP et HOYER, 1968).

Les modifications de la pénétration del'insecticide sont relativement rares et inefficaces (POIRIE et PASTEUR, 1991) cependant, associées à d'autres facteurs (résistance métabolique) elles peuvent conduire à des taux de résistance relativement importants.

La modification de pénétration s'expliquerait par un changement dans la structure de la cuticule, plus précisément dans la quantité relative de protéines et de lipides (VINSON et LAW, 1971).

2.2. Résistances métaboliques

L'insecticide dans l'organisme, est soumis à diverses réactions enzymatiques le rendant plus hydrophile. Les métabolites ainsi obtenus sont plus faciles à éliminer.

L'étude des réactions de métabolisation permet de déterminer le rôle possible de la détoxication dans la résistance.

Nous rappellerons ici, les différentes réactions de métabolisation qui se font en deux étapes nommées phase I et phase II.

Les réactions de phase I ou phase de fonctionnalisation sont des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse.
Ces réactions contribuent à rendre plus hydrophiles les molécules de xénobiotiques, qui seront ainsi plus réactives pour l'obtention de conjugués.

Les enzymes qui catalysent les réactions de phase I sont :

- les hydrolases (époxyde-hydrolases, carboxylestérases, arylestérases)
- les oxydases (monooxygénases à cytochrome P450, monooxygénases à FAD)
- les réductases.

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison qui permettent de fixer sur les molécules issues de la phase I ou sur des résidus de la molécule mère, des groupements comme : le glutathion, l'acide glucuronique, les oses, le sulfate...
Les composés issus de ces réactions sont ainsi beaucoup plus hydrophiles et donc, plus facilement excrétables.

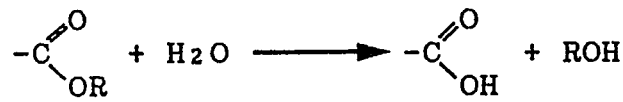
Les réactions de conjugaison sont catalysées par les transférases (glutathion-S-transférases, UDP-glucosyl-transférases, glycine acyl-transférases, sulfotransférases).

2.2.1. Modification des réactions de phase I

Les enzymes de phase I responsables de la métabolisation des pyréthrinoïdes sont des hydrolases et des monooxygénases à cytochrome P450.

2.2.1.1. Les hydrolases

La réaction d'hydrolyse consiste en la rupture d'une liaison ester par fixation d'une molécule d'eau, cette réaction aboutit à la formation d'alcool et d'acide :



Les carboxylestérases ou estérases de type B, jouent un rôle important dans la métabolisation des pyréthrinoïdes (SODERLUND et *al.*, 1983), elles catalysent la rupture de la liaison ester entre la partie alcool et acide de la molécule (Fig. I.12).

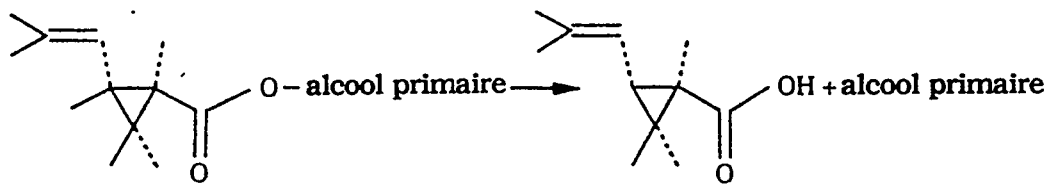


Fig. I.12 - Hydrolyse des pyréthrinoïdes

Les insectes possèdent de nombreuses formes d'estérases dont certaines hydrolysent facilement les pyréthrinoïdes.

Chez certaines espèces la résistance aux pyréthrinoïdes est due à une augmentation de l'activité estérasique.

Chez trois souches de *S. littoralis*, de faibles taux de résistance aux pyréthrinoïdes ont été corrélés à une activité estérasique élevée (RISKALLAH, 1983 ; ISHAAYA et *al.*, 1983).

Chez *Myzus Persicae*, DEVONSHIRE et MOORES, (1982) ont montré que l'estérase E4 était impliquée dans l'hydrolyse de la perméthrine et d'un organophosphoré.

Des études de métabolisme des pyréthrinoïdes et des bioessais en présence de synergistes ont montré qu'une activité estérasique accrue était responsable de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Boophilus microplus*.

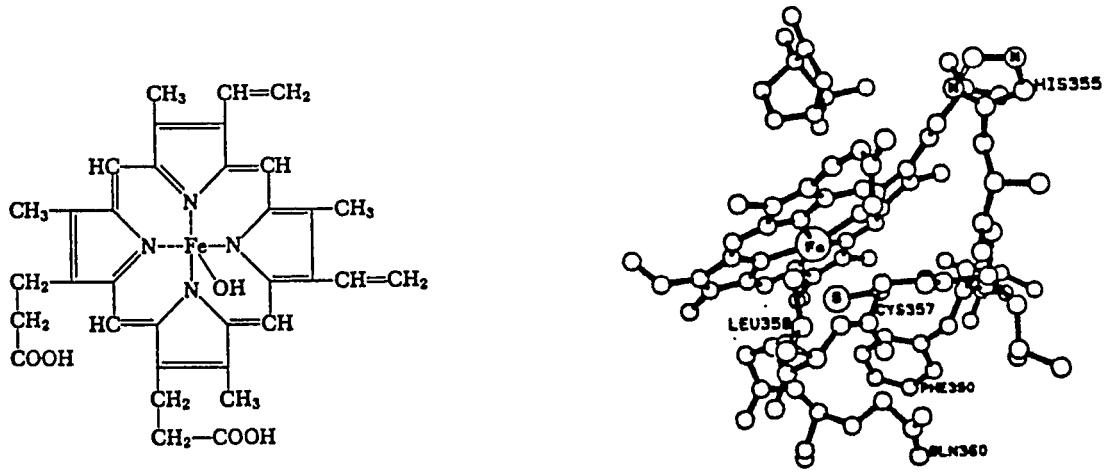
L'hydrolyse est aussi un des mécanismes impliqué dans la résistance à la deltaméthrine chez *S. exigua* (DELORME et *al.*, 1988).

2.2.1.2. Les monooxygénases

Ces enzymes catalysent des réactions de phase I, et sont situées au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries des cellules.

Les monooxygénases à cytochrome P450 sont des enzymes microsomales et leur fonction nécessite du NADPH et de l'oxygène.

Le cytochrome P450 est une hémoprotéine qui présente un spectre d'absorption avec un maximum à 450nm et constitue l'enzyme terminale et la protéine clef du système oxydasique.



A B

Fig. I.13 - A. Structure de l'hème
- B. Structure du cytochrome P450

Cette molécule transfère une atome d'oxygène sur un substrat par l'intermédiaire d'une réaction d'oxydoréduction :

$$RH + O2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + NADP^+ + H2O$$

Les monooxygénases jouent un rôle important dans le métabolisme des insecticides.

Les principales réactions catalysées par ces enzymes interviennent dans la phase de fonctionnalisation des xénobiotiques et conduisent soit à leur activation, soit à leur détoxication.

Les mécanismes réactionnels catalysés par les monooxygénases à cytochrome P450 sont complexes et sont schématisées par le cycle suivant (BERGE, 1987) :

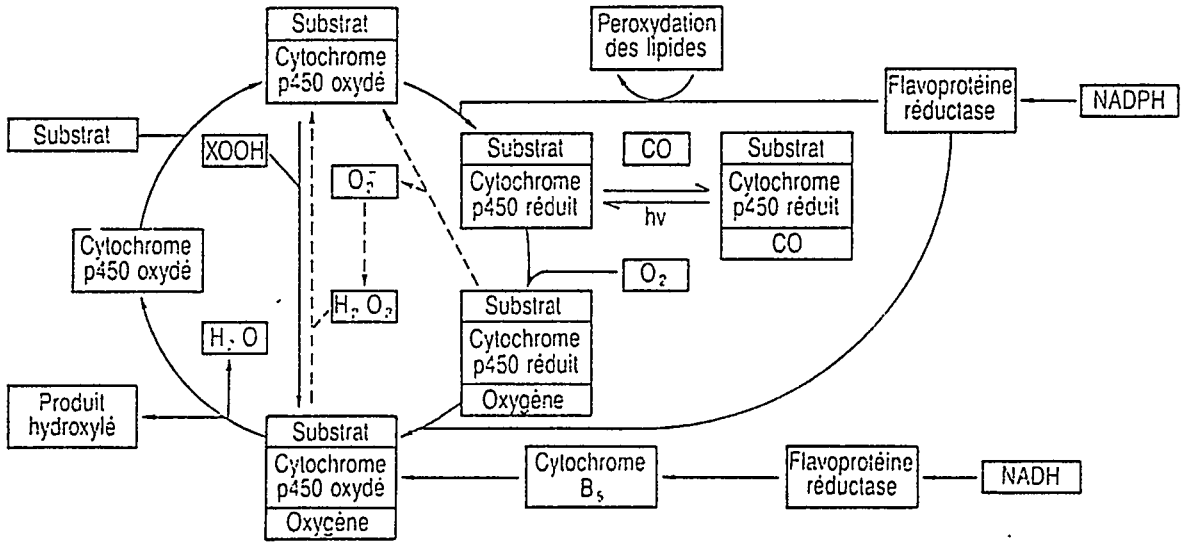


Fig. I.14 - Cycle réactionnel de l'activité monooxygénase
Source : (BERGE, 1987)

Les monooxygénases à cytochrome P450 ont un rôle important dans la métabolisation des pyréthrinoïdes chez les insectes.

Les principales réactions de détoxification catalysées par ces enzymes sont des réactions d'hydroxylation en différents sites de la molécule : en position 2', 4' et 5 du groupement phénoxybenzyl et au niveau du méthyl trans de la partie acide. Les hydroxylations peuvent se produire sur la molécule entière ou bien sur les métabolites résultant de l'hydrolyse de l'ester.

L'apparition de groupements tels que OH, COOH, au niveau des métabolites provenant de l'hydrolyse, permet leur conjugaison ultérieure avec par exemple le glutathion, l'acide glucuronique, le glucose, ou un sulfate.

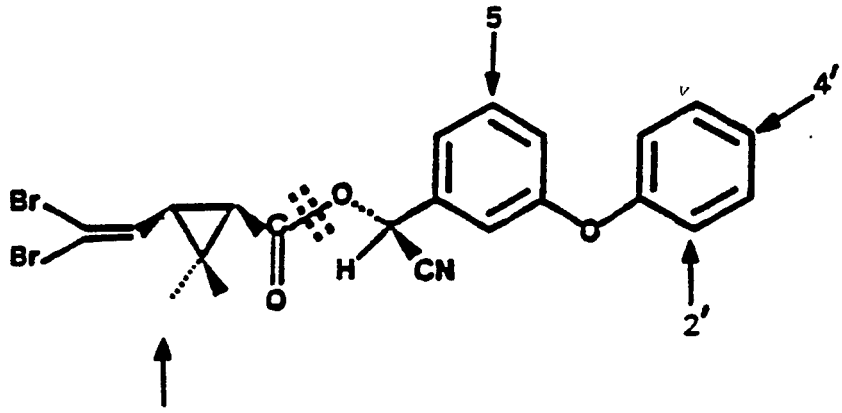


Fig. I.15 - Hydroxylation des pyréthrinoïdes par les monooxygénases à cytochrome P450.

Les monooxygénases à cytochrome P450 catalysent l'oxydation d'un nombre considérable de liaisons. Cette absence de spécificité est due à la multiplicité des cytochromes P450 (HODGSON et PLAPP, 1970 ; HODGSON, 1983).

Différents travaux effectués chez les vertébrés ont permis de montrer que ces protéines sont codées par des gènes de structure de familles différentes. Chez les insectes des études similaires utilisant des méthodes de génétique moléculaire sont en cours (WATERS, et *al.*, 1992 ; KOENER et *al.*, 1993.

Chez les individus sensibles l'activité monooxygénase est généralement assez faible. Par contre, chez des insectes résistants aux insecticides, l'activité de ces enzymes est élevée (SCOTT et LEE, 1993_a) et dégrade ainsi une plus grande quantité d'insecticide, ce phénomène explique l'acquisition de résistances. Cette augmentation d'activité peut s'expliquer par une quantité plus grande de cytochromes P450 mais aussi par la modification du cytochrome impliqué.

Chez *Musca domestica*, YU et TERRIERE, (1979) ont montré que la résistance était corrélée à une différence qualitative au niveau des cytochromes P450. En 1989, FEYEREISEN et *al.*, ont isolé et séquencé un cDNA codant pour un cytochrome P450 chez le même insecte.

La purification de différentes formes de cytochrome P450 intervenant dans la résistance aux insecticides a été réalisée chez *Drosophila melanogaster* (WATERS et NIX, 1988) et chez *Musca domestica* (SCOTT et LEE, 1993_b).

L'utilisation d'anticorps spécifiques des cytochromes, ont permis de mettre en évidence les formes de cytochromes impliquées dans la résistance chez la drosophile (SUNDSETH et *al.*, 1989), et chez la mouche domestique (WHEELOCK et SCOTT, 1992).

L'étude de la biologie moléculaire des cytochromes P450 permettra de déterminer les évenements génétiques responsables de la résistance aux insecticides (WATERS et *al.*, 1992).

2.2.2. Modification de la phase secondaire ou phase de conjugaison

Les transférases glutathion dépendantes jouent un rôle important dans le métabolisme des pyréthrinoïdes et interviennent aussi dans les réactions de conjugaison des organochlorés.

Ces enzymes inactivent les métabolites obtenus en phase I en ajoutant des molécules endogènes, sur ces molécules qui deviennent ainsi plus facile à éliminer (Fig. I.16).

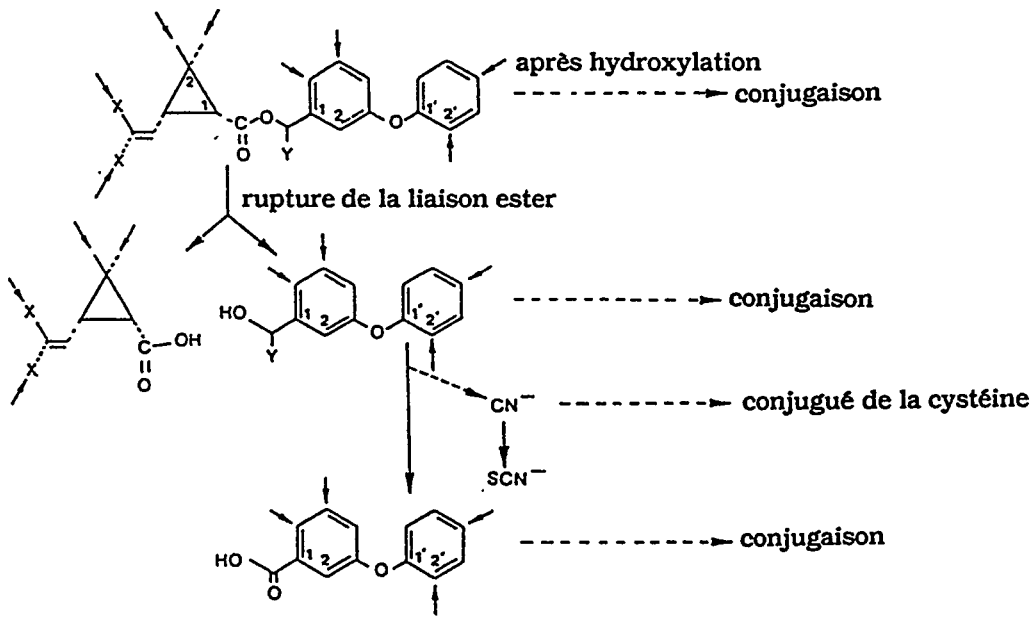


Fig. I.16 - Réactions de conjugaison des pyréthrinoïdes.
Source : (D'après Vijverberg & Oortgiesen, 1988)

Comme pour les estérases et les monooxygénases, plusieurs études ont montré que les glutathion-S-transférases (GST) existaient sous plusieurs formes (CLARK et *al.*, 1984 ; CLARK, 1990).

Chez *Musca domestica*, la résistance peut être corrélée à une augmentation de l'activité des GST, cette augmentation résultant de l'amplification d'une ou plusieurs formes de GST chez la souche résistante. (REIDY et *al.*, 1990 ; FOURNIER et *al.*, 1992)

Un des mécanismes majeurs de résistance au DDT est la déchlorination du DDT en DDE (Fig. I.17).

Cette réaction est catalysée par une GST (CLARK et SHAMAAN, 1984) capable de dégrader le DDT, la DDTase (OPPENOORTH, 1984).

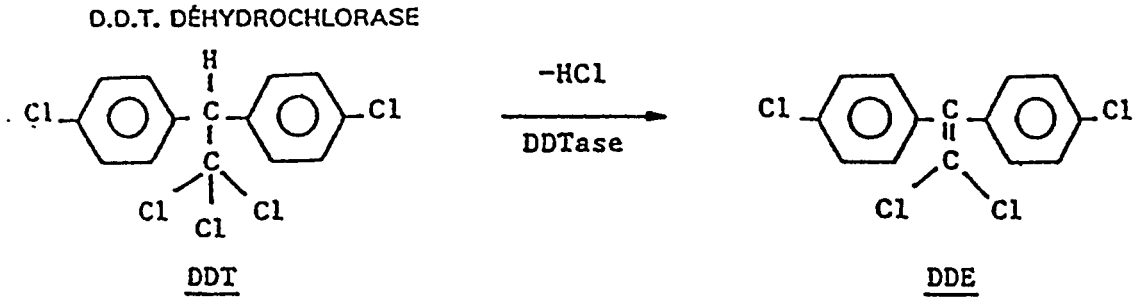


Fig .I.17 - Déshydrochlorination du DDT par une GST.

2.3. Altération des sites d'action

La cible primaire des principaux insecticides est le système nerveux des insectes. Pour les pyréthrinoïdes et le DDT, le blocage de l'influx nerveux se fait au niveau des membranes nerveuses en bloquant en position ouverte les canaux sodium (SODERLUND et BLOOMQUIST, 1989). Ils agiraient également au niveau des pompes à calcium et des Ca-ATPases.

De nombreux cas de résistance s'expliquent par des modifications au niveau de ces différents sites d'action.

2.3.1. Modification du canal Na^+ (gène kdr)

Un facteur conférant la résistance à la fois à l'effet choc ou " knockdown " et à l'effet létal a été observé pour la première fois chez la mouche domestique (BUSVINE, 1951).

En 1957, MILANI et TRAVAGLINO ont localisé le gène responsable de cette résistance et ont montré qu'il s'agissait d'un caractère récessif .

SAWICKI (1978) met en évidence un allèle du gène kdr conférant une résistance plus importante aux pyréthrinoïdes et au DDT, appelé super kdr.

Ce type de résistance aux pyréthrinoïdes et DDT a été décrit chez de nombreuses espèces : chez la punaise des lits (BUSVINE, 1958), les tiques du bétail (WHITEHEAD, 1959 ; NOLAN et al, 1977), les poux (COLE et CLARKE, 1961), les moustiques (PLAPP et HOYER, 1968) certains lépidoptères (GAMMON, 1980 ; NICHOLSON et MILLER, 1985), ainsi que chez les blattes (SCOTT et MATSMURA, 1981).

Cette résistance de type kdr serait dûe à une modification des propriétés de reconnaissance de certaines neurotoxines au niveau du canal sodium.

En effet certains travaux ont été réalisés chez des souches de mouches domestiques kdr résistantes sur la possibilité d'existence de résistance croisée avec certaines neurotoxines.

BLOOMQUIST et MILLER, (1986) ont montré chez des larves ayant une résistance de type kdr qu'il existait une résistance d'un facteur 16 à l'aconitine (alcaloïde de plante) qui est un activateur du transport du canal sodium.

Des bioessais sur des adultes de mouches domestiques montrent la même résistance à un autre alcaloïde qui agirait également sur le même site.

Par contre, les larves de ces souches ne présentent pas de résistance à la tetrodoxine, la procaïne, l'α-toxine du venin de scorpion. Ces toxines sont connues pour agir sur d'autres sites au niveau du canal sodium.

Le mécanisme de résistance kdr a été mis en évidence chez des larves de lépidoptères *S. littoralis* (GAMMON, 1980) et *Heliothis virescens* (PAYNE et *al.*, 1988 ; NICHOLSON et MILLER, 1985).

Différentes études ont été effectuées sur diverses préparations nerveuses d'adultes et de larves d'insectes kdr ou super kdr, résistantes aux pyréthrinoïdes et au DDT.

Ces études portent en général sur la comparaison de sensibilité des préparations nerveuses d'insectes sensibles et résistants.

<u>Chez les adultes</u> les études ont été réalisées sur :

- les ganglions thoraciques (MILLER et al., 1979) ;
- les motoneurones des muscles du vol (SCOTT et GEORGHIOU, 1986) ;
- les motoneurones du muscle de la patte (AHN et *al.*, 1986).

Chez les larves , les préparations nerveuses étudiées sont :
- les jonctions neuromusculaires (SALGADO et *al.* 1983) ;
- les neurones sensitifs (OSBORNE et HART, 1979 ; OSBORNE et SMALLCOMBE 1983).

Dans ces différentes études, on note chez les insectes kdr une sensibilité diminuée du système nerveux à l'insecticide.

Le mécanisme moléculaire de la résistance par le facteur kdr est encore mal connu et plusieurs approches biochimiques sont envisagées pour comprendre ce phénomène.

La première approche est d'utiliser des insecticides marqués et de mesurer leur " binding " au niveau des membranes nerveuses (PAURON et *al.*, 1989. Cependant les résultats sont bien souvent difficiles à interpréter à cause de la faible activité des radioligands utilisés et de leur caractère lipophile (OSBORNE et SMALLCOMBE, 1983).

La seconde approche consiste à mesurer le "binding" de neurotoxines connues (saxitoxine (STX), tetrodotoxine (TTX), batrachotoxine (BTX)) marquées au tritium. Il semblerait que la densité des sites STX/TTX ne soit pas associée au facteur kdr (SATTELLE et al., 1988 ; PAURON et al., 1989) mais avec la résistance métabolique (LIU et PLAPP, 1991).

Récemment, par des méthodes de génétique moléculaire, AMICHOT et *al.*, (1993), WILLIAMSON et *al.*, (1993) et TAYLOR et *al.*, (1993) ont montré que des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour le canal sodium étaient corrélées à une résistance de type kdr.

2.3.2. Modifications des cibles secondaires

Il existe peu d'études sur la modification des cibles secondaires mais, des mutations au niveau du récepteur GABA peuvent entraîner la résistance aux insecticides (cyclodiènes) (FFRENCH-CONSTANT et *al.*, 1993).

2.4. Conclusion

La résistance aux insecticides peut donc correspondre à la modification d'un ou plusieurs mécanismes.

Elle peut être due à une réduction de la pénétration de l'insecticide, une modification qualitative ou quantitative des enzymes de détoxication (estérases, monooxygénases et GST), ou à une modification du site d'action.

Au niveau moléculaire ces modifications sont dues à des phénomènes d'amplification, de mutation ou d'expression d'un gène.

C. SPODOPTERA LITTORALIS *ET LA RÉSISTANCE AUX INSECTICIDES*

Après avoir rappelé le mode d'action des pyréthrinoïdes ainsi que les principaux mécanismes de résistance, nous nous intéresserons au problème de résistance aux insecticides chez *S. littoralis*.

Dans un premier temps, nous présenterons **le ravageur et son importance économique.**

Nous rappellerons ensuite **les différentes méthodes de lutte utilisées contre les ravageurs du cotonnier.**

Puis nous rassemblerons les différentes données concernant **la résistance aux insecticides chez *S. littoralis*** ravageur du coton.

1. *S. LITTORALIS*

S. littoralis est un ravageur important des plantes cultivées, il est présent sur le pourtour méditerranéen, dans les pays du Proche-Orient ainsi que dans les zones équatoriales de l'Ancien-Monde.

S. littoralis est une noctuelle polyphage, on la trouve donc sur de nombreuses plantes cultivées.

Les larves de *S. littoralis* sont en général phyllophages, elles provoquent une défoliation importante sur les plantes. En cas de forte infestation les chenilles s'attaquent également aux organes fructifères, aux tiges et aux boutons floraux (Planche photo n°1, page suivante).

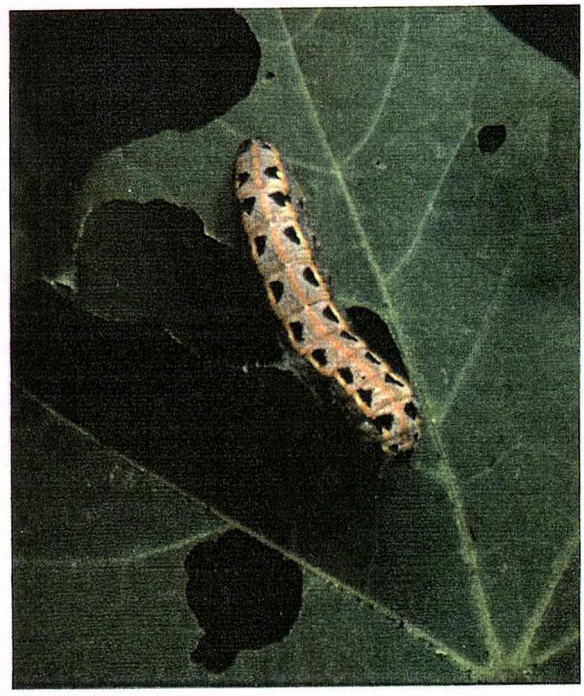
En Afrique de l'Ouest, *S. littoralis* est un ravageur secondaire du cotonnier cependant il peut provoquer de nombreux dégâts sur feuilles et même sur boutons floraux.

A Madagascar, on trouve *S. littoralis* sur coton, tabac, maïs, et arachide.

Dans les pays du Maghreb, *S. littoralis* se retrouve sur les cultures maraîchères et notamment sur la tomate.

PLANCHE n° 1 : DEGATS SUR COTONNIER CAUSES PAR *S. LITTORALIS*

1. Dégâts sur feuille (jeunes larves)



2. Dégâts sur feuille (larves de 5ème stade)

3. Dégâts sur bouton floral (larve de 5ème stade)

En Égypte et au Soudan, *S. littoralis* est présent sur de nombreuses plantes mais c'est le coton qui subit les dégâts les plus importants.

Les larves de *S. littoralis* s'attaquent essentiellement aux feuilles de cotonnier mais peuvent, quand elles sont nombreuses, causer des dégâts sur les boutons floraux et sur les capsules.

Ces dégâts entraînent une diminution de la qualité et de la quantité de coton qui est, du point de vue économique, une des productions les plus importantes en Égypte.

2. DIFFÉRENTES MÉTHODES DE LUTTE UTILISÉES SUR COTONNIER

2.1. Position du coton en Afrique

La production de coton fibre, des pays de la zone franc, qui a connu un accroissement spectaculaire au cours de ces dix dernières années, est exportée en quasi-totalité, à la différence d'autres pays africains, comme l'Égypte et le Zimbabwé (Tab. I.5).

Tab. I.5 - Principaux pays producteurs de coton en Afrique (1992-1993).
Source : (*In* RAYMOND, 1993)

	Production (x1000 t)	Exportations (en % de la production)
Égypte	314	0,5%
Mali	120	97,5%
Côte-d'Ivoire	115	95%
Zimbabwé	88	19,3%
Tanzanie	72	62,5%
Soudan	71	63,4%
** Bénin	65	106%
** Burkina-Faso	65	101%
Nigéria	63	0%
Tchad	50	94%
Ensemble Zone-franc	531	97.5%

** Les exportations peuvent excéder la production : il faut tenir compte des stocks.

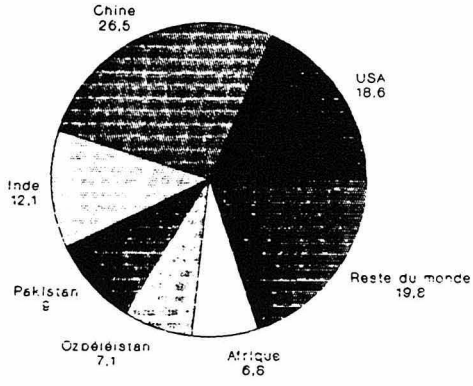


Fig. I.18 : Part de l'Afrique dans la production mondiale de coton-fibre
Source : (*In* RAYMOND, 1993)

Nous avons rappelé ces quelques chiffres afin de situer l'importance économique du coton en Afrique.

Le coton est donc une culture importante pour les divers pays d'Afrique il faut assurer une bonne protection phytosanitaire du cotonnier afin d'avoir une bonne qualité et une quantité de coton.

2.2. Protection du cotonnier

2.2.1. Protection du coton en Afrique :

Les seules méthodes de lutte spécifiques à *S. littoralis* sont l'utilisation de microorganismes entomopathogènes ou l'utilisation de parasitoïdes.

La lutte contre ce ravageur se résume en fait à la lutte contre les lépidoptères ravageurs du coton.

Depuis de nombreuses années le CIRAD travaille en association avec les structures locales dans de nombreux pays d'Afrique.

Actuellement, bien que l'on évolue vers les méthodes de lutte intégrée, la lutte contre les ravageurs du coton est principalement basée sur l'emploi d'insecticides chimiques.

Contre les lépidoptères on utilise en général, dans la zone Afrique Francophone (Ouest et Centre), des associations pyréthrinoïde-organophosphoré qui donnent de très bons résultats.

L'utilisation du mélange cyperméthrine-chlorpyriphos par exemple, assure une bonne protection du cotonnier contre *S. littoralis* (VAISSAYRE, 1985).

Depuis quelques années, le CIRAD essaye de mettre en place des stratégies de lutte intégrée.

2.2.2. Vers une lutte intégrée

Les recommandations actuelles sont les suivantes :

- essayer de passer de l'"Ultra Low Volume" (ULV) 1 à 3 l/ha au "Low Volume" (LV) à l'eau 10 l/ha ;
- utiliser des associations pyréthrinoïdes-organophosphorés ;
- passer à la méthode de seuil économique ;
- utiliser les alternatives à la lutte chimique :
    * Caractères variétaux
    * Attractifs sexuels
    * Entomophages
- Entomopathogènes : Virus de la Polyhédrose Nucléaire (VPN) ou *Bacillus thuringiensis* (B.t). ;
- Plantes pièges.

2.2.3. La résistance des ravageurs du cotonnier aux insecticides

En Afrique francophone, aucun cas de résistance aux insecticides n'a été signalé jusqu'à aujourd'hui sauf à Madagascar ; un réseau de laboratoires de contrôle des DL50 a été mis en place afin de suivre la sensibilité des ravageurs aux insecticides.

Il y a quelques années à Madagascar, *S. littoralis* a causé d'énormes dégâts. Plusieurs souches de différents endroits ont été testées et présentaient une résistance d'un facteur 1000 aux pyréthrinoïdes (JACQUEMARD, 1988).

Face à de tels problèmes de résistance le CIRAD a commencé une étude sur la résistance aux pyréthrinoïdes chez ce ravageur. Les souches disponibles étaient virosées et le CIRAD a abandonné ce thème de recherche.

3. *S. LITTORALIS* ET LA RÉSISTANCE AUX INSECTICIDES

Parmi les cas de résistance aux insecticides, nous développerons celui de la résistance de *S. littoralis* vis-à-vis des pyréthrinoïdes en Égypte.

Depuis les années 1950, *S. littoralis* anciennement appelé *Prodenia litura*, est l'un des principaux ravageurs du coton en Égypte.

Les dégâts causés par ce ravageur, peuvent aller jusqu'à la destruction de plus de 10% de la culture.

La récolte des ooplaques situées sur les feuilles fût la première solution envisagée pour lutter contre ce ravageur ; c'est une méthode très efficace mais qui demande un travail considérable et beaucoup de main d'oeuvre.

La lutte chimique, contre *S. littoralis* a débuté avec l'apparition des premiers organochlorés tel que le DDT.

Dans les années 50 à 60, on utilise des mélanges DDT/HCH, puis, le toxaphène (communication de la firme N.V. Hercules lowder...).

Dans les années 60 à 70, plusieurs traitements chimiques sont effectués avec des produits comme le lindane, le carbaryl, l'endrine...

La récolte des oeufs à la main est resté encore un des meilleurs moyens d'éliminer le ravageur ; ce qui confirme les résultats obtenus avec les insecticides à action ovicide (ABOU EL GHAR, 1963).

L'apparition de produits comme les organophosphorés, permet un bon contrôle du ravageur.

Les premiers cas de résistance aux organochlorés, aux organophosphorés et aux carbamates apparaîssent en Égypte au début des années 70.

Face à ces problèmes de résistance, de nombreux auteurs étudient l'action des pyréthrinoïdes sur *S. littoralis* et suivent l'évolution possible de résistance à ces nouveaux insecticides.

Depuis 1974 jusqu'à aujourd'hui, des contrôles de sensibilité de *S. littoralis* sont effectués assez régulièrement.

Dès 1975, des phénomènes de résistance aux pyréthrinoïdes apparaîssent en champ.

Depuis 1974, EL-GUINDY et son équipe se sont préoccupés de détecter d'éventuelles résistances aux pyréthrinoïdes couramment utilisés contre les souches de terrain de *S. littoralis* (EL-GUINDY et al., 1982). EL-GUINDY pense qu'il s'agit d'un phénomène de résistance croisée ou de résistance multiple aux différentes familles d'insecticides chimiques.

Afin de bien situer le sujet, voici un résumé des données que l'on possède sur l'évolution de la résistance à divers produits chez des souches venant de la province Sharkia en Égypte.

Tab. I.6 - Facteurs de résistance à divers insecticides chez *S. littoralis* dans la province Sharkia en Égypte

Source : (EL-GUINDY et *al.*, 1982 ; ISSA et *al.*, 1985 ; KEDDIS et *al.*, 1988 ; AYAD et *al.*, 1989)

	Cyperméthrine	Deltaméthrine	Chlorpyriphos-éthyl	Monocrotophos	DDT
1975	4,9	-			
1976	7,5	-			
1978	5	2,1			
1979	11,3	10			
1980	3,3	10			
1981	10,5	10			
1982	1,5	2			
1983	5,5	1,8	1,21		4,3
1984	4,2	3,2			
1986	2,57	10	5,6	129	
1987	12,8	83,6	10,8		
1988	5,4	91	11,6		

Depuis plusieurs années on a donc de forts taux de résistance aux pyréthrinoïdes chez *S. littoralis* dans la province Sharkia et, également suivant les années, des résistances importantes à certains organophosphorés.

Les études menées sur les mécanismes de résistance chez *S. littoralis* en Égypte, montrent que la résistance aux organophosphorés et aux carbamates est dûe à de fortes activités estérasiques.

En effet ces activités enzymatiques sont élevées chez les souches résistantes alors qu'elles sont beaucoup plus faibles chez les souches sensibles (RISKALLAH et *al.*, 1979).

En 1982, EL-SAYED et *al.*, montrent que la résistance au monocrotophos est dûe à une pénétration ralentie, une biodégradation et une excrétion plus élevées chez la souche résistante que chez la souche sensible (EL-SAYED et *al.*, 1982).

SALEH et *al.*, (1986) ont mis en évidence une forte activité estérasique chez une souche égyptienne de *S. littoralis* présentant une résistance importante au fénithrotion .

NOMHEIR réalise une étude comparative en 1987, sur l'activité des systèmes oxydasiques et des glutathion-S-transférases chez une souche résistante aux organophosphorés et une souche sensible. Les activités enzymatiques sont toujours plus élevées chez la souche résistante (NOMEIR. et *al.*, 1987).

D'autres auteurs (KEDDIS et *al.*, 1986 ; AHMED et *al.*, 1987) ont abordé les problèmes d'apparition de résistance aux benzoyl phényl urées qui sont des inhibiteurs de croissance. La toxicité de ces produits vis-à-vis de souches résistantes aux autres familles d'insecticides a été testée. Il semblerait qu'il n'y ait pas de résistance croisée entre ces dérivés de l'urée et les autres familles d'insecticides (AHMED et *al.*, 1987).

Par ailleurs des larves résistantes au monocrotophos, sont plus sensibles aux urées que les larves sensibles ; ces résultats sont encourageants pour l'application de ces produits en champs (EMAM et DEGHEELE, 1988).

L'utilisation de dérivées d'urée, est à l'heure actuelle une des solutions au problème de résistance aux insecticides chez *S. littoralis* bien que des études montrent que des résistances d'un facteur 300 peuvent apparaître sous pression de sélection au laboratoire très rapidement et en champ également (KEDDIS et *al.*, 1986).

Les travaux sur la résistance aux pyréthrinoïdes chez *S. littoralis* en Egypte sont surtout des études sur l'apparition et sur la gestion de la résistance.

En 1983, ABO-EL-GHAR et son équipe effectuent une pression de sélection chez une souche de *S. littoralis* avec du fenvalérate et de la deltaméthrine ; la résistance apparaît en 22 générations avec un facteur de l'ordre de 30 pour le fenvalérate et de 21 pour la deltaméthrine.

Une étude similaire a été réalisée en 1984, pour le flucytrinate et le fenvalérate. La résistance apparaît au bout de sept et quatre générations avec des facteurs de résistance de l'ordre de 14 et 16 (SUBIHA et *al.*, 1984).

L'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes de détoxication comme le DEF (Inhibiteur d'estérases) et le PB (inhibiteur d'oxydases) augmentent la sensibilité de certaines souches résistantes aux pyréthrinoïdes ; l'activité de ces enzymes semble liée à la résistance (EL-NASSAR et *al.*, 1983 ; ISHAAYA et *al.*, 1983).

Des travaux récents sur l'induction des enzymes de détoxication chez S. littoralis ont montré que la résistance aux pyréthrinoïdes serait en partie d'ordre métabolique (LAGADIC et CRESTEIL, 1993 ; LAGADIC et *al.*, 1993).

4. CONCLUSION

S. littoralis est un ravageur secondaire du cotonnier dans de nombreux pays, mais en Egypte cette espèce cause de nombreux et important dégâts.

L'utilisation massive d'insecticides chimiques nécessaire à la protection phytosanitaire du coton a fait apparaître en Egypte depuis les années 70, des problèmes de résistance aux insecticides chez *S. littoralis*.

Plusieurs auteurs ont étudié l'apparition de ces phénomènes de résistance à différents insecticides afin de proposer des solutions pour la gestion de la résistance sur le terrain.

L'utilisation en alternance, de divers insecticides de familles différentes a permis d'atténuer la résistance mais des phénomènes de résistance croisée sont rapidement apparus.

De nombreuses études en laboratoire ont été menées, mais à l'heure actuelle les mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes chez ce ravageur d'origine égyptienne sont encore mal connus.

D. BUT DE NOTRE ÉTUDE

Les cas de résistance aux insecticides évoluent et peuvent entraîner des pertes énormes sur des cultures comme le coton.

Connaissant les méthodes de lutte utilisées contre les ravageurs du coton en Égypte et en Afrique, il nous a paru intéressant d'étudier les mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes chez un ravageur qui a déjà causé beaucoup de problèmes à Madagacar, en Égypte, en Israël, en Turquie : *S. littoralis.*

Toute notre étude est basée sur une comparaison entre une souche résistante et une souche sensible aux pyréthrinoïdes.

Dans un premier temps, nous décrirons la biologie du ravageur, les souches utilisées, la pression de sélection à la deltaméthrine, ainsi que les méthodes d'élevage utilisées.

Dans un second temps, nous étudierons le spectre d'activité de différents insecticides sur les deux souches résistante et sensible.

Nous rechercherons ensuite les différents mécanismes de résistance à la deltaméthrine.

Une première partie est consacrée à l'étude de la pénétration transcuticulaire de l'insecticide et à la recherche de modification de l'activité enzymatique.

Nous avons étudié ensuite la métabolisation *in vitro* et *in vivo* de la deltaméthrine.

Nous avons ensuite recherché une modification de la cible de l'insecticide ceci par des mesures d'electrophysiologie.

Après l'étude des mécanismes de résistance nous avons envisagé, afin de mieux comprendre le phénomène, d'étudier l'hérédité de la résistance.

Un dernier chapitre de conclusion et discussion terminera le document.

CHAPITRE II

BIOLOGIE ET CONDITIONS D'ÉLEVAGE DE *S. LITTORALIS*

1. PRÉSENTATION DU RAVAGEUR

1.1. Position systématique

S. littoralis (Boisduval) est un insecte lépidoptère de la famille des *Noctuidae*, sous-famille des *Amphyrinae*, groupe des *Trifinae*.

Communément, cette espèce est appelée : ver du cotonnier, en anglais : the Egyptian cotton leafworm.

Cette espèce a été longtemps inséparable de *Spodoptera litura* (Fabricius).

Ces deux espèces ne diffèrent que par les armatures génitales des adultes ; les larves de couleur variable, se ressemblent beaucoup et peuvent être confondues.

1.2. Répartition géographique

S. littoralis est une espèce présente, en Afrique, aux îles mascareignes (Seychelles, Madagascar, Comores, Aldabra, La Réunion, Maurice) ; on la trouve également dans le bassin méditerranéen et au Proche Orient (Fig. II.1).

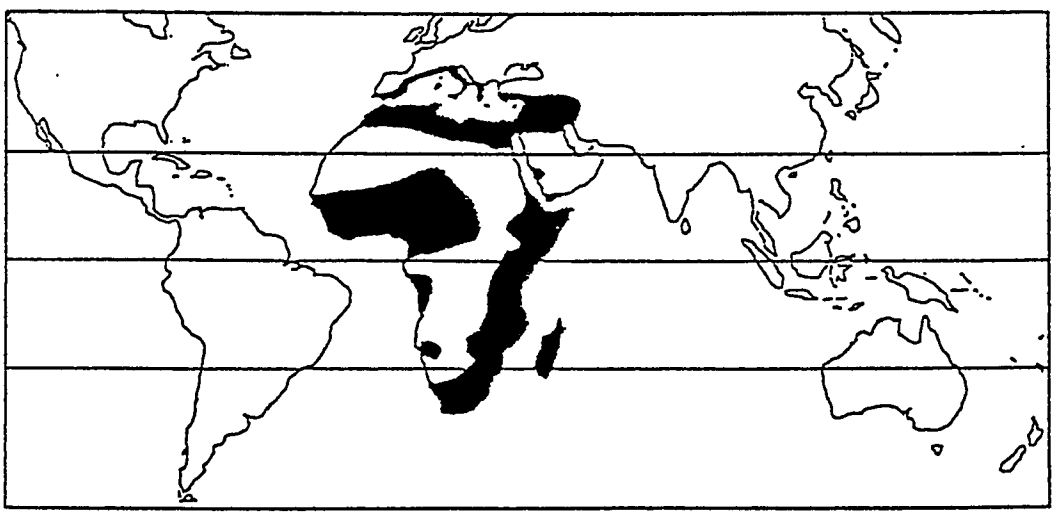


Fig. II.1 - Répartition géographique de *S. littoralis*
Source (HILL et WALKER, 1988)

S. litura est présente en Inde, en Asie, au Pakistan et en Australie (Fig. II.2).

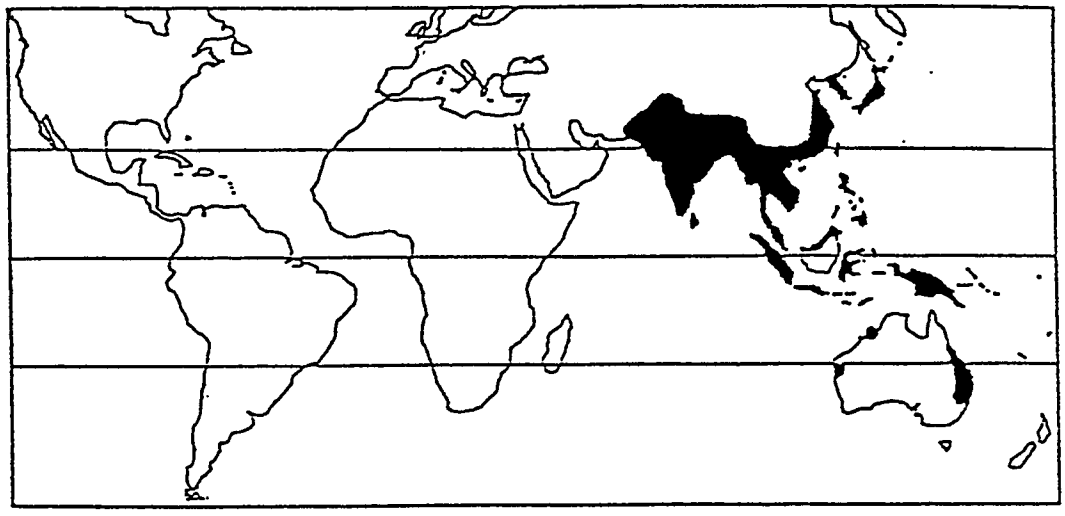


Fig. II.2 - Répartition géographique de *S. litura*
Source (HILL et WALKER, 1988)

1.3. Description et biologie

1.3.1. Description de *S. littoralis* (Planche photo n°2 deux pages plus loin)

L'adulte (Photos 1 et 6)

Le papillon mesure de 30 à 35 mm d'envergure.

Les ailes antérieures, sont brunes avec une ornementation variable de lignes blanches.

Les ailes postérieures sont de couleur blanchâtre.

L'ensemble du corps est de couleur brune.

Les papillons se nourrissent du nectar des fleurs, ils s'accouplent et pondent la nuit.

Les oeufs (Photo 2)

Le diamètre des oeufs est de 0,4 mm. Ils sont sphériques avec de fines nervures costales et de couleur vert nacré.

Les oeufs sont pondus sur la face inférieure des feuilles en amas de plusieurs centaines et recouverts d'écailles : ce sont des ooplaques.

Une feuille compte deux à trois pontes.
Une femelle peut pondre 1.500 à 2.000 oeufs.
L'éclosion a lieu deux à six jours après la ponte.

Les larves (Photos 3 et 4)

Les très jeunes larves sont blanc-jaunes, parfois grises, avec une tête noire.

Durant les trois premiers stades larvaires les jeunes larves restent regroupées puis vers la fin du 3ème stade, elles se dispersent mais restent sous les feuilles pour se protéger de la lumière.

Les larves rongent le parenchyme, occasionnant des tâches transparentes puis des trous de plus en plus gros (Photo 3).

Selon BALACHOWSKY (1972), les chenilles plus âgées deviennent brunes avec des lignes dorsales et médianes plus foncées. la face inférieure de la chenille est plus claire ; les pattes sont noires (Photo 4).

Au 6ème stade larvaire la chenille a atteint sa taille maximale qui peut être de 40 mm de long.

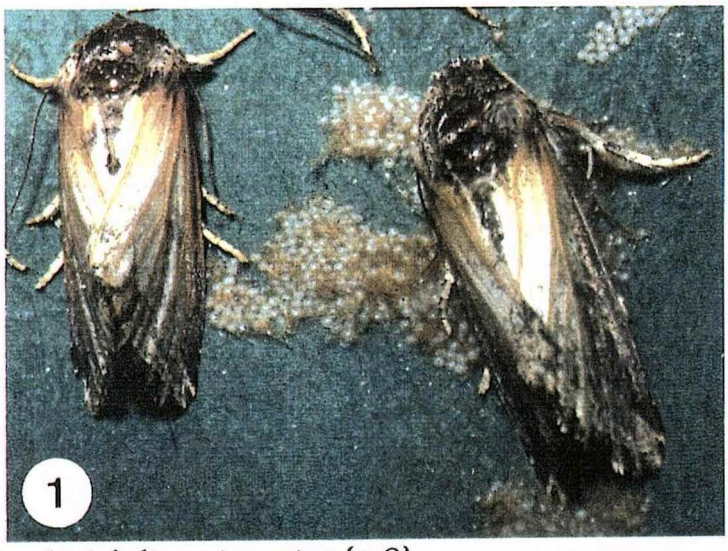
Les chenilles de 6ème stade, passent la journée immobile, sous les feuilles ou sur le sol et la nuit remontent et dévorent les feuilles (BALACHOWSKY, 1972).

Le stade nymphal (Photo 5)

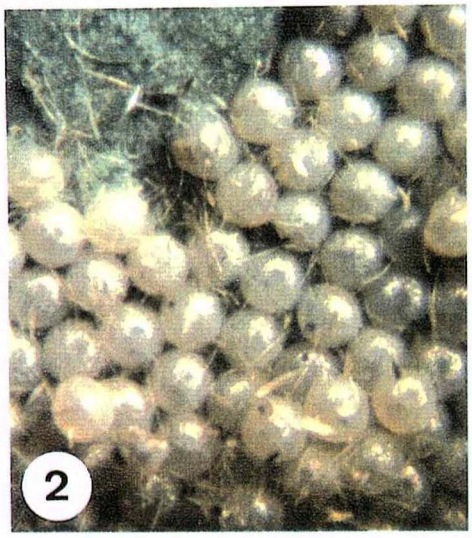
Les larves âgées effectuent leur nymphose dans le sol (2,3 cm de profondeur) et la métamorphose dure de six à 11 jours.

Les chrysalides sont de couleur brun rouge. A ce stade, on distingue facilement les mâles des femelles.

PLANCHE n° 2 : BIOLOGIE DE *S. LITTORALIS*



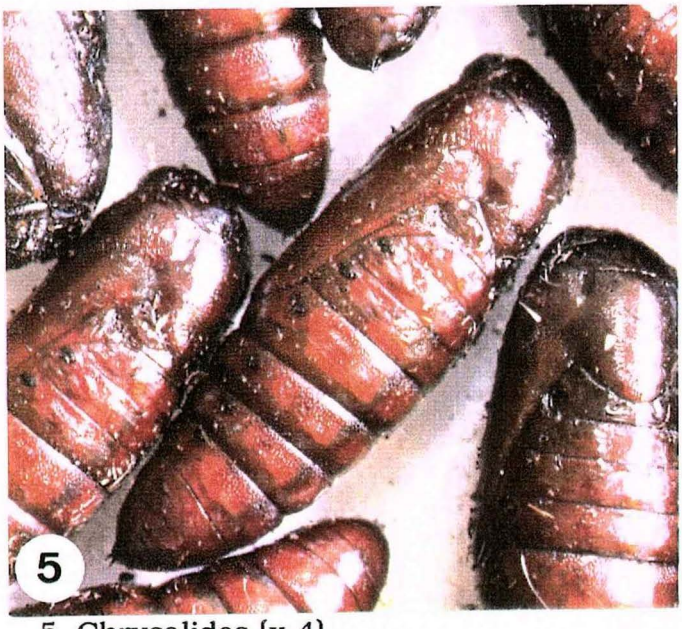
1. Adultes et pontes (x 2)



2. Oeufs (x 20)

3. Néonates (x 3)

4. Larve de 5ème stade (x 3)



5. Chrysalides (x 4)

6. Adulte (x 8)

1.3.2. Le cycle biologique

La durée du cycle est de 29 jours à 25°C et à 70% d'humidité relative. La durée est variable sur le terrain. En fonction de la température et de l'humidité, le cycle peut durer de 24 jours quand il fait très chaud, à 35 jours en saison froide.

Des températures de 40°C entraînent des mortalités élevées des oeufs et des larves.

S. littoralis est une espèce sans diapause.

Le nombre de générations par an est variable suivant les régions. Il peut aller de trois à dix générations par an ; en Egypte, il est de sept à huit générations par an.

Suivant les saisons, on retrouve *S. littoralis* sur différentes plantes.

En Egypte, on dénombre sept générations par an de *S. littoralis* dont trois sont sur coton : la première de mi-mai à mi-juin, la seconde de mi-juin à mi-juillet et la troisième au mois d'août.

Les quatre autres générations sont sur d'autres plantes hôtes comme le Maïs ou le Trèfle.

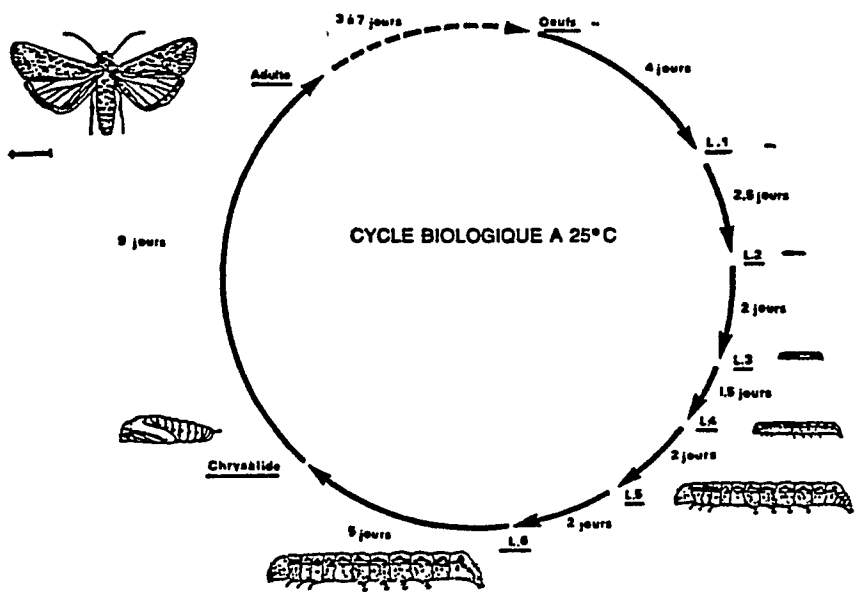


Fig. II.3 - Cycle biologique
Source (Communication personnelle de BOURNIER, CIRAD)

2. TECHNIQUES D'ÉLEVAGE DE *S. LITTORALIS*

2.1. Élevage de *S. littoralis*

La technique d'élevage en laboratoire a été progressivement mise au point au Laboratoire d'Elevage et de Nutrition des Insectes (LÉNI-CIRAD-CA, Montpellier) par COUILLOUD et GIRET, (1980), afin d'obtenir un élevage de masse permettant d'avoir un nombre important de larves nécessaires à nos expérimentations.

L'élevage s'effectue dans une cellule climatisée dont les conditions sont les suivantes :

Tab. II.1 - Conditions d'élevage de *S. littoralis*

Température	25°C ± 1°C
Humidité relative	70% ± 5%
Photophase-Scotophase	12h-12h

La température et l'humidité sont relevées tous les jours sur un thermohygromètre.

Afin d'avoir une production suffisante de larves pour les tests de toxicité, l'élevage est réalisé sur un milieu artificiel dérivé du milieu de Poitout (INRA Avignon), (COUILLOUD et GIRET, 1978 et 1980).

Composition du milieu :

Le maïs, la levure de bière, le germe de blé et la nipagine sont mélangés dans trois litres d'eau.

L'agar et l'acide benzoïque sont mélangés dans cinq litres d'eau portée à ébullition, puis ajoutés aux trois litres du mélange précédent en agitant. A 40°C, on ajoute l'acide ascorbique.

Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes et reste sous les UV pendant une heure ; il est ensuite conservé dans une chambre froide à 4°C.

Tab. II.2 - Composition du milieu artificiel

	Constituants	Quantité
Support	Eau Agar-agar	8 litres 187,2 grammes
Substance végétale	Farine de maïs Germe de blé	1 310 grammes 351 grammes
Autres constituants	Acide ascorbique Acide benzoïque Nipagine Levure de bière	46,8 grammes 15,6 grammes 14 grammes (dilué/31,2 ml d'éthanol absolu) 351 grammes

Conduite de l'élevage de *Spodoptera littoralis*

- Les adultes :

Les adultes sont placés dans des boîtes parallélépipédiques, en polystyrène (288 x 278 x 90 mm), dont le couvercle est grillagé.

Cette boîte est utilisée comme pondoir et renferme un abreuvoir d'eau sucrée à 10 % et deux bandes de papier cartonné, servant de supports de ponte.

Chaque pondoir contient huit à dix couples.
A chaque génération, plus de dix pondoirs sont constitués.

Une fois la ponte effectuée, on récupère les bandes de papier tous les jours afin d'avoir des larves de même âge. Les bandes de papier sont découpées et transférées dans de petites boîtes rondes grillagées (diamètre : 105 mm ; hauteur : 75 mm) contenant une bande de milieu nutritif.

Les pontes issues de différents pondoirs sont mélangées.

L'ensemble est couvert d'un carton ne laissant passer la lumière qu'à la base ; le milieu se trouvant du côté de la lumière, les jeunes larves iront le coloniser.

- Les chenilles :

Le support de ponte est retiré une fois que les jeunes larves ont colonisé le milieu.

Lorsque les larves atteignent une taille comprise entre cinq et 10 mm, elles sont transférées dans des boîtes plus grandes identiques aux pondoirs contenant des bandes de milieu de un cm d'épaisseur.

Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

Au dernier stade les larves (50 à 100) sont placées dans des boîtes contenant de la tourbe (deux à trois cm) et du milieu nutritif posé sur une grille afin d'éviter le contact avec la tourbe.

- La nymphose :

Elle a lieu dans la tourbe.

Les chrysalides sont prélevées triées par sexe et placées dans des boîtes propres en attendant l'émergence des adultes.

2.2. Description des souches étudiées

Souches sensible et résistante

La souche sensible est originaire d'Israël, et nous a été fournie par l'INRA la Minière.

Cette souche est élevée au laboratoire depuis plusieurs années dans les conditions décrites ci-dessus et a été exempte de tout traitement insecticide ; nous utiliserons cette souche comme souche de référence.

La souche résistante vient d'Egypte de la province Sharkia et nous a été fournie par Roussel Uclaf (Procida Marseille).

Cette souche présente une résistance aux pyréthrinoïdes en général, le but de notre étude sera de déterminer les mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes chez cette souche de *Spodoptera littoralis* venant d'Egypte.

La souche sensible est appelée souche S, la souche résistante souche R.
La plupart des expérimentations, qu'il s'agisse des tests de toxicité ou des tests biochimiques sont effectués sur des larves de 4ème à 5ème stade.

Le choix des larves est effectué en fonction de leur taille et de leur poids ; ces deux critères constituant un bon moyen d'avoir des larves de même stade. La mesure la largeur de la capsule céphalique des larves est également caractéristique des stades.

Souche construite

Afin d'étudier l'héritabilité de la résistance, nous avons effectué des croisements entre souche sensible et souche résistante, ainsi que des backcross entre la génération F1 et la souche parentale sensible.

Protocole et déroulement des croisements

Deux types de croisements ont été effectués :

* le croisement des adultes femelles de la souche sensible et des mâles de la souche résistante ; la génération obtenue à partir de ces croisements est appelée génération F1.

* le croisement des adultes mâles sensibles et des femelles résistantes ; la génération obtenue à partir de ces croisements est appelée génération F'1.

Un croisement inverse ou backcross est ensuite réalisé :

* les adultes de la génération F1 seront croisés avec les adultes de la souche parentale la plus éloignée : sensible.

Des tests de toxicité de la deltaméthrine seront réalisés sur ces différentes souches.

2.3. Problèmes posés par l'élevage de masse :

Espace d'élevage :

Le problème majeur posé par l'élevage de masse est l'espace offert aux larves.

Ce facteur intervient essentiellement pendant les derniers stades de développement larvaire, et a une influence directe sur le taux de nymphose et sur la proportion d'adultes obtenus à partir des chrysalides.

Cet espace d'élevage, représenté par la surface de tourbe disponible par larve qui doit être de 3 à 4 cm^2 par larve pour obtenir un taux de nymphose satisfaisant de l'ordre de 80-85% ; dans ces conditions la mortalité du stade nymphal reste inférieure à 10% (COUILLOUD et GIRET, 1980).

En pratique ceci revient à mettre environ 100 larves sur la tourbe pour avoir 90 adultes.

Cannibalisme :

Un autre problème dû au manque de nourriture, est le cannibalisme qui affecte surtout les larves de 4ème stade. Cet inconvénient est très bien résolu si l'on renouvelle souvent le milieu et est beaucoup moins important que chez d'autres lépidoptères comme *Heliothis armigera* par exemple.

Virose :

L'inconvénient majeur que l'on retrouve très souvent dans l' élevage de souches de terrain est la présence dans la population d'une virose latente.

Nous avons mis en évidence la présence de cette virose chez la souche résistante de *Spodoptera littoralis*. Il s'agit du virus de la polyhédrose nucléaire.

Cette virose peut se déclencher sous l'influence de différents facteurs (stress, variation de température, d'humidité, manque d'espace...) et peut très rapidement entraîner une mortalité larvaire très importante et même la perte de la souche.

Il faut donc veiller à maintenir les meilleures conditions d'élevage possible au niveau sanitaire, espace et alimentation afin d'éviter tout facteur externe de stress et ainsi de diminuer au maximum la mortalité.

Dérive génétique :

Le problème de la consanguinité peut aussi être un inconvénient et causer, à long terme, des problèmes de stérilité, mais aussi des problèmes de dérive génétique comme la perte de certains allèles ou la variation dans la fréquence de certains allèles.

CHAPITRE III

SPECTRE D'ACTIVITE DE DIFFERENTS INSECTICIDES SUR LES DEUX SOUCHES

1. INTRODUCTION

Toute étude de la résistance aux insecticides implique une parfaite connaissance de l'activité des différents produits sur les populations concernées.

Le paramètre le plus souvent utilisé pour définir cette activité est la DL50 (dose d'insecticide à appliquer pour tuer 50% de la population).

La DL50 représente l'activité de la molécule insecticide, son efficacité est indiquée par la pente de la droite de régression dose-mortalité.

Cette droite est obtenue par l'analyse statistique probit (FINNEY, 1971) des mortalités causées par des doses croissantes de l'insecticide étudié, sur un échantillon représentatif de la population.

Dans ce chapitre, après avoir défini les méthodes de tests utilisées, nous présenterons les résultats obtenus avec les populations sensibles et résistantes de *S. littoralis* avec plusieurs insecticides de différentes familles chimiques.

2. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR UN TEST INSECTICIDE

2.1. Les solutions insecticides

Pour calculer la DL50 d'un insecticide et établir en même temps une relation dose-mortalité, il est nécessaire d'appliquer sur des lots d'insectes une série de cinq à six doses en effectuant plusieurs répétitions.

Le choix des doses est fait à partir d'une recherche préliminaire de la DL50 de façon à cerner les 50% de mortalité.

On choisira alors des doses entraînant de 0% à 100% suivant une progression géométrique de raison r :

$$\log r = (\log x_n - \log x_1) / n-1$$

x_n = Dose la plus forte x_1 = Dose la plus faible
n = Nombre de doses

Les matières actives (m.a.) insecticides sont diluées dans l'acétone qui est un bon solvant pour la plupart des matières actives. L'acétone à faible dose n'est pas toxique pour les larves d'insectes.

La solution mère d'insecticide (50ml) est conservée au réfrigérateur (un mois). Les différentes doses sont préparées extemporanément par dilution de cette solution pour chaque test.

La DL50 sera exprimée en : **µg de m.a. / g d'insecte**

2.2. Constitution des lots expérimentaux de larves

Le choix du matériel biologique est très important. En effet, pour avoir un essai significatif, il faut choisir un échantillon représentatif de la population, le plus homogène possible.

Critères de choix des larves :

- Classe de poids

L'échantillon étant relativement faible (30 insectes par dose au minimum), les chenilles sont réparties en classe de poids afin de préserver la répartition pondérale de la population initiale.

Trois classes de poids sont ainsi constituées pour chaque dose.

Les chenilles sont pesées individuellement avec une balance de précision (METTLER AE163) et sont réparties par classe de poids.

La moyenne des poids sera précisée pour chaque essai.

- Stade larvaire

Une étude menée au laboratoire a montré que le facteur de variation de la toxicité d'un insecticide, est non seulement le stade larvaire mais surtout l'âge de la larve par rapport à la mue (MIANZE, 1985).

Les larves en prémue se débarrassent rapidement de leur exuvie lors de la pénétration de l'insecticide dans la cuticule ; l'action du produit peut donc varier considérablement. Le choix du stade larvaire est donc important.

Tenant compte de ce facteur, pour tous nos tests insecticides par application topique, nous avons prélevé des larves de début de 4ème stade juste après la mue.

Chez *S. littoralis*, les larves venant de muer sont facilement reconnaissables à la couleur de leur cuticule qui est très sombre.

- Nombre d'insectes par lot

Un effectif de 30 insectes par dose est satisfaisant.

Au cours des essais, nous avons testé cinq à six doses d'insecticide sur 30 larves par dose, plus un lot témoin, ce qui fait en moyenne 200 larves par

Chaque essai est répété trois fois.

Une fois pesées, les larves sont réparties individuellement dans des boîtes alvéolées, contenant un film de milieu nutritif de cinq millimètres d'épaisseur.

Les larves peuvent alors recevoir le traitement.

2.3. Les applications d'insecticides

2.3.1. Traitement par application topique

Les traitements insecticides sont réalisés à l'aide d'un microapplicateur automatique de Arnold (ARNOLD, 1965).

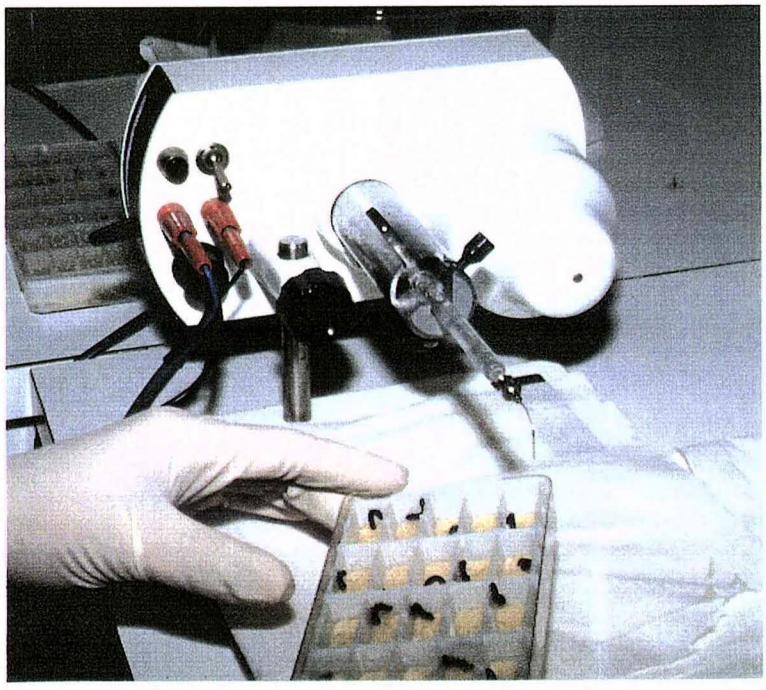


Fig. III.1 - Microapplicateur de Arnold

Le microapplicateur délivre des gouttelettes de volume compris entre 0,1 μl et 1 μl.

La gouttelette de solution acétonique se forme à l'extrémité de l'aiguille et est déposée sur le troisième segment thoracique de la chenille (l'acétone s'évapore et un mince film insecticide se dépose sur la cuticule de l'insecte).

Le traitement est effectué dans une pièce du laboratoire où la température est régulée à 25°C pour éviter une influence de la température sur l'action des insecticides.

Le volume de la solution insecticide déposée par insecte est de 1 μl pour 100 mg d'insecte.

Les doses sont appliquées de façon croissante afin d'éviter toute erreur due au dépôt de matière active sur les parois de la seringue et en particulier pour les pyréthrinoïdes.

Pour chaque essai, on constitue un lot témoin qui est traité avec de l'acétone pure.

On utilise une seringue pour chaque classe d'insecticide. Entre chaque essai la seringue est passée aux ultrasons et rincée plusieurs fois à l'acétone.

Une fois que le traitement insecticide est terminé, les larves sont replacées dans les conditions d'élevage à température et humidité constantes.

2.3.2. Les insecticides testés

Nous avons étudié le spectre d'activité de différents insecticides sur deux souches S et R de *S. littoralis* pour calculer les coefficients de résistance de la souche résistante, nous avons effectué plusieurs essais avec plusieurs familles d'insecticides : pyréthrinoïdes, organophosphorés, organochlorés (Tab. III.1).

Après avoir établi le spectre d'activité des différents insecticides sur les deux souches sensible et résistante nous avons étudié l'action de la deltaméthrine sur les souches construites afin de déterminer l'hérédité de la résistance.

Des tests de toxicité seront effectués sur les différentes générations.

Tab. III.1 - Insecticides testés

Produits	Formule
Deltaméthrine	
Cyperméthrine	
Chlorpyriphos-éthyl	
DDT	

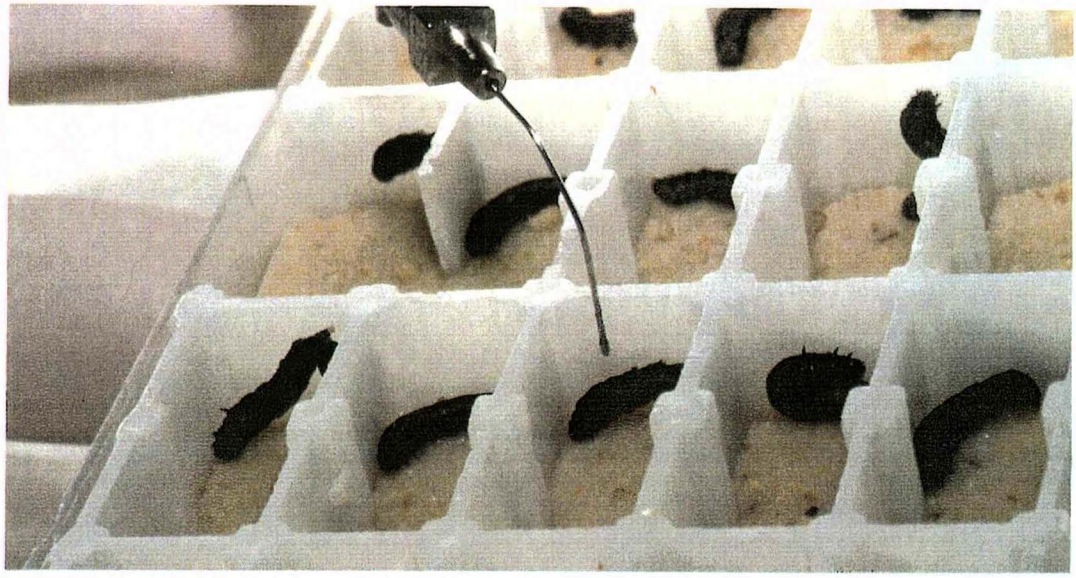
2.3.3. Contrôle de mortalité

Pour une application on compte la mortalité à 24 heures, à 48 heures et à 72 heures après le traitement.

L'analyse est effectuée sur la mortalité à 48 heures, la mortalité n'évoluant plus après ce temps ; les pyréthrinoïdes ont un effet de choc (knock down) et si l'on compte la mortalité quelques heures après l'application de la matière active il est difficile d'évaluer la mortalité.

Le nombre d'insectes morts aux différents temps est noté pour chaque dose.

PLANCHE n°3 : TESTS DE TOXICITE PAR APPLICATION TOPIQUE



Traitement de larves de *S. littoralis* par application topique

Contrôle de mortalité

2.4. Relation dose-mortalité

Les mortalités en fonction des doses sont relevées et subissent une transformation log-probit.

En effet, si l'on trace la courbe du pourcentage de mortalité en fonction de la dose d'insecticide appliquée on obtient une courbe d'allure sigmoïde dont l'équation est difficile à utiliser.

L'analyse log-probit est une transformation qui permet de linéariser cette fonction sigmoïde et de vérifier la normalité de la population (droite de Henry).

La dose est transformée en son logarithme et la mortalité en son probit.

Les transformations et le calcul de la droite de régression pondérée dose-mortalité sont effectués grâce à un programme informatique développé par le service Informatique et Biométrie du CIRAD-CA à Montpellier.

La mortalité naturelle, soit la mortalité dans le témoin est calculée,si celle-ci n'est pas nulle, pour chaque dose, le logiciel calcule une mortalité corrigée (ABBOTT, 1925).

Les données sont alors transformées en log-probit.

Une régression pondérée est calculée ce qui nous donne l'équation de la droite.

Les doses létales (20, 50 et 90) et leurs limites de confiance sont données pour une probabilité fixée à 5%.

Il faut noter que les intervalles de confiance pour les DL20 et DL90 sont souvent très importants à cause de l'allure sigmoïde de la courbe.

Les résultats doivent donc être interprétés avec prudence (ABBOTT, 1925 ; FINNEY, 1971).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Afin d'établir le spectre de résistance de la souche Sharkia, nous avons étudié la toxicité de plusieurs insecticides : la deltaméthrine, la cyperméthrine, le chlorpyriphos-éthyl, et le DDT sur la souche sensible (S) et résistante (R) de *S. littoralis.*

Le choix de ces différents insecticides, de plusieurs familles chimiques a été effectué en se référant aux matières actives utilisées sur le terrain.

Les tests de toxicité avec des insecticides de familles différentes permettent de savoir si il existe des résistances croisées.

Les relations effet-dose, obtenues après transformation log-probit (Fig. III.2, III.3, III.4 , III. 5 et III.6), nous ont permis de calculer les doses létales 20, 50 et 90 des différents produits testés chez la souche sensible et résistante (Tab. III.2, III.3, III.4, III.5 et III.6).

Les résultats des valeurs des doses létales proviennent de l'analyse globale de trois répétitions d'un même test. (On a donc au total 90 larves par dose).

Quelques analyses log-probit sont détaillées dans l'annexe 1.

3.1. Toxicité de la deltaméthrine

Des tests de toxicité de la deltaméthrine ont été effectués régulièrement pendant plus de deux ans sur les souches sensible et résistante sans effectuer de pression de sélection.

Les DL50 et les pentes mesurées depuis deux ans sont restées stables.

Tab. III.2 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 de la deltaméthrine chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis*

Dose létale 48h	Souche Sensible		Souche Résistante	
	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%
DL20	0,023	0,019 < <0,027	7,638	5,483 < <10,638
DL50	0,056	0,049 < <0,064	90,644	68,162 < <120,541
DL90	0,221	0,171 < <0,287	3 921,110	2 176,777 < <7 063,243
Pentes	2,151		0,783	

Le tableau ci-dessus présente les résultats cumulés de trois essais effectués à des temps différents.

Les écarts types sont très proches des doses létales, ce qui semble indiquer que la sensibilité des souches vis-à-vis de l'insecticide est stable au cours des générations.

Ces données nous permettent l'évaluation de la résistance à la deltaméthrine en calculant le coefficient de résistance selon la formule :

$$CR = DL50\ R/DL50\ S$$

On obtient donc un coefficient de résistance à la deltaméthrine de la souche Sharkia de : 1 618 (= 1 600).

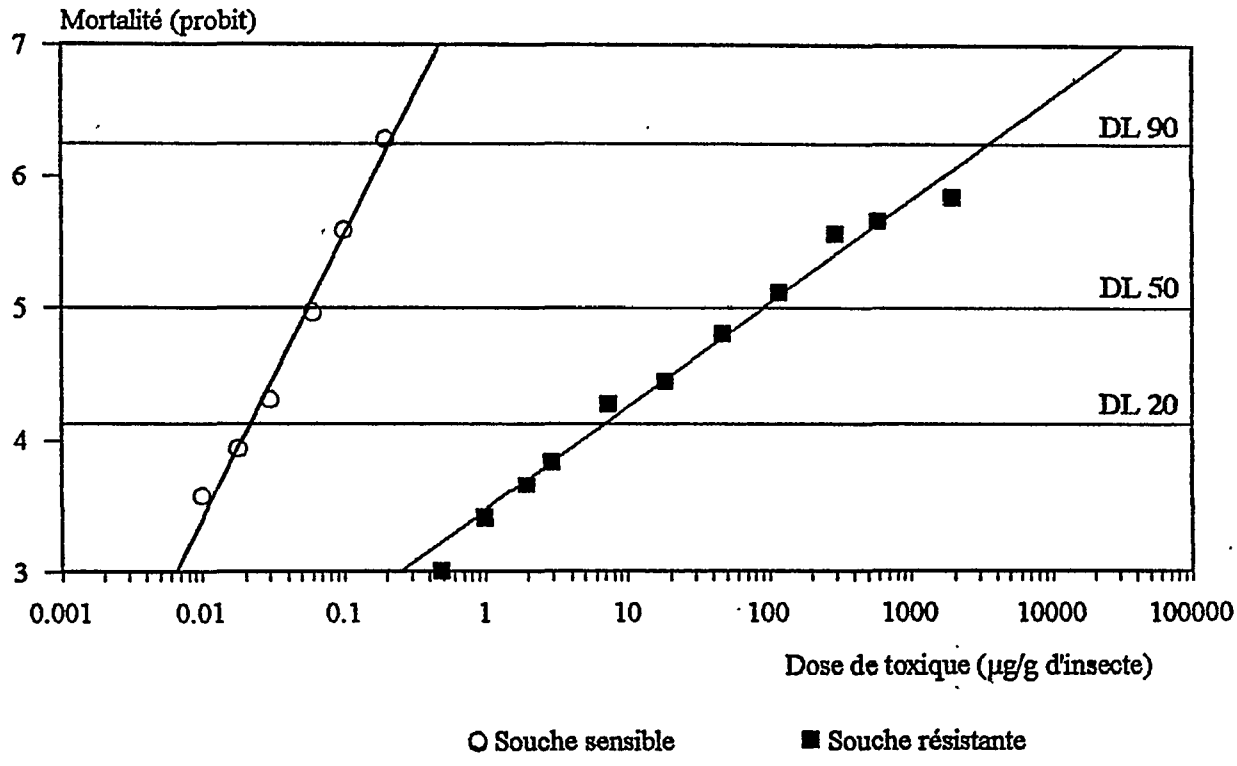


Fig. III.2 - Relations effet-dose de la deltaméthrine chez les souches sensible et résistante de *S. littoralis*

La figure III.2 nous indique que la pente de la droite log-probit de la souche sensible est beaucoup plus forte que celle de la souche résistante.

Pour la souche sensible la pente est de 2,15 , pour la souche résistante de 0,78.

Cette différence au niveau des pentes peut traduire une forte hétérogénéité de la population résistante, ce qui est souvent le cas des souches de terrain.

3.2 Toxicité de la cyperméthrine

Les résultats des tests de toxicité de la cyperméthrine sont présentés dans le tableau suivant :

Tab. III.3 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 de la cyperméthrine chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis*

Dose létale 48h	Souche Sensible		Souche Résistante	
	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%
DL20	0,277	0,250 < <0,306	15,398	13,129 < <18,059
DL50	0,442	0,416 < <0,470	34,775	31,184 < <38,778
DL90	0,902	0,804 < <1,015	120,235	100,368 < <144,034
Pentes	4,132		2,379	

Le calcul du coefficient de résistance donne dans le cas de la cyperméthrine une valeur de 78. La souche égyptienne est donc résistante à la cyperméthrine.

Des tests de toxicité réalisés avec d'autres pyréthrinoïdes (fenvalérate, esfenvalérate, cyfluthrine) permettent de calculer des coefficients de résistance de 100 à 400.

Ceci permet d'affirmer que cette souche égyptienne est résistante à plusieurs matières actives de la famille des pyréthrinoïdes de type II (α-cyanés).

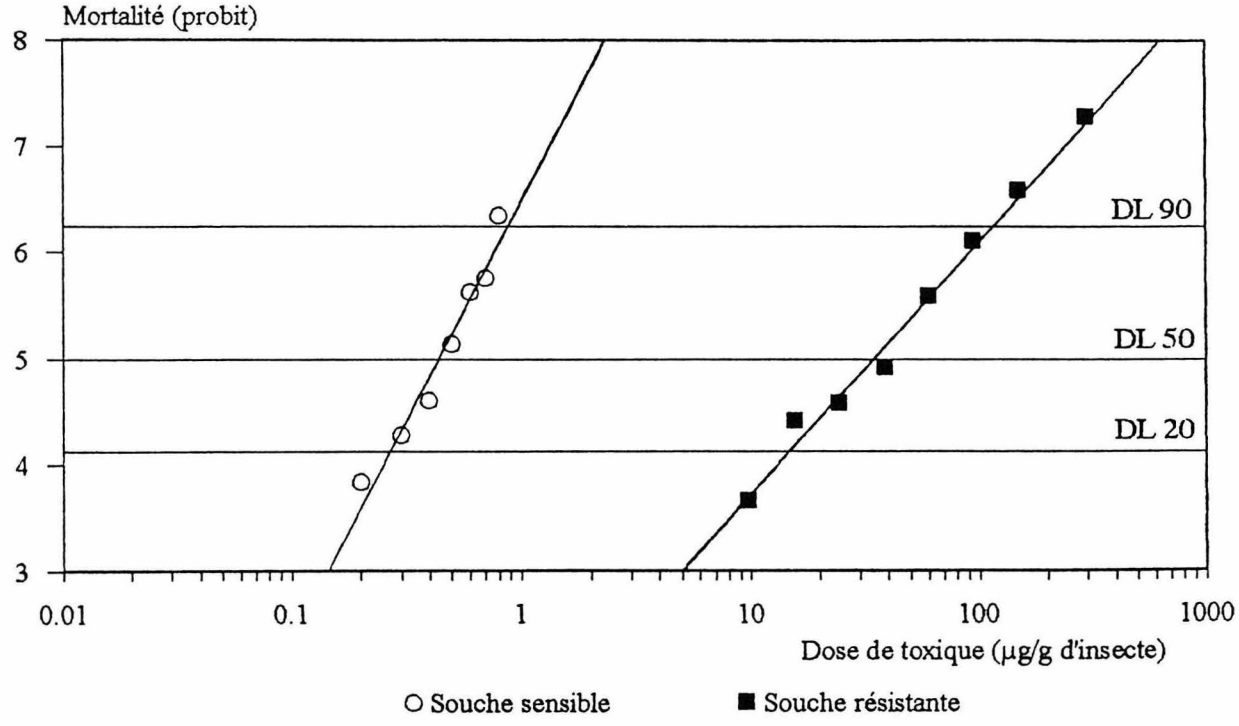


Fig. III.3 - Relations effet-dose de la cyperméthrine chez les souches sensible et résistante de *S. littoralis*

Les valeurs des pentes diffèrent chez les deux souches, la pente de la droite de la souche sensible est de 4,13 , alors que la pente chez la souche résistante est de 2,38.

Ceci confirme donc l'hétérogénéité de la population résistante.

3.3. Toxicité du chlorpyriphos-éthyl

Tab. III.4 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 du chlorpyriphos-éthyl chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis*

Dose létale 48h	Souche Sensible		Souche Résistante	
	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%
DL20	4,130	3,746 < <4,535	4,149	3,620 < <4,756
DL50	6,947	6,403 < <7,538	9,610	8,680 < <10,640
DL90	15,337	12,979 < <18,125	34,535	28,152 < <42,363
Pentes	3,726		2,307	

Les doses létales 50 du chlorpyriphos-éthyl chez les deux souches diffèrent très peu. En effet, le coefficient de résistance est de 1,3.

Cette valeur très proche de 1 signifie que la souche Sharkia n'est pas résistante au chlorpyriphos-éthyl.

Il n'y aurait donc pas de résistance croisée entre pyréthrinoïde et organophosphoré.

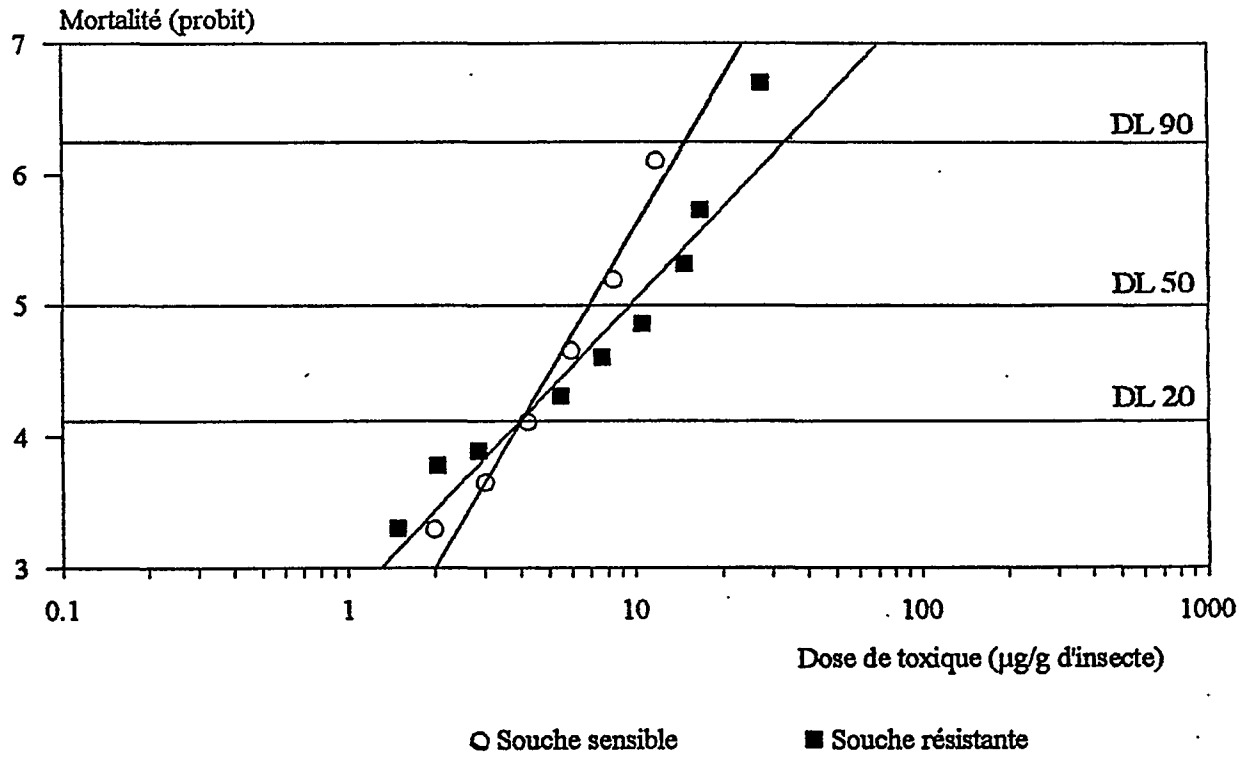


Fig. III.4 - Relations effet-dose du chlorpyriphos-éthyl chez les souches sensible et résistante de *S. littoralis*

Les droites obtenues sur la figure précédente sont très proches, les pentes des deux droites diffèrent légèrement : 3,73 pour la souche sensible et 2,31 pour la souche résistante.

Un test de parallélisme a été effectué sur ces deux droites, elles sont parallèles à 5 %.

On peut donc affirmer qu'il n'existe pas de résistance croisée entre pyréthrinoïde et organophosphoré chez la souche égyptienne.

3.4. Toxicité du DDT

Tab. III.5 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 du DDT chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis*

Dose létale 48h	Souche Sensible		Souche Résistante	
	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%	DL µg/g	Intervalle de confiance à 95%
DL20	33,343	25,088 < <44,313	89,919	67,757 < <119,330
DL50	120,488	99,217 < <146,320	416,331	329,028 < <526,799
DL90	852,301	616,621 < <1 178,061	4 295,416	2 596,383 < <7 106,268
Pentes	1,504		1,264	

Le coefficient de résistance de la souche au DDT est de 4,2 , cette valeur est faible par rapport au facteur de résistance à la deltaméthrine de 1 600.

Il est donc difficile de commenter ce résultat et de dire si il existe une résistance croisée entre pyréthrinoïdes et DDT.

De plus, la DL50 du DDT pour la souche de référence paraît anormalement élevée par rapport à celles trouvées dans la bibliographie.

La DL50 du DDT vis-à-vis de souches sensibles de lépidoptères est généralement de l'ordre de 20 à 50 µg/g.

Cette valeur élevée de la DL50 de notre souche de référence pourrait s'expliquer par l'origine de la souche qui a été collectée en champ, il y a quinze ans ; l'utilisation massive de DDT à cette époque a pu provoquer une résistance à cet insecticide.

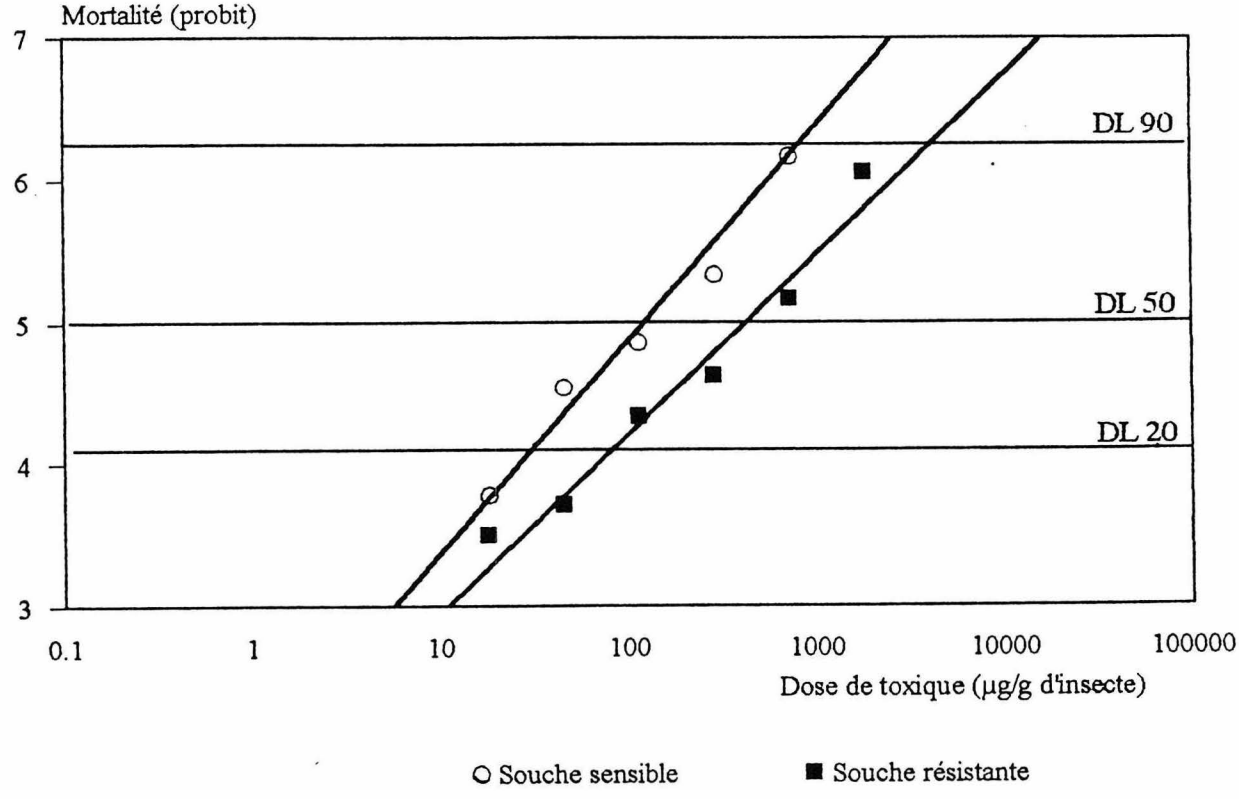


Fig. III.5 - Relations effet-dose du DDT chez les souches sensible et résistante de *S. littoralis*

3.5. Héritabilité de la résistance

Tab. III.6 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 de la deltaméthrine chez des larves de 4ème stade de *S. littoralis* issues de croisements

Dose létale 48h	Souche S ** (I.C.)	Souche R ** (I.C.)	Souche F1 * (I.C.)	Souche F'1 * (I.C.)	Backcross * (I.C.)
DL20	0,02 0,02 < < 0,03	7,64 5,48 < < 10,64	16,84 7,97 < < 35,60	18,63 8,74 < < 39,70	0,33 0,06 < < 1,70
DL50	0,06 0,05 < < 0,06	90,64 68,14 < < 120,54	77,27 49,27 < < 121,20	88,98 57,08 < < 138,72	3,28 0,88 < < 12,24
DL90	0,22 0,17 < < 0,29	3 921,11 2176,78 < < 7063,24	786,11 494,44 < < 1249,85	962,80 590,90 < < 1568,77	109,11 10,54 < < 1229,43
Pente	2,15	0,78	1,27	1,24	0,84

* Les intervalles de confiance à 95% (I.C.) sont notés sous chaque valeur.
** Les intervalles de confiance sont précisés dans le Tab. III.2 p.66.

Les tests de toxicité de la deltaméthrine chez les souches F1 et F'1 issues des croisements des parents S et R montrent que les valeurs des DL20, DL50 et DL90 sont très proches. Un test de student réalisé sur les essais sur F1 et F'1 permet d'affirmer que le parallélisme des deux droites est acceptable à 5%.

Si l'on compare les résultats obtenus chez les générations F1 et F'1 et chez les souches parentales on constate que les doses létales de la deltaméthrine sont proches de ceux de la souche résistante.

Ceci peut signifier que la résistante est dominante.

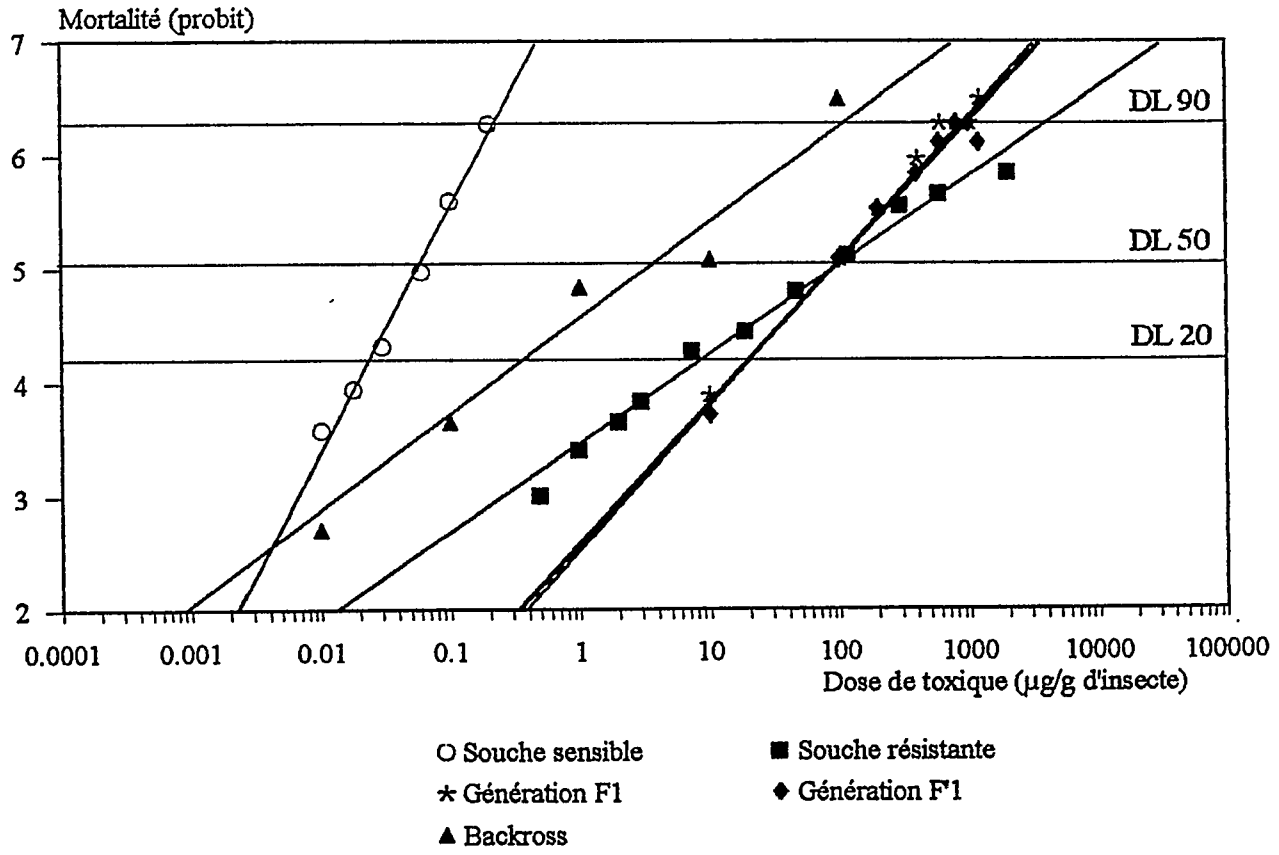


Fig. III.6 - Relations effet-dose de la deltaméthrine chez plusieurs souches de *S. littoralis* issues de croisements.

La toxicité de la deltaméthrine sur la population issue du backcross (F1 * SS) semble indiquer que la résistance est polygénique.

En effet, quand la résistance est monogénique, la réponse de la population se présente sous forme de courbe située entre la F1 et la courbe SS avec un plateau (RAYMOND et *al.*, 1987 ; PRIESTER et GEORGHIOU, 1979; SCOTT et GEORGHIOU, 1985).

4. CONCLUSION

Les résultats des analyses log-probit correspondant aux tests topiques des différents insecticides mettent en évidence plusieurs points :

La souche d'origine Sharkia présente une forte résistance à la deltamétrine (CR = 1 600). Cette résistance s'étend à la famille des pyréthrinoïdes de type II, avec un coefficient de résistance de 78 pour la cyperméthrine.

La souche égyptienne ne présente pas de résistance au chlorpyriphos-éthyl. Il n'y a donc pas de résistance croisée entre pyréthrinoïdes et organophosphorés.

Les tests de toxicité du DDT vis-à-vis des deux souches ont montré que le coefficient de résistance de la souche Sharkia était de quatre. Ce facteur est faible par rapport celui de la deltaméthrine de 1 600.

La valeur de la DL50 du DDT chez la souche sensible est anormalement forte. Il est difficile de conclure à l'existence d'une résistance croisée entre pyréthrinoïde et DDT.

L'étude de l'hérédité de la résistance semble montrer que la résistance est dominante et polygénique.

Plusieurs mécanismes interviendraient donc dans le phénomène de résistance.

La résistance aux pyréthrinoïdes pouvant s'expliquer par une modification de la pénétration de l'insecticide, une métabolisation accrue, une modification de la cible, nous allons étudier successivement ces différents phénomènes chez les deux souches sensible et résistante.

CHAPITRE IV

RECHERCHE DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX PYRÉTHRINOIDES CHEZ *S. LITTORALIS*

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la résistance aux pyréthrinoïdes peut s'expliquer par plusieurs mécanismes :

- une pénétration réduite de l'insecticide ;
- une résistance métabolique ;
- une modification de la cible.

Nous avons donc procédé successivement à l'étude de ces trois mécanismes chez les deux souches sensible et résistante.

A. ÉTUDE DE LA PÉNÉTRATION CUTICULAIRE DE LA DELTAMÉTHRINE CHEZ S. LITTORALIS

1. INTRODUCTION

La modification de la cinétique de pénétration d'un insecticide peut être un des mécanismes de résistance aux insecticides. Ce phénomène a été décrit pour la première fois dans les années 60 (FORGASH et *al.*, 1962), il s'agit d'un caractère génétique monofactoriel.

A lui seul, ce mécanisme entraîne de faibles taux de résistance, les coefficients de résistance évalués dans des cas de résistance dûs uniquement à ce phénomène ont généralement des valeurs de l'ordre de trois au maximum (PLAPP et HOYER, 1968).

Toutefois, lorsque la modification de pénétration est associée à d'autres mécanismes de résistance les coefficients de résistance peuvent être beaucoup plus importants. C'est le cas de la résistance aux organophosphorés chez *S. littoralis* (RISKALLAH, 1980) et de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *S. littoralis* (ABBASSY et *al.*, 1982) et chez *S. exigua* (DELORME et *al.*, 1988).

Au niveau moléculaire ce phénomène serait dû à une modification de la composition en lipides des membranes cellulaires.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Principe

Afin d'étudier la cinétique de pénétration de la deltaméthrine on utilise de la deltaméthrine marquée au carbone 14 (^{14}C), (Fig. IV.1) que l'on applique sur les insectes par contact; la mesure de la radioactivité externe et interne à différents temps permet d'obtenir la cinétique de pénétration de l'insecticide.

La comparaison des cinétiques obtenues chez les deux souches nous permettra de savoir si ce phénomène intervient ou non dans la résistance.

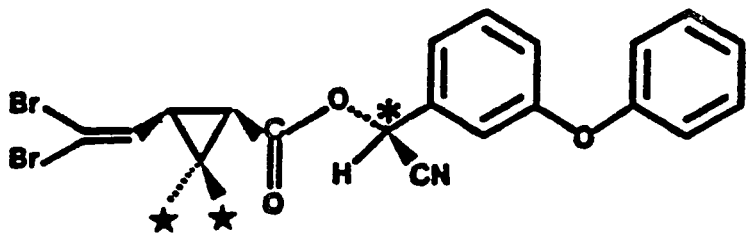


Fig. IV.1 - Marquage de la molécule de deltaméthrine

La deltaméthrine est appliquée avec le microapplicateur sur le thorax des larves de 4ème stade.

Avant de commencer l'expérimentation, nous avons vérifié la fiabilité de l'appareil en mesurant la radioactivité délivrée dans plusieurs volumes.

La fiabilité de l'appareil est bonne pour des volumes supérieurs à 0,7 μl.
Nous avons donc choisi d'utiliser un volume de 1μl sur des larves de 100 mg.

La dose d'insecticide appliquée à chaque larve est une dose sublétale pour la souche sensible qui correspond à la DL10 de cette souche : 0.01μg de matière active / g d'insecte.

Pour la souche résistante la même dose est utilisée.
La solution utilisée contient 218 dpm / μl.

2.2. Méthode

2.2.1. Cinétique de pénétration

Le principe du test est d'appliquer de la deltaméthrine marquée sur un lot de 160 larves. On compare ensuite à des temps différents : 0', 15', 30', 1h, 2h, 4h, 8h, et 16h, les taux de radioactivité absorbés et excrétés entre les deux souches S et R.

Les larves sensibles et résistantes sont pesées et réparties en lots de dix.

Elles sont ensuite traitées à la deltaméthrine marquée et déposées dans des fioles de comptage par lot de dix larves.

Aux différents temps les larves sont lavées et tuées avec cinq millilitres d'hexane et les rinçages externes sont ensuite évaporés. Afin de déterminer la quantité de **radioactivité externe totale**, un comptage de la radioactivité est également effectué dans les flacons de contact dans lesquels les larves ont séjourné.

Du liquide scintillant (10 ml) est ajouté dans les fioles de comptage et la **radioactivité externe** est alors comptée grâce à un compteur à scintillation liquide.

Les larves traitées, sont récupérées et sont ensuite brûlées à l'oxymat afin de mesurer la **radioactivité interne**.

Le pourcentage d'insecticide ayant pénétré dans les larves, en fonction du temps peut être calculé à partir de la radioactivité externe, interne et excrétée à différents temps.

2.2.2. Partition de phase

Pour avoir une idée de la répartition des métabolites, nous avons effectué au temps 16 heures, une partition entre phase organique et phase acqueuse.

Les dix chenilles qui ont été tuées au temps 16 heures sont broyées à l'aide d'un potter dans un tampon :

- Eau : 1 ml
- Acétonitrile : 1ml
- Hexane : 2 ml

Le broyat est ensuite centrifugé à 8.000 g pendant dix minutes, on prélève ensuite 1,5 ml de la phase organique et 1,5 ml de la phase acqueuse ; les deux phases et le reste sont versées dans des fioles à scintillation.

Après évaporation, la quantité de radioactivité contenue dans chacune des phases est évaluée et on peut calculer ainsi, la proportion de métabolites hydrosolubles et liposolubles présents dans les chenilles sensibles et résistantes au temps 16 heures.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Cinétique de pénétration de la deltaméthrine

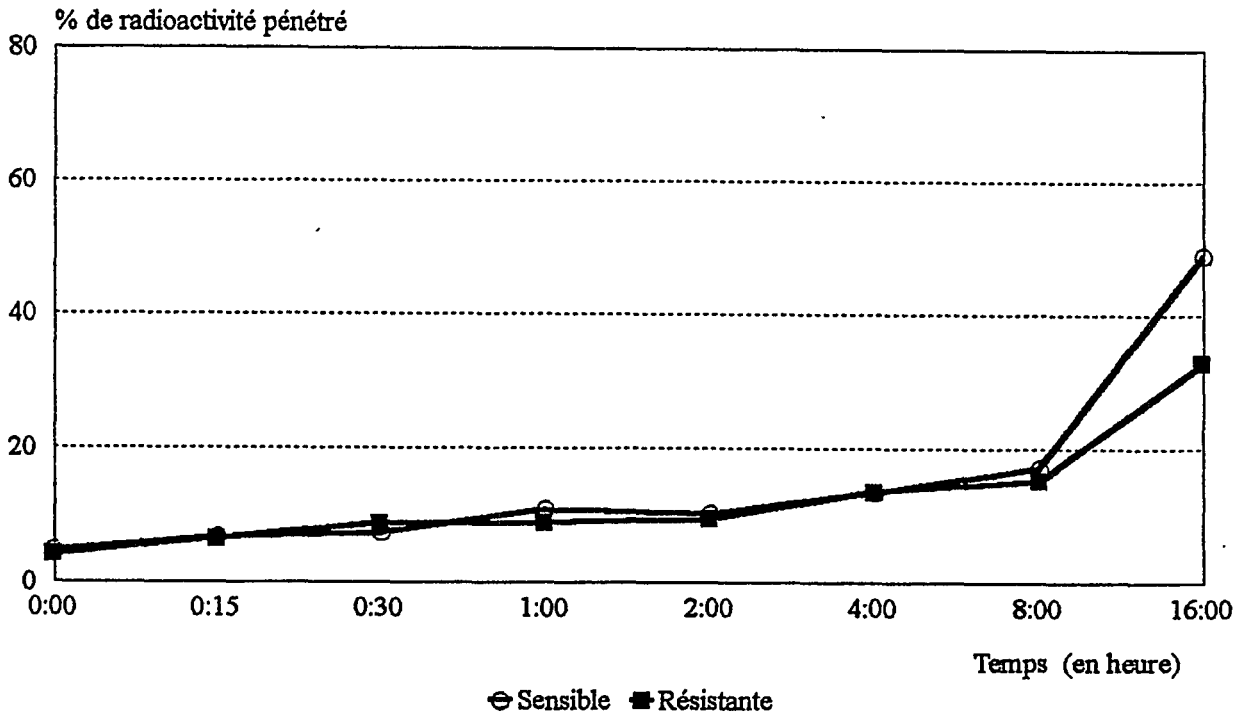


Fig. IV.2 - Cinétique de pénétration de la deltaméthrine marquée au C14 chez *S. littoralis*

Les résultats des tests illustrés sur la Figure IV.2, indiquent qu'il n'y a pas de différence entre le pourcentage de radioactivité pénétré à travers de la cuticule des insectes des deux souches dans les premières heures qui suivent le dépôt de l'insecticide.

En ce qui concerne, les temps courts, jusqu'au temps 8 heures, aucune différence n'est observée.
Il n'y aurait donc pas de modification de pénétration de l'insecticide chez les deux souches.

Des résultats similaires ont été décrits chez *S. littoralis* par HOLDEN, (1979) pour la cyperméthrine et la perméthrine ; des travaux menés par LAGADIC et *al.*, (1993) sur la pénétration de la cyfluthrine, chez la même espèce, montrent également qu'il n'y a pas de différence de pénétration. Ce phénomène est également décrit par YU (1991) chez une espèce voisine *S. frugiperda.*

Pour le temps 16 heures, le pourcentage de pénétration est de 33 +/-1% pour la souche sensible et de 50 +/- 1% pour la souche résistante.

Cette différence étant significative, nous avons cherché à connaître la répartition des métabolites chez les larves traitées à ce temps.

3.2. Partition de phase

L'étude de la répartition des métabolites au temps 16 heures, permet de calculer le pourcentage de métabolites hydrosolubles et liposolubles. La phase organique peut contenir en plus des métabolites, la molécule mère de deltaméthrine.

Tab. IV.1 - Répartition de la radioactivité

	Quantité de métabolites en %	
	Souche sensible	Souche résistante
Phase aqueuse	14,55	26,25
Phase organique	83,45	66,55

L'étude quantitative de la répartition des métabolites au temps 16 heures indique que pour la souche R la quantité de métabolites hydrosolubles est plus importante que pour la souche sensible, la métabolisation et l'excrétion seraient donc plus fortes chez cette souche.

Comme nous venons de le voir la pénétration de la deltaméthrine est identique pour les deux souches, toutefois, une différence faible du taux de radioactivité interne est notée au temps 16 heures ; la radioactivité interne est plus faible au temps 16 heures chez la souche résistante que chez la souche sensible .

Cette différence pourrait s'expliquer par une excrétion plus importante chez la souche résistante.

Les résultats à des temps longs sont souvent difficiles à interpréter, à cause des effets du métabolisme et des phénomènes de la redistribution et de l'excrétion des pyréthrinoïdes chez *S. littoralis* (SCOTT et GEORGHIOU, 1986).

En effet, nous avons montrer qu'au temps 16 heures, la quantité de métabolites hydrosolubles était plus importante chez la souche résistante que chez la souche sensible, il y aurait donc une différence de métabolisme entre les deux souches.

4. CONCLUSION

Les résultats de l'étude de la cinétique de pénétration de la deltaméthrine chez les deux souches ont montré que ce phénomène est identique chez les deux souches.

Cette étude a permis de mettre en évidence que la résistance à la deltaméthrine chez la souche R n'est pas dûe à une modification de la pénétration.

Par ailleurs la comparaison des résultats obtenus sur la répartition des métabolites au temps 16 heures, suggère qu'il existe une différence métabolique chez les deux souches.

Toutefois, l'étude de la pénétration d'un insecticide à des temps longs est difficile à interpréter, cette hypothèse est donc à vérifier.

B. RÉSISTANCE MÉTABOLIQUE

1. UTILISATION DE SYNERGISTES

1.1. Introduction

Les synergistes sont des molécules qui augmentent la toxicité d'un insecticide, sans toutefois être toxique eux même pour l'insecte si ils sont utilisés à faibles doses (MATSUMURA, 1985).

Ils agissent en inhibant un type de métabolisme donné.

Le pipéronyl butoxyde (PB) inhibe les monooxygénases à cytochromes P450 ; le DEF (S,S,S - tributyl phosphorotrithioate) bloque l'activité des hydrolases ou des estérases (CASIDA, 1970), bien qu'il ne soit pas tout à fait spécifique de ces enzymes. En effet, à des doses beaucoup plus fortes ils peuvent inhiber les oxydases et les glutathion-S-transférases (GST).

Il nous a donc paru intéressant d'utiliser ces synergistes sur les souches S et R, afin de voir s'ils agissent sur la toxicité de la deltaméthrine.

1.2. Matériels et méthodes

Les inhibiteurs PB et DEF sont appliqués topiquement avec un microapplicateur (ARNOLD, 1965) à des doses sublétales une heure avant l'application de l'insecticide.

Ce délai d'une heure entre les deux traitements est nécessaire pour éviter les interactions entre les deux produits.

Les inhibiteurs ont ainsi le temps de se fixer sur les sites enzymatiques avant l'arrivée de l'insecticide.
Ils sont utilisés en solution dans l'acétone à des concentrations sublétales déterminées par un essai préalable.

Tab. IV.2 - Concentration des inhibiteurs

[DEF]	[PB]
0,01 g/l	0,03 g/l

La deltaméthrine est ensuite appliquée dans les mêmes conditions que pour les tests de toxicité avec des doses croissantes afin de déterminer la DL50 et d'établir les relations dose-mortalité.

Deux lots témoins sont constitués pour chaque test. Le premier lot témoin reçoit de l'acétone, le second l'inhibiteur seul.

1.3. Résultats et discussion

1.3.1. Résultats

Le logiciel log-probit nous permet de calculer les doses DL20, DL50 et DL90 et de tracer les courbes de mortalité en fonction des doses d'insecticide utilisé.

Nous donnerons les valeurs des DL50 de la deltaméthrine en présence ou absence d'inhibiteur ainsi que les courbes, chez les deux souches S et R.

Le coefficient de résistance est calculé dans ce cas en présence d'inhibiteur.

- Inhibiteur d'estérases : DEF

Tab. IV.3 - Valeurs des DL50 de la deltaméthrine chez *S. littoralis* S et R en présence ou absence de DEF.

	DL50 de la deltaméthrine sans DEF	Intervalles de confiance à 95%	DL50 de la deltaméthrine avec DEF	Intervalles de confiance à 95%
SENSIBLE	0,056 µg/g	0,049 < < 0,064	0,07 µg/g	0,05 < < 0,10
RESISTANTE	90,64 µg/g	68,16 < < 120,54	70,29 µg/g	31,44 < < 157,16

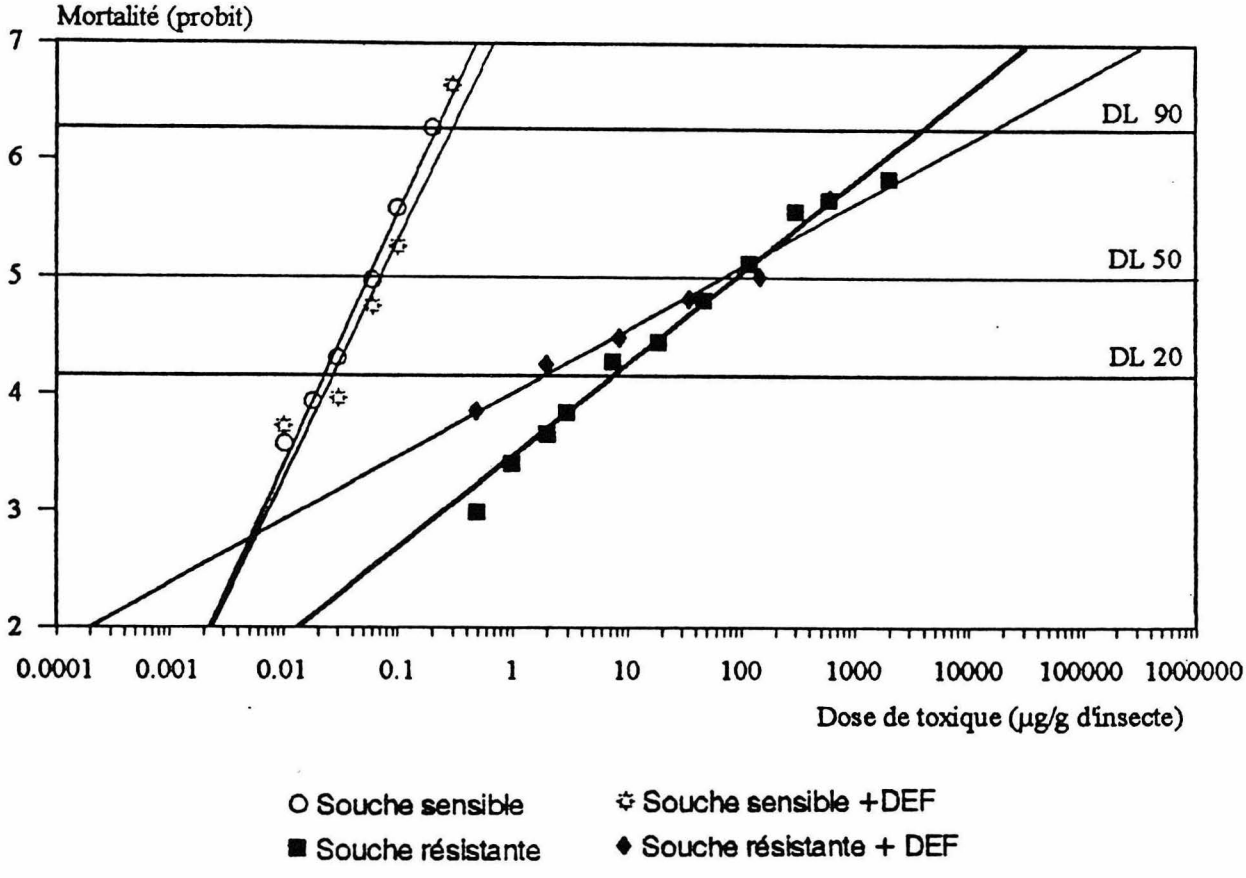


Fig. IV.3 - Relation dose-mortalité de la deltaméthrine chez *S. littoralis* avec ou sans DEF.

- Inhibiteur de monooxygénases : PB

Tab. IV.4 - Valeurs des DL50 de la deltaméthrine chez *S. littoralis* S et R en présence ou absence de PB.

	DL50 de la deltaméthrine sans PB	Intervalles de confiance à 95%	DL50 de la deltaméthrine avec PB	Intervalles de confiance à 95%
SENSIBLE	0,056 µg/g	0,049 < < 0,064	0,018 µg/g	0,015 < < 0,022
RÉSISTANTE	90,64 µg/g	68,16 < < 120,54	1,65 µg/g	0,74 < < 3,69

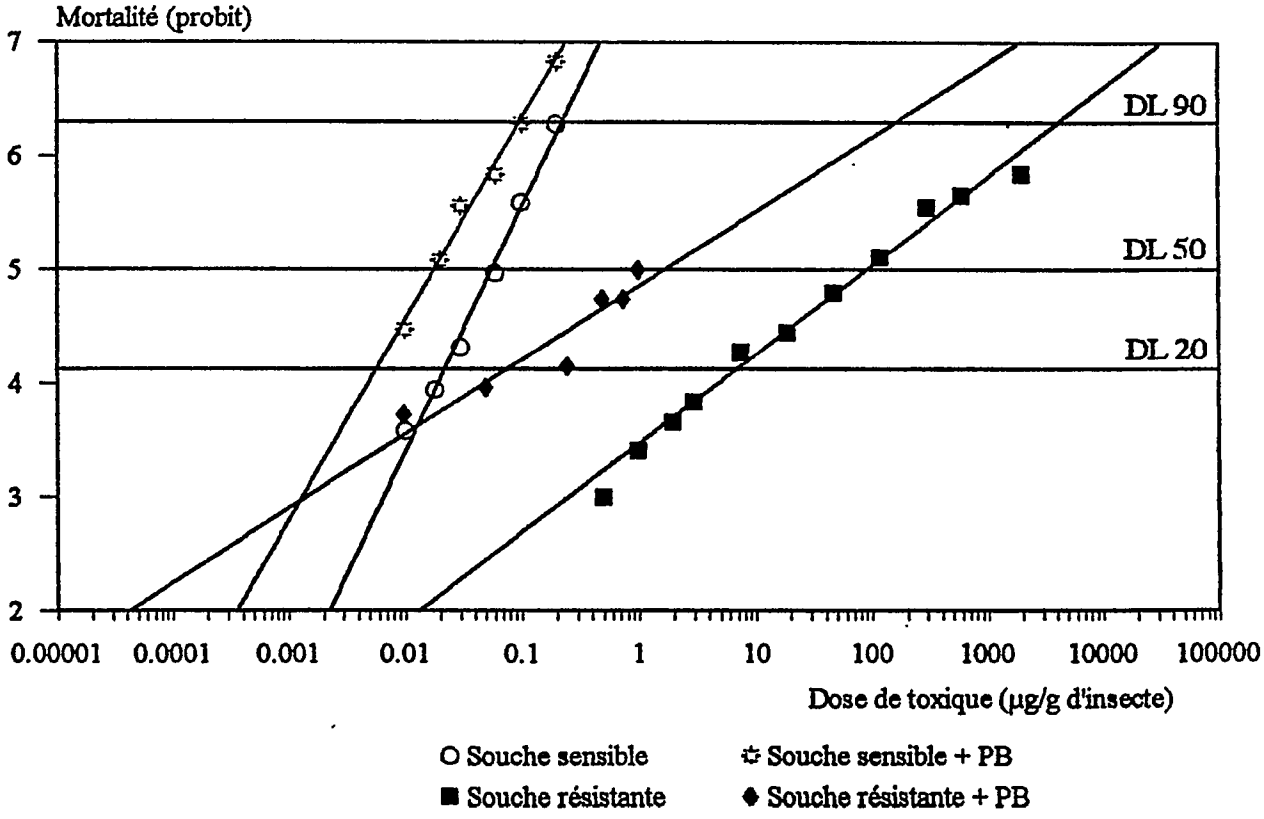


Fig. IV.4 - Relation dose - mortalité de la deltaméthrine chez *S. littoralis* avec ou sans PB.

- Coefficients de résistance en présence ou absence d'inhibiteurs

Nous avons calculé les coefficients de résistance de la souche Sharkia avec ou sans inhibiteurs.

Tab. IV.5 - Valeurs des coefficients de résistance à la deltaméthrine chez *S. littoralis* en présence ou absence d'inhibiteur

CR sans inhibiteur	CR avec DEF	CR avec PB
1 618	990	92

Nous constatons que le coefficient de résistance en présence ou abscence de DEF diminue légèrement de 1 618 à 990, par contre en présence de PB il passe de 1 618 à 92.

1.3.2. Discussion

Comme le montrent le Tableau IV.3 et la Figure IV.3, le DEF produit un effet trés faible sur la toxicité de la deltaméthrine.

La valeur de la DL50 de la souche résistante est à peu près identique avec ou sans inhibiteur.

Les hydrolases ou les estérases auraient donc un rôle très limité dans la diminution de la toxicité de la deltaméthrine chez la souche résistante.

Toutefois l'interprétation de tels résultats est assez délicate, cette première hypothèse demande donc à être vérifiée par une étude ultérieure sur les hydrolases et leur rôle dans la métabolisation de la deltaméthrine *in vitro* (Paragraphe B.2).

Le PB a un effet important sur la toxicité de la deltaméthrine chez la souche résistante (Fig. IV.4) (Tab. IV.4).

En effet, on observe une diminution de la DL50 de la deltaméthrine chez la souche résistante qui passe de 90,6 μg/g à 1,6 μg/g.

Le coefficient de résistance passe de 1 618 à 92.

Cet inhibiteur étant spécifique des oxydases à cytochromes P450, il paraît probable que ces enzymes jouent un rôle dans la résistance à la deltaméthrine.

Nous étudierons en comparaison, les monooxygénases à cytochrome P450 chez les deux souches S et R, ainsi que leur rôle dans la métabolisation *in vitro* et *in vivo* de la deltaméthrine.

1.4. Conclusion

L'absence d'effet du DEF sur la toxicité de la deltaméthrine ne signifie pas que les estérases ne jouent pas un rôle dans la résistance.

L'interprétation des tests de toxicité en présence d'inhibiteurs est délicate.

En effet,il est possible que le DEF, n'inhibe pas l'isoenzyme responsable de la résistance ; les inhibiteurs comme le DEF et le PB inhibent les principales enzymes mais ce sont des composés non spécifiques

Le PB a pour effet d'augmenter la toxicité de la deltaméthrine chez la souche résistante, les **oxydases** jouent donc un rôle dans le mécanisme de résistance.

Afin de préciser ce résultat nous étudierons les oxydases des deux souches ainsi que la métabolisation de la deltaméthrine par ces enzymes.

Les synergistes sont utiles pour l'identification des mécanismes possibles de résistance ; toutefois les résultats sont à interpréter avec prudence et devront être confirmés par des études sur le métabolisme *in vivo* et *in vitro* de l'insecticide (WILKINSON, 1983 ; KENNAUGH, et *al.*, 1993).

2. ÉTUDE ENZYMATIQUE

2.1. Les estérases

2.1.1. Introduction

Plusieurs auteurs ont montré qu'une forte activité des estérases était liée à la résistance aux pyréthrinoïdes c'est le cas de *S. littoralis* (RISKALLAH, 1983), et de *S. exigua* (DELORME et *al.*, 1988).

Nous mesurerons l'activité estérasique des deux souches vis-à-vis de deux substrats modèles : l'α-naphtyl acétate et le ß-naphtyl acétate spécifiques des estérases.

Les estérases des deux souches seront séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2.1.2. Matériels et méthodes

2.1.2.1. Mesures d'activités estérasiques

Principe :

L'activité estérasique est mesurée sur les fractions cytosoliques en utilisant comme substrats l'α-naphtyl acétate ou le ß-naphtyl acétate.

Les esters utilisés comme substrats sont hydrolysés par les estérases et les alcools obtenus ont des propriétés chromogènes.

On peut donc mesurer en spectrophotométrie l'activité des estérases.

Mode opératoire :

Les larves de 4ème stade sont broyées dans un tampon phosphate ajouté à de l'EDTA à 4°C ; le broyat est centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant 20 mn.

Le surnageant est récupéré et contient les protéines solubles.

10 µl de surnageant contenant les enzymes sont mélangés à 1 ml d'α-naphtyl ou de ß-naphtyl (0,25mM), puis incubé à 30°C pendant 30 mn.
Après incubation on ajoute au mélange 150 µl de Fast Blue BB salt (7,2 mM) et du SDS (60,7 mM).

Avant de mesurer la densité optique (DO) au spectrophotomètre, on laisse reposer la réaction à température ambiante pendant 15 mn.

Pour l'α-naphtyl-acétate on lit la DO à 605 nm, et pour le ß-naphtyl-acétate à 555 nm.

2.1.2.2. Mise au point d'une technique d'électrophorèse

Préparation des échantillons :

Les larves sont décapitées afin d'éviter les phénomènes de contamination par les pigments contenus dans la tête, puis broyées (une par une) à froid (4°C) dans un tampon contenant du phosphate à 0,1 M pH 6,5 + 10 mM d'EDTA.

Le volume de tampon de broyat utilisé pour une larve de 4ème stade est de 500 µl.
Le broyat est ensuite centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant 20 mn.

Le surnageant contient les protéines solubles dont les estérases.

L'extrait enzymatique est stocké dans un eppendorf dans lequel on ajoute 100 µl de glycérol à 20% qui permettent de conserver l'échantillon et de l'alourdir et 5 µl de bleu de bromophénol à 2% pour visualiser le front de migration.

Plusieurs essais ont été effectués pour connaître le temps et la température de conservation des échantillons ; il en résulte qu'on peut les garder plusieurs mois à - 80°C.

Conditions de migration :

Différentes compositions du gel en polyacrylamide ont été testées ; un gel de polyacrylamide à 10% permet une meilleure séparation des estérases qu'un gel à 7,5% (Fig.IV.5).

Afin d'éviter les problèmes de dénaturation des protéines et certains problèmes dûs à une température trop élevée au niveau du gel, le gel est réfrigéré pendant toute la migration, à l'aide d'un courant d'eau circulant, maintenu à 4°C par un cryostat.

Les conditions de migration sont les suivantes :
- un voltage constant de 100 volts pour le gel de concentration
- un voltage constant de 300 volts pour le gel de séparation.

Le pH du tampon cuve et sa concentration sont aussi des paramètres importants pour avoir une bonne séparation, parmi les différents tampon testés, le tampon Tris glycine 25 mM pH 8,3 semble donner les meilleurs résultats.

Révélation :

Une fois que la migration est terminée les bandes sont révélées grâce à 100 mg d'α-naphtyl-acétate ou de ß-naphtyl-acétate dilués dans 10 ml d'acétone et ajoutés à 40 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5 + EDTA 10 mM.

Coloration :

Le complexe substrat-enzyme est coloré avec 100 mg de Fast Garnet qui sont ajoutés dans le milieu de révélation.

Une fois que la coloration est terminée, le gel est transféré dans une solution d'acide acétique à 7% et de glycérol à 20% ; il peut être conservé dans cette solution ou bien, séché.

2.1.3. Résultats et discussion

2.1.3.1. Activité estérasique

Tab. IV.6 - Activité estérasique totale chez les deux souches.

	Activité estérasique totale en µg/mn/ mg prot.	
Souche	Substrat : α-naphtyl acétate	Substrat : ß-naphtyl acétate
Sensible	71,6 +/- 2,9	75,9 +/- 2,8
Résistante	50,6 +/- 3,7	68,4 +/- 5,5

Le test mesurant l'activité estérasique totale montre que l'activité estérasique est plus élevée chez la souche sensible que chez la souche résistante.

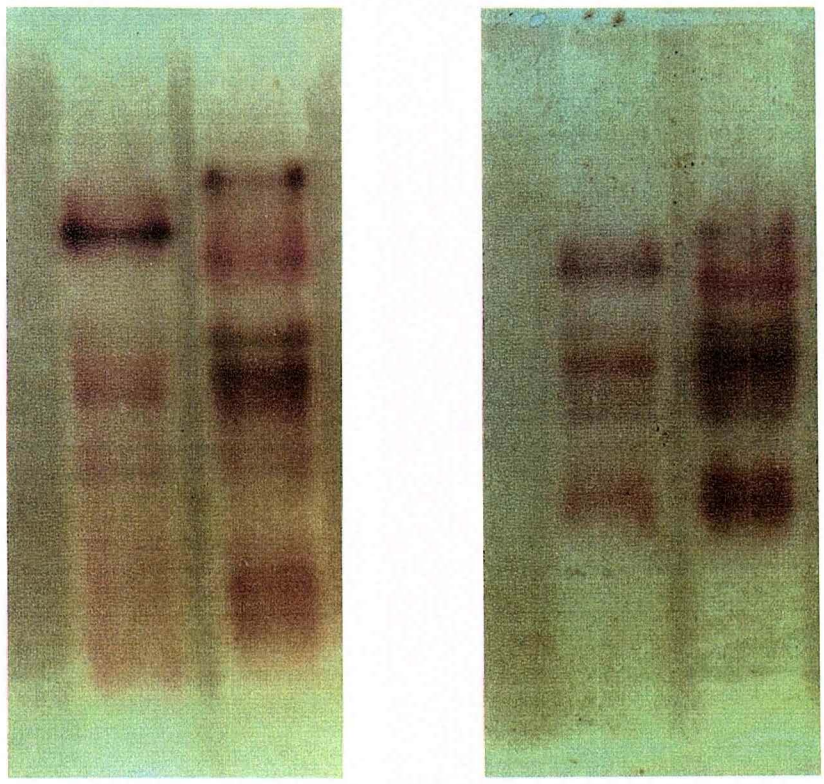
L'absence de synergisme observée avec le DEF dans les tests de toxicité semble indiquer que la résistance métabolique par les estérases n'est pas probablement impliquée dans le mécanisme de résistance à la deltaméthrine.

Cependant, ce test est une mesure d'activité totale et il peut exister des estérases spécifiques impliquées dans le mécanisme de résistance.

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide nous permettra donc de visualiser les estérases de la souche sensible et résistante.

2.1.3.2. Electrophorèses

Gel à 10% Gel à 7,5%



S R **S R**

S = Sensible
R = Résistante

Fig. IV.5 - Gels d'électrophorèses sur polyacrylamide : estérases

Les deux gels d'électrophorèse présentés sur la figure IV.5 montrent que les profils électrophorétiques des estérases de la souche sensible et résistante sont différents.

En effet on retrouve des bandes migrant à peu près au même endroit mais l'intensité de ces bandes est différente et on observe une bande supplémentaire chez la souche résistante.

Il semble donc que les deux souches possèdent des formes enzymatiques différentes.

Contrairement aux résultats obtenus chez *S. exigua* (DELORME et *al.*, 1988) ou chez *S. littoralis* (RISKALLAH, 1983), les mesures d'activité estérasique ont montré que l'activité estérasique était identique chez les deux souches. De plus les tests de toxicité de la deltaméthrine en présence ou absence de DEF (inhibiteur d'estérases) sont identiques.

Cette différence de polymorphisme enzymatique ne semble donc pas être corrélée à la résistance et pourrait s'expliquer par l'origine différente des deux souches.

Toutefois, cette hypothèse devra être confirmé dans des études ultérieures.

2.2. Les monooxygénases à cytochrome P450

2.2.1. Introduction

Les monooxygénases à cytochrome P450 sont des enzymes de détoxication qui introduisent des résidus réactifs sur les xénobiotiques, et les transforment ainsi en molécules plus polaires facilement excrétables (CUANY et BERGE, 1990).

Chez les insectes, comme chez tous les organismes, les cytochromes P-450 sont situés au niveau cellulaire dans les mitochondries et dans les microsomes.

Les caractéristiques spectrales des cytochromes P-450 permettent de mesurer la teneur en cytochromes P-450 totaux au niveau des microsomes.

L'activité des monooxygénases est également mesurable en utilisant un substrat chromogénique comme la 7-éthoxycoumarine.

2.2.2. Matériel et méthodes

Préparation des microsomes :

30 à 50 larves de 4ème stade sont prélevées dans les boîtes d'élevage, chaque larve est décapitée pour éviter toute contamination de la préparation par les pigments contenus dans les yeux.

Les larves sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur de potter. Le dispositif est maintenu dans la glace afin d'éviter toute perte d'activité enzymatique par dénaturation des protéines due à la température.

Le tampon de broyat est un tampon phosphate pH 7,2 , 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,4 mM (dilué dans du méthanol), DTT, 0,1 mM.

Après filtration, le broyat est centrifugé à 10 000 g pendant deux fois 10 mn, à 4°C ; entre les deux centrifugations le surnageant est prélevé et recentrifugé, le culot contient les noyaux, les gros débris cellulaires et les mitochondries pouvant contaminer les microsomes.

Le surnageant issu de la centrifugation est centrifugé à 100 000 g pendant une heure.

Le culot est récupéré il contient les microsomes, le surnageant peut être utilisé pour des mesures d'activité estérasiques ou des gluthation-S-transférases.

Le culot (microsomes) est remis en suspension dans un tampon identique au précédent auquel on ajoute 20% de glycérol ; les fractions microsomales sont transférées dans des eppendorfs et sont prêtes à être utilisées pour le dosage des cytochromes P450 et les mesures d'activité.

Les fractions aliquotes non utilisées sont congelées à - 80°C.

Dosage des protéines :

Un dosage protéique est effectuée par la méthode de BRADFORD, (1976) sur les fractions microsomales obtenues.

Dosage du cytochrome P450 :

Le dosage des cytochromes est effectué par la méthode de SCHOENE et *al.*, (1972).

Les fractions microsomales sont diluées avec le tampon de reprise des microsomes afin d'avoir un volume final de 2 ml.

Le principe est basé sur la spectroscopie de différence et consiste à enregistrer le spectre d'absorption du cytochrome P450 réduit par du dithionite de sodium ($Na_2S_2O_4$) en présence de monoxyde de carbone (CO).

On prépare une solution de 2 ml contenant : 100μl de préparation microsomale, du dithionite de sodium, et du tampon phosphate (Tampon de reprise) qsp 2 ml. Ce mélange est réparti dans deux cuves, on établit une ligne de base. On fait buller dans l'une des deux cuves du monoxyde de carbone, puis on mesure le spectre de différence entre les deux courbes.

La quantité de cytochrome P450 est obtenue en prenant la différence de DO entre 450 nm et 490 nm.

$$Qcyt.P450 = \frac{DO(490,450nm)}{91.10^6 xQ}$$

- La quantité de cytochrome est exprimée en nmole / mg de protéine
- Q est la quantité de protéines en mg
- $\Sigma_{cyt.P450} = 91.10^6$ DO. mol^{-1}. cm^{-1}

Activité du système monooxygénases :

Un des substrats classiques du système monooxygénases, la 7-éthoxycoumarine (7EC) est utilisée pour mesurer l'activité des monooxygénases. Cette molécule est transformée en 7-hydroxycoumarine (7OH).

La 7OH qui résulte de l'activité enzymatique peut être dosée grâce à ses propriétés fluorescentes à 380 nm (absorption) et 480 nm (émission).

La réaction enzymatique est sous la dépendance de NADPH qui sert de donneur d'électrons.

7-éthoxycoumarine 7-hydroxycoumarine

7-EC 7-OH

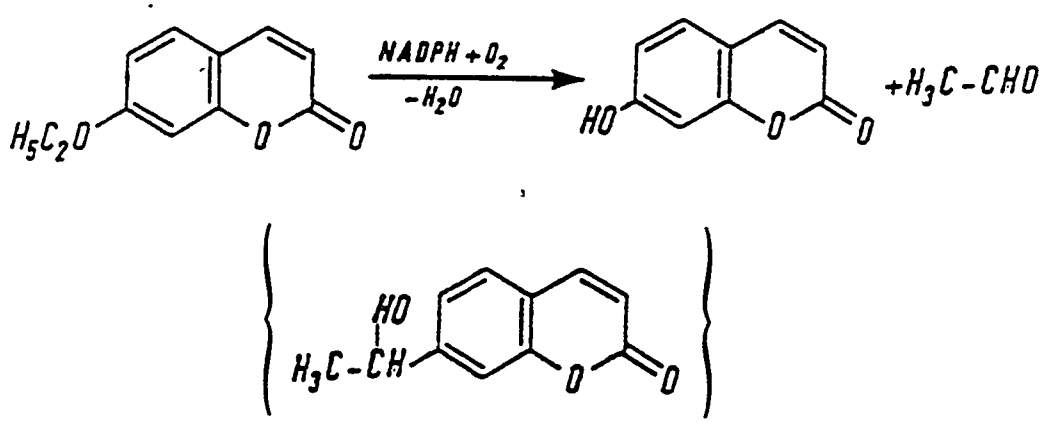


Fig. IV.6 - Déséthylation de la 7-éthoxycoumarine

Milieu réactionnel :

7-éthoxycoumarine 20 mM dans l'éthanol : 10 µl
Tampon phosphate 50 mM, pH 7,2 qsp 500 µl
NADPH 40 mM : 13 µl
Préparation microsomale : 600 µg de protéine

On effectue un essai sensible témoin et un essai résistant témoin, pour ces deux essais la réaction est stoppée immédiatement par l'ajout de deux fois 750 µl d'acétate d'éthyle.

Pour les autres essais (sensible et résistant), la réaction incube 30 mn dans un bain marie à 30°C.

La réaction est stoppée par l'ajout de deux fois 750 µl d'acétate d'éthyle, la phase organique est prélevée (750 µl) à laquelle on ajoute 750 µl d'un mélange éthanol / Tampon glycine.

Après stabilisation, on note la fluorescence dans chaque cuve.

On rajoute dans une cuve sans enzyme 100 ng de 7OH et on note la fluorescence.

On calcule l'activité spécifique en ng de 7OH formés/mg de protéine/minute.

2.2.3. Résultats et discussion

2.2.3.1. Dosage des protéines

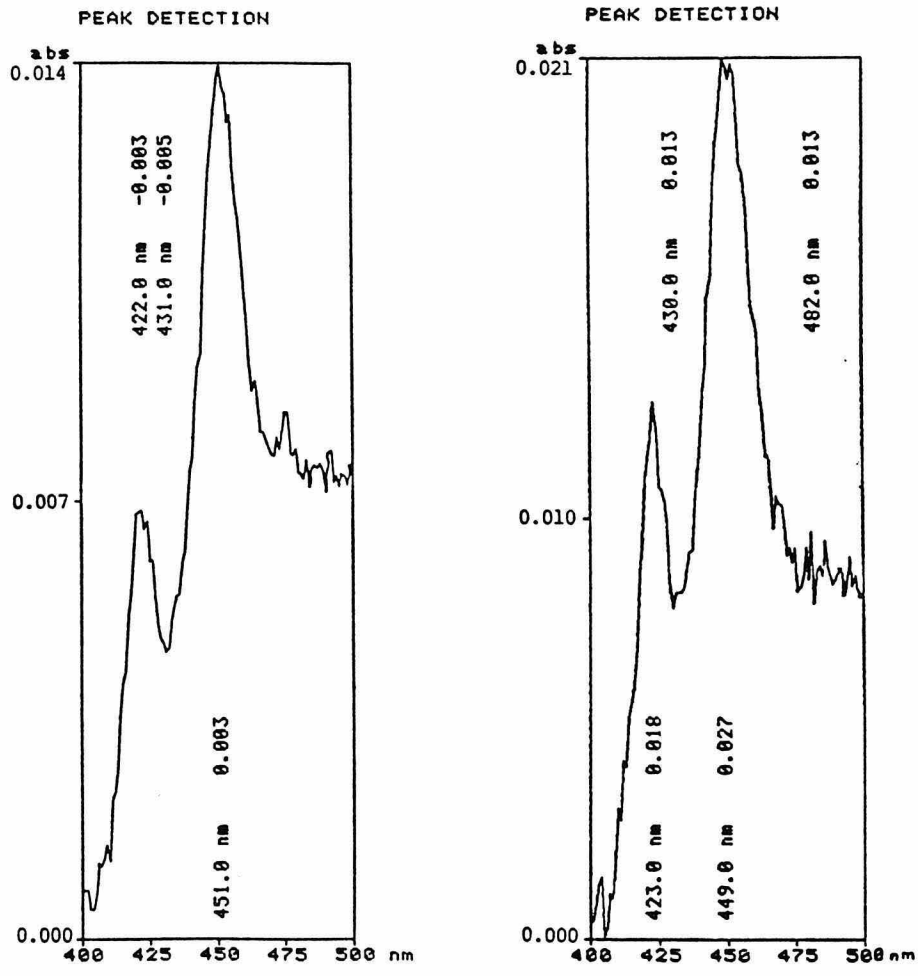
La quantité de protéines dans les fractions microsomales est donnée dans le tableau suivant :

Tab. IV.7 - Dosage protéique microsomal

Souches	Sensible	Résistante
Quantité de protéines en µg/µl	2,73 +/- 0,01	5,39 +/- 0,01

2.2.3.2. Dosage du cytochrome P450

Les spectres obtenus (Fig. IV.7) nous ont permis de calculer la quantité de cytochromes P450 contenus dans les fractions microsomales des deux souches sensible et résistante (Tab. IV.8).



Sensible Résistante

Fig. IV.7 - Spectres de différence : concentrations en cytochromes P450 dans les microsomes de *S. littoralis*

Tab. IV.8 - Dosage des cytochromes P450 chez les deux souches de *S. littoralis*

Souches	Sensible	Résistante
Quantité de cyt. P450 en nmole de P450/ mg de prot.	0,201 +/- 0,030	0,264 +/- 0,030

La concentration en cytochrome P450 de la souche résistante est légèrement plus importante que celle de la souche sensible.

Une étude menée par LAGADIC et CRESTEIL, en 1993, donne des résultats proches des nôtres.

Chez cette même souche résistante, ils ont mesuré une teneur en cytochrome P450 de l'ordre de 0,285 nmole/mg de protéines microsomales alors que la souche de référence contenait 0,125 nmole/mg de protéines. (LAGADIC et CRESTEIL, 1993).

Ces concentrations correspondent tout à fait aux concentrations moyennes de P-450 microsomaux chez les insectes qui varient de 0,2 à 0,5 nmole/mg de protéines (CUANY et BERGE, 1990).

2.2.3.3. Activité des cytochromes P450

Tab. IV.9 - Activité des cytochromes P450 chez les deux souches de *S. littoralis*

Souches	Sensible	Résistante
Activité des cytochromes P450 en pmole 7-OH/mn/mg de prot.	2,34 +/- 1,15	12,82 +/- 2,44

L'activité de déséthylation de la 7-éthoxycoumarine par les cytochromes P450 est supérieure d'un **facteur 5** à celle de la souche sensible.

Les différentes études de comparaison d'activité des cytochromes P450 chez d'autres insectes citent des facteurs variant de deux à dix.

Chez une souche de *Drosophila melanogaster* résistante au DDT l'activité des cytochromes P450 est 6,5 fois plus élevée que chez la souche de référence (CUANY et *al.*, 1990).

Cette différence d'activité peut être corrélée au phénomène de résistance.

Nous vérifierons cette hypothèse en étudiant le métabolisme de plusieurs substrats par les fractions microsomales.

2.3. Les gluthation-S-transférases

2.3.1. Introduction

Ces enzymes interviennent dans les réactions de phase II et réalisent la conjugaison des xénobiotiques en transférant sur la molécule un gluthation qui rend la molécule plus hydrophile donc plus facile à éliminer.

La mesure d'activité des gluthation-S-transférases (GST) peut se faire suivant la méthode de HABIG et *al.*, (1981) qui utilise deux substrats le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (DCNB).

Le produit de la réaction est un thioéther qui a des propriétés d'absorption en UV.

2.3.2. Matériel et méthodes

Les fractions cytosoliques obtenues après centrifugation des broyats de larves sensibles et résistantes sont récupérées.

Un extrait cytosolique est mis en présence des substrats CDNB et DCNB.

Tab. IV.10 - Plan d'expérience pour la mesure d'activité des GST

	Sensible	Résistant
Enzyme	50 µl	50 µl
GSH 10 mM	100 µl	100 µl
CDNB	10 µl	10 µl
DCNB	20 µl	20 µl
Tampon Tris 100 mM pH 7.5	900 µl	900 µl

On mesure la densité optique à 340 nm.
Chaque essai est répété quatre fois.

2.3.3. Résultats et discussion

Les résultats des mesures d'activité des GST des larves sensibles et résistantes sont regroupées dans le tableau suivant.

Tab. IV.11 - Activité de conjugaison des glutathion-S-transférases

	Activité de GST en unité DO/ mn/ mg de prot.	
Souche	Sensible	Résistante
Substrat : CDNB	0,164 +/- 0,004	0,251 +/- 0,005
Substrat : DCNB	0,058 +/- 0,001	0,068 +/- 0,006

Ce tableau montre que l'activité de conjugaison du CDNB chez la souche résistante est **1,5** fois supérieure à celle de la souche sensible.

L'activité mesurée vis-à-vis du DCNB est identique chez les deux souches.

Chez cette même souche résistante, LAGADIC et *al.*, (1992) a trouvé également une activité spécifique de conjugaison du CDNB deux fois plus importante que chez la souche de référence, et identique pour le DCNB ces résultats confirment ceux que nous avons obtenus.

Ces résultats suggèrent l'existence de deux formes distinctes de GST, avec une activité accrue de l'une des deux formes chez la souche résistante.

Chez *Musca domestica* des résultats similaires ont été obtenus (CLARK et *al.*,1984).

2.4. Conclusion

Les tests de toxicité de la deltaméthrine en présence ou absence de DEF sont identiques.

De plus, nous avons montré qu'il n'existait pas de différence d'activité estérasique entre la souche sensible et la souche résistante.

En ce qui concerne les estérases, les deux souches présentent un profil électrophorétique différent qui peut s'expliquer par l'origine des souches.

Il semble donc, contrairement aux résultats trouvés chez d'autres lépidoptères, que la résistance aux pyréthrinoïdes chez la souche Sharkia n'est pas dûe à une activité estérasique accrue.

En présence de PB, inhibiteur des systèmes oxydasiques, la DL50 de la deltaméthrine chez la souche résistante passe de 90 µg/g à 1,65 µg/g.

La concentration en P-450 microsomaux de la souche résistante est légèrement plus élevée que celle de la souche de référence.

L'activité des cytochromes P-450 est cinq fois plus élevée chez la souche résistante que chez la souche sensible.

Les oxydases interviennent donc, dans le mécanisme de résistance.

L'étude de l'activité des glutathion-S-transférases montre que la conjugaison avec le CDNB est 1,5 fois supérieure chez la souche résistante.

Ceci pourrait signifier que la résistance fait intervenir plusieurs systèmes de biotransformations, ce qui est souvent le cas chez les insectes.

3. EXPÉRIENCES DE MÉTABOLISATION

Les expériences de métabolisation ont été effectuées en utilisant différents substrats marqués au ^{14}C que l'on met en présence des préparations microsomales des deux souches.

Les métabolites obtenus sont visualisés après chromatographie en couche mince et autoradiographie, on peut ainsi identifier les métabolites grâce à des standards connus et les quantifier ; ce qui permet de comparer la métabolisation d'un produit chez la souche sensible et résistante.

Plusieurs substrats ont été utilisés tout d'abord deux insecticides : la deltaméthrine et le DDT, puis un substrat comportant de nombreux sites d'hydroxylation : la testostérone.

3.1. Métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine

3.1.1. Introduction

La molécule de deltamétrine utilisée est marquée au ^{14}C (Roussel Uclaf) sur la partie acide et alcool afin de pouvoir identifier les métabolites issus d'une hydrolyse de la liaison ester et les métabolites hydroxylés ; ces deux types de métabolites ne migrant pas au même Rf (Rétention du front). Le Rf est le quotient de la distance de migration d'un métabolite par rapport au dépôt, sur la distance entre le dépôt et le front du solvant.

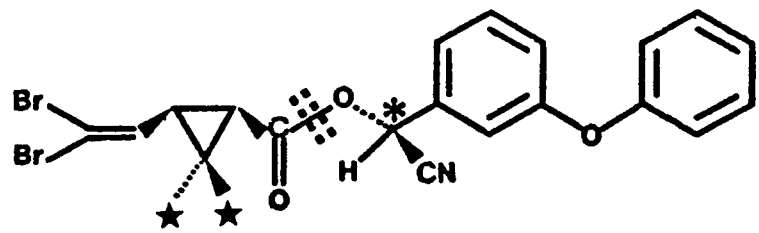


Fig. IV.8 - Marquage de la deltaméthrine

3.1.2. Matériel et méthodes

Milieu réactionnel :

Deltaméthrine marquée au ^{14}C : 10 μl (0,5 μCi)
Tampon phosphate 50 mM pH 7,2 q.s.p. : 500 μl
NADPH 40 mM : 0 ou 13 μl
Préparation microsomale : 600 μg de protéine

Incubation et extraction :

La réaction incube pendant 30 mn à 30°C, puis est stoppée par l'ajout de 1,5 ml d'éther ; après homogénéisation au vortex, on sépare les deux phases aqueuse et organique en centrifugeant les tubes à 2 000 tours pendant cinq minutes.

La phase organique est récupérée, évaporée puis reprise dans 5 μl de dichlorométhane et déposée sur plaque de silice.

Chromatographie Couche Mince (C.C.M.) :

On effectue deux migrations dans un solvant (CAM) qui contient :

- 180 ml de Chloroforme ;
- 90 ml d'Acétate d'éthyl ;
- 30 ml de Méthanol.

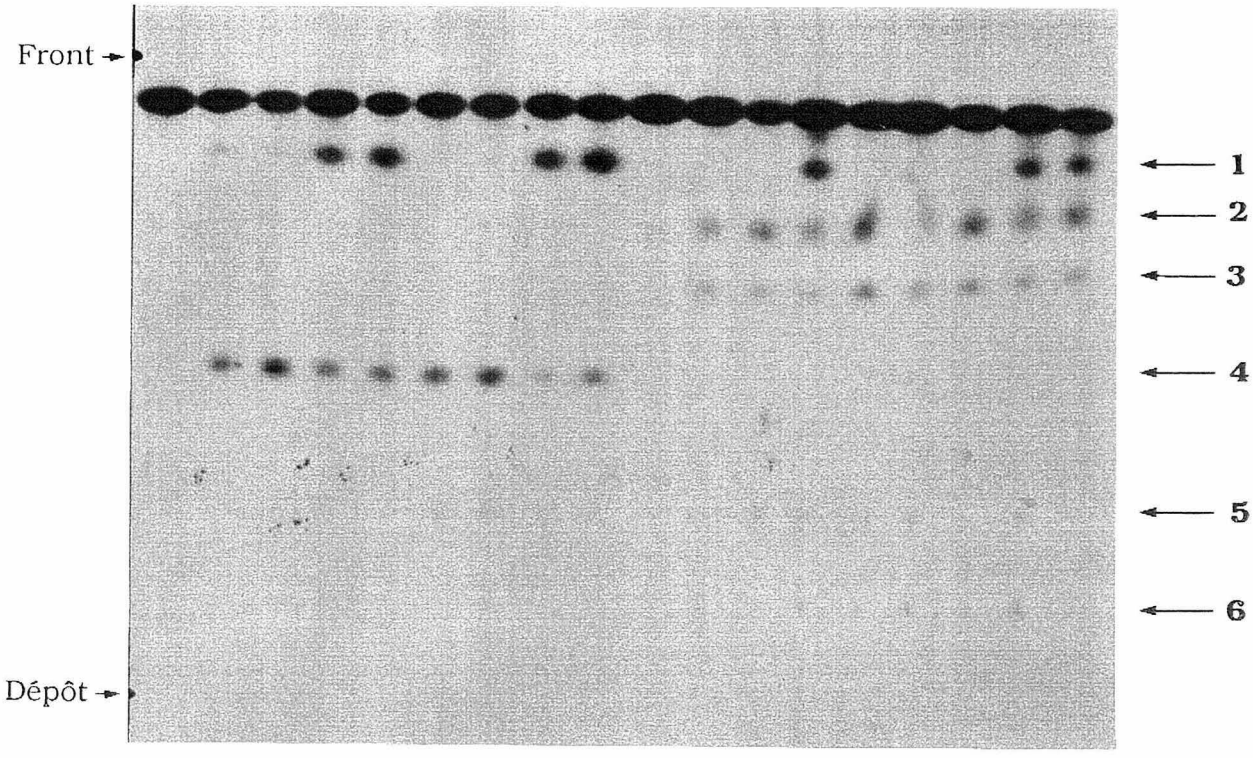
La plaque est ensuite séchée, pulvérisée avec un "contrastant" (EN ^{3}HANCE) puis recouverte d'un film. L'ensemble est ensuite mis en autoradiographie au froid(-80°C) et à l'obscurité pendant deux semaines à un mois.

Le film est développé au bout d'un délai de 15 jours à un mois. Les métabolites sont alors visibles et un repérage sur la plaque de silice permet d'isoler certains métabolites en grattant la silice et de quantifier la radioactivité correspondante. La quantification n'a pas encore été effectuée et fera l'objet d'un travail ultérieur en vue de publications.

On peut ainsi avoir une comparaison des métabolites produits par les deux souches, à la fois qualitative et quantitative.

3.1.3. Résultats et discussion.

Marquage alcool Marquage acide



S_T S_{-N} R_{-N} S_{+N} R_{+N} S_{-N} R_{-N} S_{+N} R_{+N} S_T S_{-N} R_{-N} S_{+N} R_{+N} S_{-N} R_{-N} S_{+N} R_{+N}

S_T = Standard
S = Sensible
R = Résistante

N = NADPH

Fig. IV.9 - Métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine chez *S. littoralis*

L'étude de la métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine a permis de séparer six métabolites produits par les fractions microsomales des deux souches.

Les taches observées en 5 et 6 sont présentes dans les témoins et dans tous les essais. Il semble donc qu'elles correspondent à des produits de radiolyse de la deltaméthrine.

Le calcul des Rf des métabolites produits chez d'autres espèces, notamment *D. melanogaster* (BAEZA-SQUIBAN et *al.*, 1989) ont permis de proposer une identification des composés formés. En effet chez *D. melanogaster*, la séparation des métabolites de la deltaméthrine a été réalisée à l'aide de différents éluants, dont le CAM2 identique à celui utilisé dans notre étude.

En comparant les Rf des métabolites obtenus dans les mêmes conditions, nous pouvons donc proposer d'identifier les métabolites de la deltaméthrine formés par les microsomes de *S.littoralis*.

L'analyse comparative des résultats nous permet de faire les constatations suivantes :

* **le métabolite 1** est le seul métabolite dont la formation est **NADPH dépendante**. Son Rf est de 0,84 ; il est donc peu polaire et très proche de la deltaméthrine.

La migration de ce métabolite est identique quel que soit le marquage de la deltaméthrine.

Il s'agit donc d'un composé plus polaire que la deltaméthrine qui correspondrait à la **molécule entière** faiblement **hydroxylée** sur l'un des cycles.

La formation des métabolites numérotés 2, 3 et 4 n'est pas NADPH dépendante.

* **Pour le métabolite 2,** on mesure un Rf de 0,74.

Ce métabolite n'est présent que pour le marquage de la deltaméthrine sur la partie acide, il provient donc de l'hydrolyse de la molécule. Il s'agirait, d'après ces caractéristiques, de **l'acide cyclopropane carboxylique** ou 3-PB acide (communication personnelle de CUANY).

* **Le Rf du métabolite 3** est de 0,64. Ce métabolite correspond également au marquage de la molécule sur la partie acide ; il s'agit d'un composé polaire pouvant résulter de l'**hydroxylation du cyclopropane**.

* **Le métabolite 4** a un Rf de 0,49 et il n'est présent que pour le marquage de la molécule sur la partie alcool. Il provient donc de l'hydrolyse de la deltaméthrine et correspondrait à **l'acide phénoxybenzoïque** ou Br2CA .

La métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine par les microsomes de la souche S et R se produit de façon identique.

La métabolisation de la deltaméthrine fait donc apparaître quatre métabolites : un composé très polaire dont la formation est NADPH-dépendante qui correspond à un dérivé de la deltaméthrine hydroxylé sur l'un des cycles, puis trois produits de l'hydrolyse de la deltaméthrine, l'acide cyclopropane carboxylique, qui peut être ensuite hydroxylé, et l'acide phénoxybenzoïque.

Avant d'analyser nos résultats, nous rappellerons les données actuellement acquises sur la métabolisation de la deltaméthrine chez d'autres organismes.

Les principales voies de métabolisation de la deltaméthrine sont l'hydrolyse de la liaison ester par les estérases et l'hydroxylation de différents sites de la molécule. Les métabolites obtenus sont généralement conjugués pour donner des dérivés plus polaires.

Métabolisation de la deltaméthrine chez divers organismes (Annexe n°2.)

L'hydroxylation de la deltaméthrine se fait essentiellement en position 4', 2' et 5 du cycle phénoxybenzyl et sur le trans-méthyl de la partie acide.

Suivant l'organisme étudié, certains de ces sites sont privilégiés.

Chez le rat, la deltaméthrine est préférentiellement hydroxylée en position 4' (COLE et *al.*, 1982), alors que chez la souris, l'hydroxylation se fait plutôt en position 4' et 5' (SHONO et *al.*, 1979). Ces esters hydroxylés ne forment pas de conjugués.

Chez l'oiseau, la deltaméthrine est hydroxylée aprés hydrolyse, en position 2', 4', 5 ou 6 (AKHTAR et *al.*, 1985)).

Après hydrolyse de la liaison ester, la partie acide donne l'acide dibromocyclopropane carboxylique dans les différents organismes cités.
Cet acide peut être hydroxylé avant ou après conjugaison.

La partie alcool issue de l'hydrolyse de la deltaméthrine produit l'aldéhyde phénoxybenzoïque qui peut être oxydé ou réduit, puis conjugué.

Outre l'étude de la métabolisation de la deltaméthrine par des cellules de *D. melanogaster* (BAEZA-SQUIBAN et *al.*, 1989), la métabolisation d'autres pyréthrinoïdes a été étudiée chez différents insectes.

La perméthrine subit une hydroxylation en position 4' chez la blatte, la mouche et *Trichoplusia ni*, ainsi qu'en position 6 chez la mouche (SHONO et *al.*, 1979). Ces esters hydroxylés peuvent former des conjugués.

La cyperméthrine est hydroxylée en position 4' chez *Heliothis virescens* (CLARKE et *al.*, 1990).

Le fenvalérate, chez la mouche, subit le même type d'hydroxylation (GOLENDA et FORGASH, 1989).

3.2. Expériences de métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine

3.2.1. Introduction

L'étude de la métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine est réalisée en déposant sur des larves de 4ème stade de la souche sensible et résistante de la deltaméthrine marquée au carbone 14 sur la partie alcool et acide.

3.2.2. Matériel et méthodes

Le principe utilisé pour étudier la métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine est le suivant :

la deltaméthrine marquée au ^{14}C sur la copule acide et alcool est déposée sur les segments thoraciques de larves de *S. littoralis* de 4ème stade.
Au bout de 15 minutes, les larves sont tuées à l'azote liquide.

Les larves sont ensuite récupérées et broyées dans 1 ml de tampon de broyat.

Le broyat ainsi obtenu est lavé quatre fois à l'éther, la phase organique est récupérée puis séchée au speed-vaç, puis déposée sur plaque de silice.

La phase aqueuse est centrifugée afin de séparer les protéines puis passée sur colonne SEP- PACK, puis séchée et déposée sur plaque de silice.

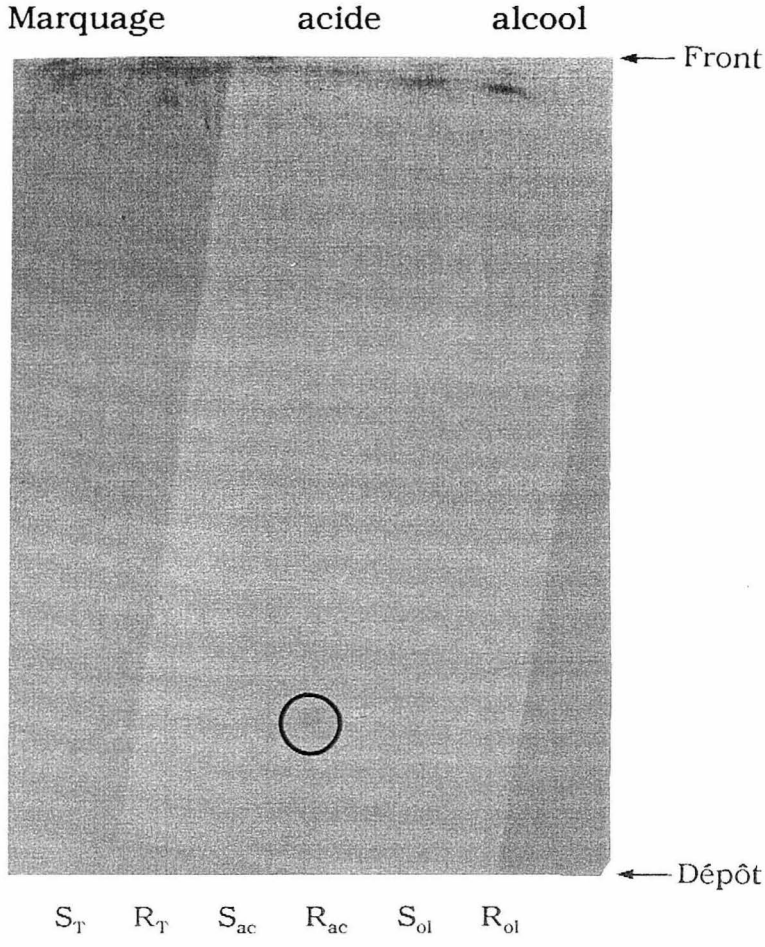
La méthode utilisée est identique à celle utilisée pour la deltaméthrine *in vitro*. On effectue deux migrations dans le solvant CAM.

Conditions de migration :

- 180 ml de Chloroforme ;
- 90 ml d'Acétate d'éthyl ;
- 30 ml de Méthanol.

3.2.3. Résultats et discussion

3.2.3.1. Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine : phase aqueuse



S_T = Standard S = Sensible R = Résistante

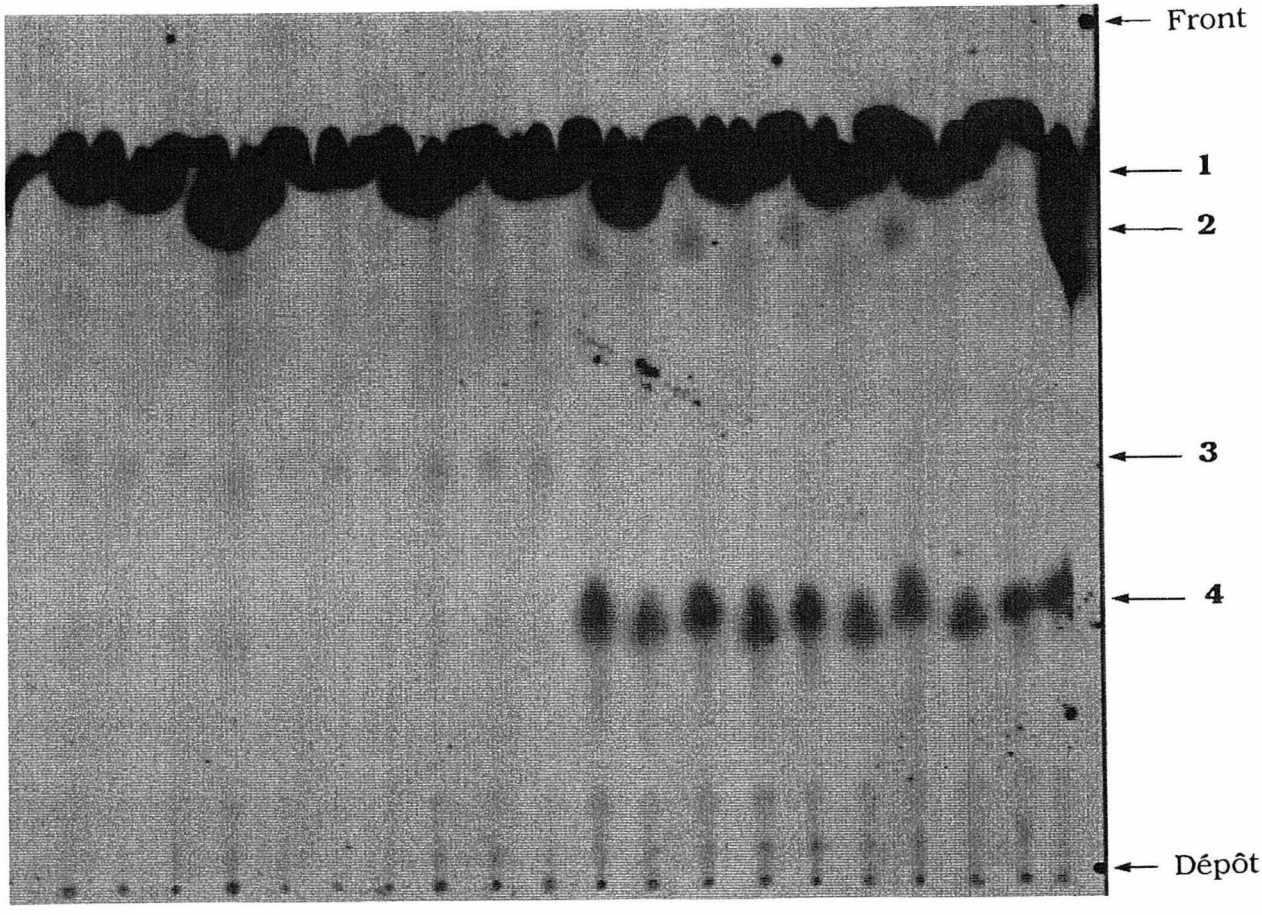
Fig. IV.10 - Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine chez *S. littoralis* ; phase aqueuse

L'autoradiographie de la phase aqueuse obtenue après métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine permet de visualiser **un seul métabolite** très polaire mais ce métabolite peut correspondre à un mélange de plusieurs composés polaires. Ce métabolite provient de la partie acide de la molécule. Il est plus abondant chez la souche résistante que chez la souche sensible. La quantité de métabolite est 1,9 fois plus importante chez la souche résistante.

Si l'on se réfère aux résultats précédents,sur la métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine d'après son Rf il est probable que ce métabolite corresponde à l'acide dibromocyclopropaniquecarboxylique hydroxylé sur un des méthyles.

3.2.3.2. Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine : phase organique

Marquage acide Marquage alcool



S_T R_T S R S R S R S R S R S R S R S R S R

S_T et R_T = Standards
S = Sensible
R = Résistante

Fig. IV.11 - Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine : phase organique

L'étude de la métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine par les larves de *S.littoralis* fait apparaître 4 métabolites organosolubles.

* **Le métabolite 1** est un dérivé peu polaire très proche de la deltaméthrine dont le Rf est environ de 0,84.

Ce dérivé n'est produit que chez la souche résistante et correspondrait, d'après son Rf, à la molécule de deltaméthrine hydroxylée sur l'un des cycles.

* **Le métabolite 2** est un dérivé polaire de la deltaméthrine marquée sur la partie alcool présent uniquement chez les larves sensibles.

Le Rf que nous avons calculé est de 0,77. Il est possible qu'il s'agisse du de l'aldéhyde ou de l'acide phénoxybenzoïque.

* **Les métabolites 3 et 4** correspondent à l'hydrolyse de la deltaméthrine. D'après leurs Rf (0,48 et 0,32) il pourrait s'agir de l'acide cyclopropane carboxylique et de l'alcool phénoxybenzoïque.

Les résultats de métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine mettent en évidence quatre métabolites majeurs qui étaient observés également *in vitro*.

Les quantités de certains métabolites semblent plus importantes chez la souche R. C'est le cas, par exemple pour la deltaméthrine hydroxylée.

Comme nous l'avons montré les teneurs en cytochromes P450 sont légèrement plus élevées chez la souche résistante que chez la souche sensible.

De plus l'activité des cytochromes P450 sur la 7-éthoxycoumarine est plus élevée chez la souche résistante ; ceci pourrait expliquer une métabolisation plus importante de la deltaméthrine chez cette souche.

Les résultats font apparaître des différences qualitatives entre les métabolites produits chez les deux souches. Il semble que certaines formes de cytochromes P450 impliqués dans la résistance diffèrent de celles des individus sensibles.

Nous avons vu précedemment que le PB augmentait la toxicité de la deltaméthrine.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que la résistance à la deltaméthrine semble due en partie à une résistance métabolique par modification de l'activité des cytochromes P450

D'après ces données bibliographiques, et les résultats présentés précédemment, nous pouvons proposer un schéma des voies principales de métabolisation de la deltaméthrine chez *S.littoralis* (Fig. IV.12).

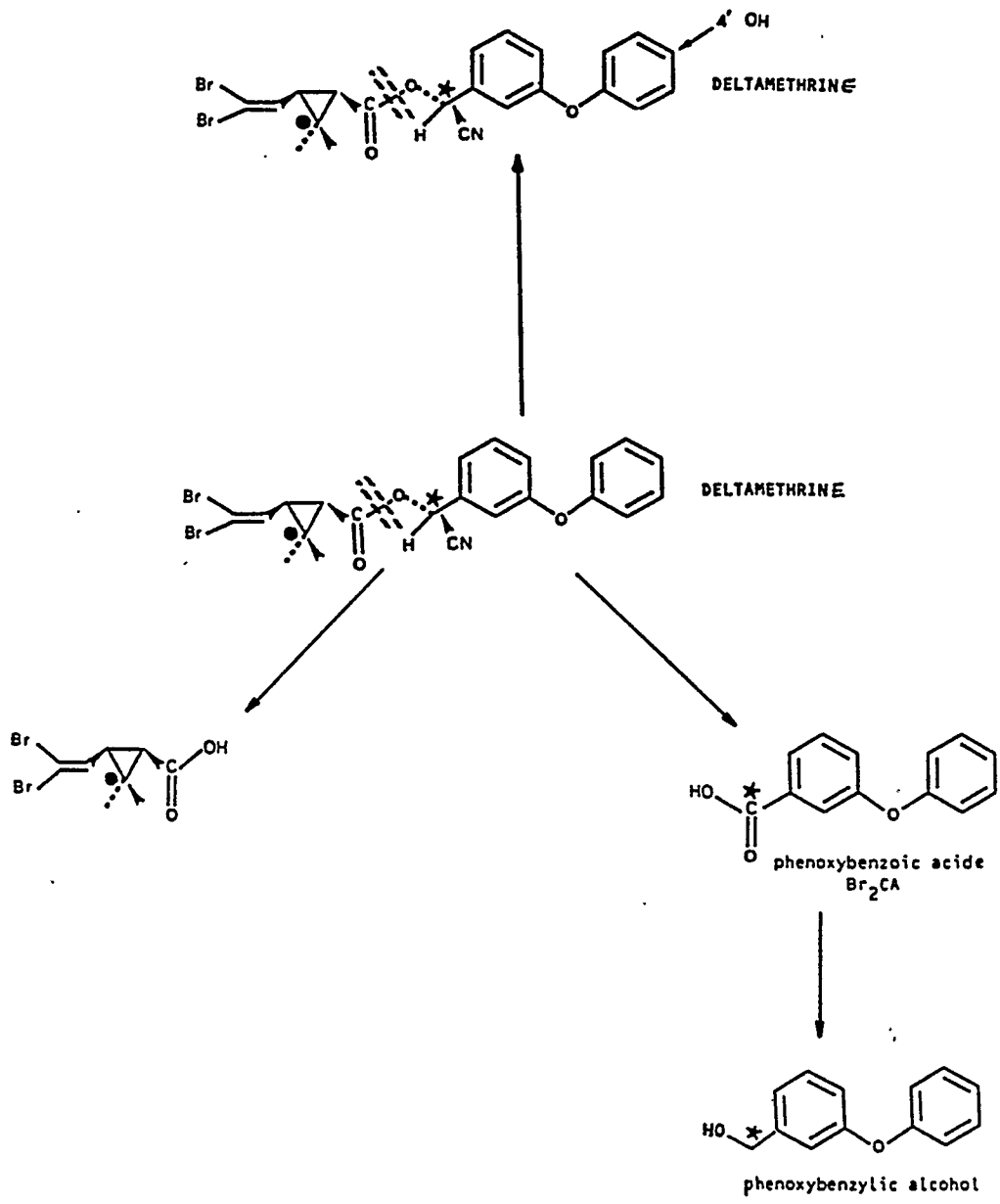


Fig. IV.12 - Voies principales de métabolisation de la deltaméthrine chez *S. littoralis*

3.3. Métabolisation *in vitro* du DDT

3.3.1. Introduction

La métabolisation du DDT a été étudiée chez de nombreux organismes. La plupart des métabolites du DDT ont été identifiés (annexe n°3).
Ayant à notre disposition plusieurs métabolites connus du DDT nous les utiliserons comme standards en chromatographie couche mince afin de pouvoir identifier les métabolites obtenus.

3.3.2. Matériel et méthodes

Milieu réactionnel :

^{14}C DDT : 5 μl (0,5 μCi)
Tampon phosphate 50 mM, pH 7.2 qsp : 500 μl
NADPH 4 mM : 0 ou 13 μl
Préparation microsomale : 600 μg de protéine

Quatre essais sont effectués : Sensible - NADPH
Résistant - NADPH
Sensible + NADPH
Résistant + NADPH

Incubation et extraction des métabolites :

La réaction incube à 30°C pendant 30 minutes.

La réaction est stoppée par l'ajout de 1.5 ml de cyclohexane ; selon le même procédé que précédemment, la phase organique est récupérée après homogénéisation, puis séchée et déposée sur plaque C.C.M. en même temps que les standards : DDT et plusieurs de ses métabolites connus DDD, DDE, DDA, DDMU, DDOH, dicofol.

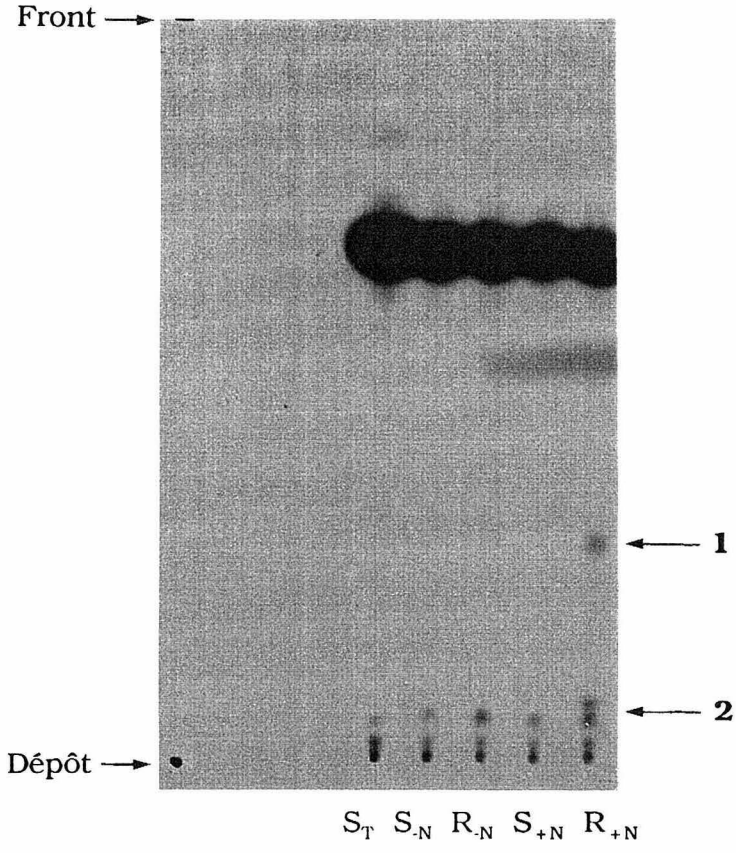
C.C.M. :

On effectue deux migrations dans un solvant contenant :

- 100 ml d'Hexane ;
- 1 ml d'Acide acétique ;
- 1 ml d'Acétate d'éthyle.

La plaque est ensuite enhancée puis autoradiographiée.

3.3.3. Résultats et discussion



S_T = Standard
S = Sensible N = NADPH
R = Résistante

Fig. IV.13 - Métabolisation *in vitro* du DDT chez *S. littoralis*

Sur la Figure IV.13 qui représente l'autoradiogramme obtenu après métabolisation du DDT par les microsomes de *S. littoralis*, on distingue deux métabolites du DDT.

La formation de ces deux métabolites est NADPH dépendante. Ils sont produits uniquement par les microsomes de la souche résistante.

* **Le métabolite 1** a un Rf de 0,3. Il s'agit d'un composé moyennement polaire qui migre avec un Rf très proche de celui du dicofol.

* **Le métabolite 2** a un Rf de 0,07. Ce composé est donc très polaire et correspondrait, d'après son Rf, à un intermédiaire entre le DDA et le dicofol.

Ce métabolite est également observé chez la drosophile (communication personnelle CUANY) mais n'a pas été identifié (CUANY et *al.*, 1990).

Les principales voies de métabolisation du DDT chez les insectes sont une déchlorination par les glutathion-S-transférases et des oxydations par les cytochromes P450, (Annexe n°9.1).

Une oxydation forte du DDD, peut conduire au DDA, ou DDE. Une moyenne oxydation conduit au dicofol qui peut ensuite être transformé en DDOH, ou DDA (Annexe n°9.2.).

Une étude menée par LANGEN et *al.*, (1989) montre que la présence de DDA semble indiquer que tous les autres métabolites seraient générés par le système oxydasique.

Chez la drosophile, la métabolisation du DDT produit six métabolites dont trois sont NADPH-dépendants, le DDD, le DDOH et le kelthane.

Chez cette espèce la production de métabolites du DDT est neuf fois plus importante chez la souche résistante que chez la souche de référence.

La résistance ferait intervenir dans ce cas le système oxydasique dont les cytochromes P450 (CUANY et *al.*, 1990).

Les résultats de la métabolisation du DDT obtenus chez *S. littoralis* montrent également qu'il existe des différences quantitatives mais aussi qualitatives qui laisse supposer un polymorphisme plus important des cytochromes P450 de la souche résistante.

A partir de ces données et des résultats présentés précédemment, nous avons proposé la voie de métabolisation du DDT chez les larves résistantes de *S. littoralis* schématisée sur la Figure IV.14.

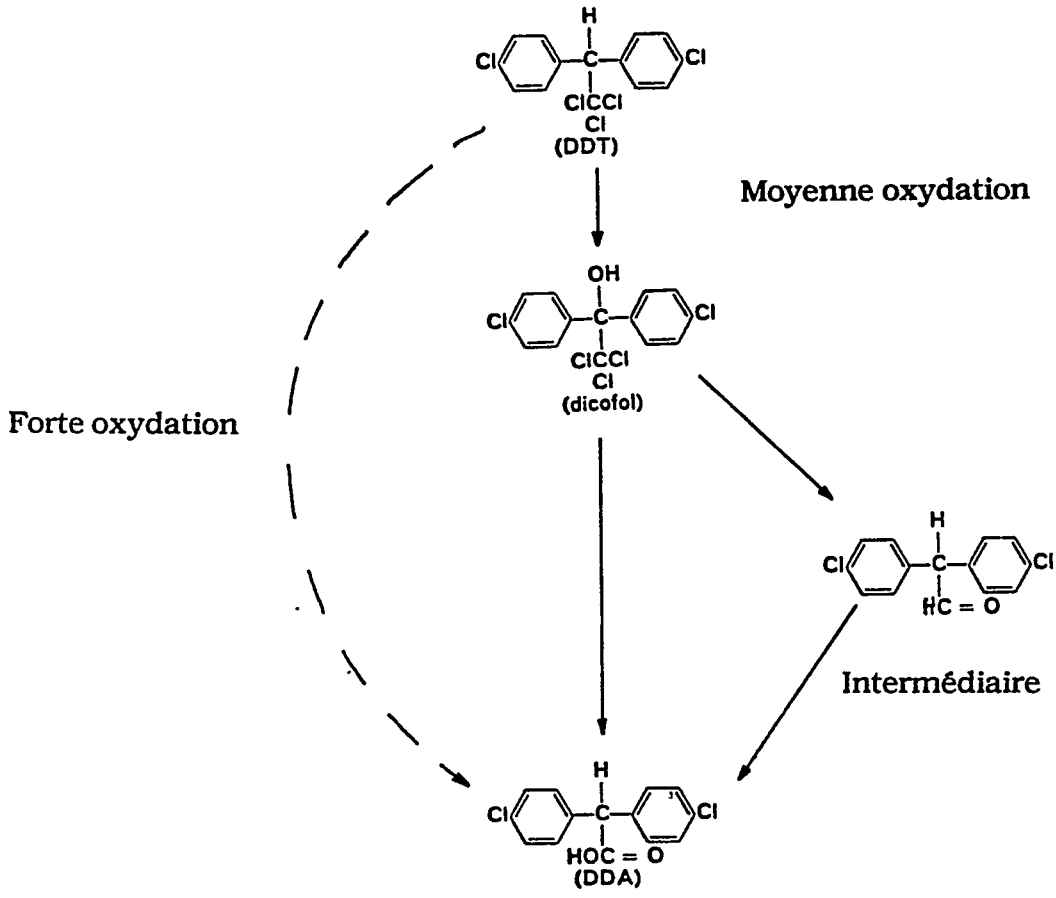


Fig. IV.14 - Voies de métabolisation
in vitro du DDT par les microsomes des larves résistantes de *S. littoralis*

Le schéma ci-dessus est une proposition des voies possibles de métabolisation du DDT, pour confirmer cette hypothèse une identification des métabolites du DDT produits sera nécessaire.

3.4. Métabolisation de la testostérone

3.4.1. Introduction

Bien que la testostérone n'existe pas chez les insectes, qui possèdent d'autres stéroïdes, elle est utilisée comme substrat modèle pour caractériser les cytochromes P450 chez les larves de *S. littoralis*. Cette molécule comporte de nombreux sites possibles d'hydroxylation sur les cycles, la comparaison des métabolites obtenus chez la souche sensible et résistante permettra de mettre en évidence des différences de métabolisation.

La testostérone que nous avons utilisé pour nos expérimentations est marquée au ^{14}C (AMERSHAM FRANCE).

3.4.2. Matériel et méthodes

La testostérone marquée au ^{14}C est dilué dans le toluène, avant de commencer l'essai on évapore le toluène et on reprend la testostérone dans l'éthanol ; la pureté de la solution est vérifiée en autoradiographie.

Milieu réactionnel :

^{14}C Testostérone : 5 μl (0,5 μCi)
Tampon phosphate 50mM, pH 7,2 qsp : 500 μl
NADPH 40 mM : 0 ou 13 μl
Préparation microsomale : 600 μg de protéine

Incubation et extraction :

La réaction incube 30 mn à 30°C, puis est stoppée avec du dichlorométhane (1,5 ml) ; les métabolites sont extraits dans les mêmes conditions que pour les autres expériences de métabolisation.

Le dépôt sur plaque est ensuite effectué.

C.C.M. :

Deux migrations sont réalisées successivement dans les solvants 1 et 2 :

Solvant 1 :

- 200 ml de Dichlorométhane ;
- 50 ml d'Acétone.

Solvant 2 :

- 200 ml de Chloroforme ;
- 50 ml d'Acétate d'éthyl ;
- 35 ml d'Ethanol.

La plaque est ensuite enhancée puis autoradiographiée dans les mêmes conditions que précedemment.

3.4.3. Résultats et discussion

L'étude de la métabolisation *in vitro* de la testostérone permet de visualiser les métabolites obtenus chez les souches sensibles et résistantes de *S. littoralis* (Fig. IV.15).

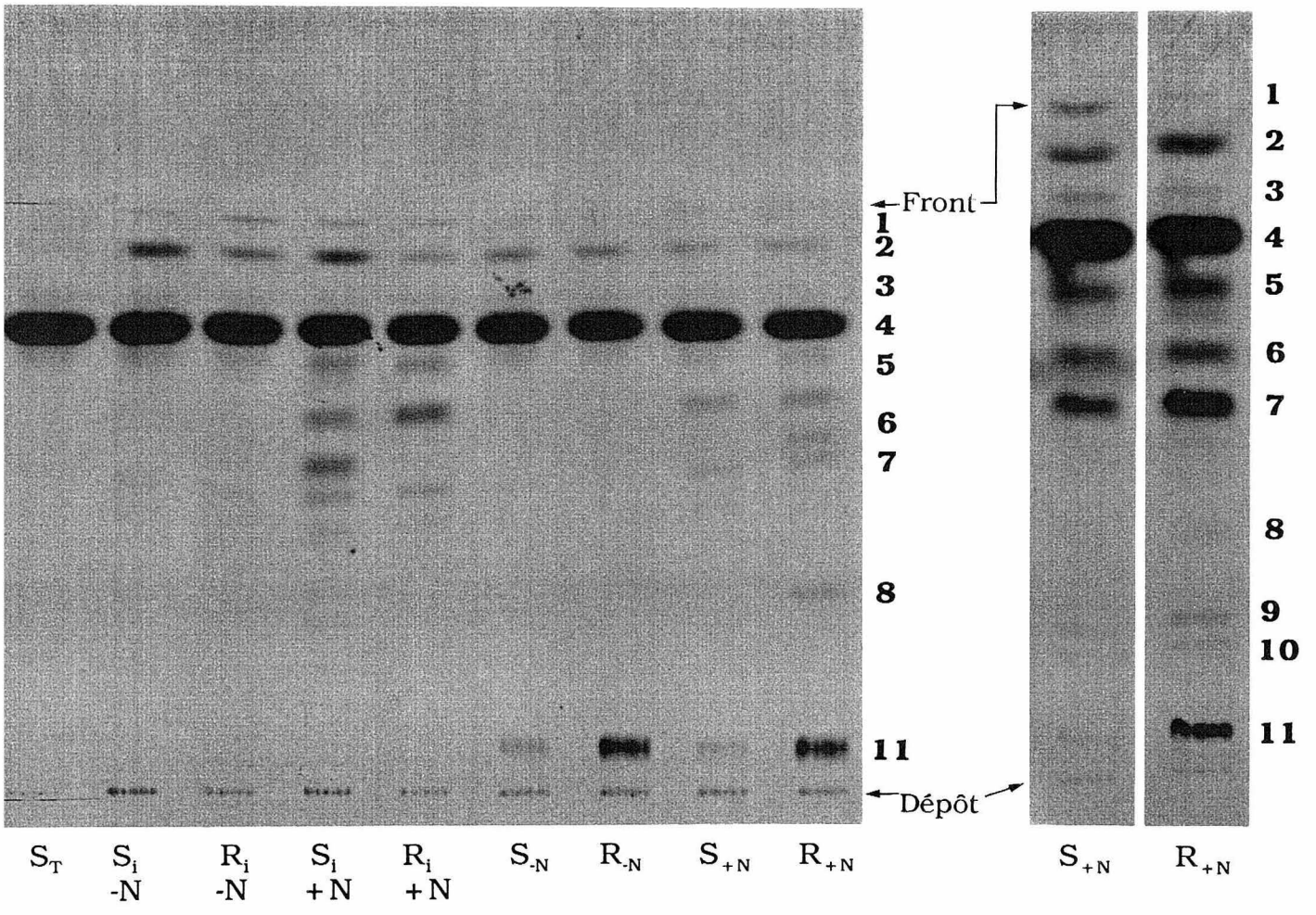
En se référant aux métabolites produits par les microsomes de foie de rat (WATERMAN et JOHNSON, 1991), nous avons pu suggérer une identification de certains métabolites formés par les microsomes des deux souches (Tab. IV.12).

Afin de pouvoir identifier les métabolites de la testostérone produits chez *S. littoralis* par rapport à ceux produits chez le rat, nous prendrons comme référence un Rfr (relatif) de la testostérone égal à 1.

Tab. IV.12 - Identification des métabolites de la testostérone produits par les microsomes de larves de *S. littoralis*

N°	Rfr	Nom du métabolite	Souche sensible	Souche résistante	NADPH
1	1,22	Progestérone	+ +	+ +	--
2	1,18	Androstènedione	+ +	+ +	--
3	1,13	5α-androstane,3one,7ol	+ +	+ +	--
4	1,00	Testostérone	+ + +	+ + +	--
5	0,95	6-Déhydro-T	+	+ +	+ +
6	0,78	2α-OH-T	+	+ +	+ + +
7	0,65	6ß-OH-T	+ +	+ +	+ + +
8	0,46	7α-OH-T	-	+ +	+ +
9	0,29	16α-OH-T	+	+ +	+ + +
10	0,24	15α-OH-T	+	+ +	+ + +
11	0,08	Diols	+	+ + +	--

+ = Quantité faible
+ + = Quantité moyenne
+ + + = Quantité importante
- = Quantité très faible
-- = Quantité extrèmement faible
-- = Quantité nulle



(Répétition : migration plus longue)

S_T = Standard
S = Sensible
R = Résistante

N = NADPH
i = intestin

Fig. IV.15 - Métabolisation *in vitro* de la testostérone chez *S. littoralis*

L'observation de l'autoradiogramme obtenu après métabolisation de la testostérone par les microsomes de *S. littoralis* permet de mettre en évidence onze métabolites.

La production de quatre de ces métabolites est strictement NADPH dépendante :

le 2 α-OH, le 6 ß-OH, le 15 α-OH et le 16 α-OH.

En présence de NADPH, la production des métabolites 6-OH et 7α-OH augmente.

La formation de l'androstènedione et des diols n'est pas NADPH dépendante.

La métabolisation de la testostérone a été largement étudiée chez les mammifères, en particulier chez le rat.

Ces études ont procédé à l'identification des métabolites de la testostérone (WAXMAN et *al.*,1988 ; CHENG et *al.*, 1983 ; JANSSON et *al.*, 1985).
D'autres études ont apportées des résultats intéressants sur les formes de cytochromes P450 impliquées, suivant les sites d'hydroxylation de la molécule (WAXMAN, et *al.*, 1983).

Chez les insectes, il existe très peu de données sur ce sujet.

En 1990, une étude sur la métabolisation de la testostérone par des microsomes de *Drosophila melanogaster* a été réalisée par CUANY et *al.*

LAGADIC et CRESTEIL (1993) viennent de publier une étude sur la métabolisation de la testostérone chez *S. littoralis.*

N'ayant pas à notre disposition de métabolites standards de la testostérone, nous avons analysé nos résultats par analogie avec les microsomes de foie de rat (WATERMAN et JOHNSON, 1991). Si l'on se réfère à l'étude menée par LAGADIC et CRESTEIL (1993), on retrouve la plupart des métabolites majeurs :

- la progestérone (**1**),
- l'androstène-dione (**2**),
- la 5α-androstane-3-one-7ß-ol (**3**),
- la 2α-hydroxytestostérone (**6**),
- la 6ß-hydroxytestostérone (**7**),
- la 16α-hydroxytestostérone (**9**).

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas trouvé certains métabolites cités par LAGADIC et CRESTEIL, (1993) : la 2ß-OH, et la 6ß-OH.

La composition des mélanges éluants et les conditions de migration ayant permis la séparation des métabolites sont différentes dans ces deux études. Ceci pourrait expliquer que ces métabolites n'apparaissent pas dans nos conditions expérimentales.

De plus, les métabolites 2ß-OH et 6α-OH migrent avec un Rf très proche de la 2α-OH et la 6ß-OH. Il est donc parfois difficile de les dissocier.

En revanche, nos résultats mettent en évidence la présence de deux autres métabolites non décrits par LAGADIC et CRESTEIL, (1993) : la 7α-OH et la 15α-OH présents en plus grande quantité chez les insectes résistants que chez les insectes sensibles et dont la formation est partiellement NADPH-dépendante.

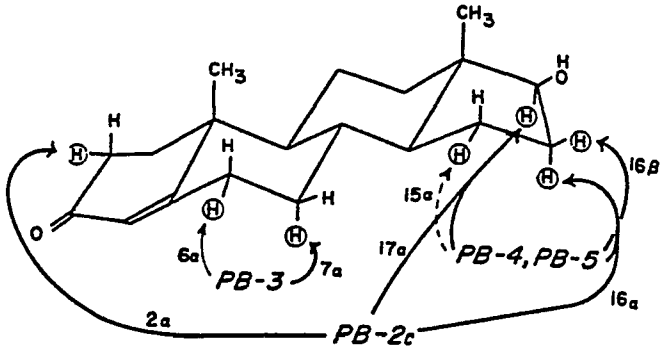
Une identification des différents métabolites de la testostérone chez *S. littoralis* s'avère nécessaire pour confirmer ces résultats.

Chez *D.melanogaster*, les métabolites de la testostérone sont identiques chez la souche résistante et la souche de référence, mais la quantité de métabolites est plus importante chez la souche résistante. L'électrophorèse des protéines microsomales révèle la présence d'une bande plus marquée chez cette souche résistante. La résistance de cette souche serait liée à une augmentation des formes de cytochromes P450 (CUANY et *al.*, 1990).

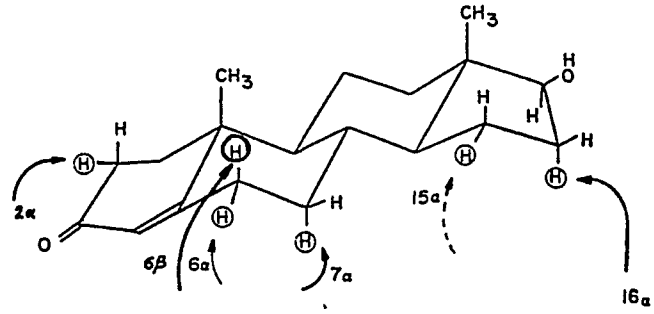
Il est probable que le même phénomène se produise chez *S.littoralis*.

En se référant à l'étude menée par WAXMAN et *al.*, (1983), sur la régiosélectivité de l'hydroxylation de la testostérone par les cytochromes P450 de rat, il est intéressant d'émettre des hypothèses sur les caractéristiques des cytochromes P450 impliqués chez *S.littoralis* (Fig. IV.16).

L'hydroxylation de la testostérone en différents sites chez *S. littoralis* présente certaines analogies avec les résultats obtenus chez le rat (WAXMAN et *al.*, 1983).



Chez le rat



Chez *S. littoralis*

Fig. IV.16 - Sites d'hydroxylation de la testostérone chez le rat et chez *S. littoralis*

Il est probable qu'il existe chez *S. littoralis*, au moins deux formes de cytochromes dont la régiosélectivité se rapproche de celle des cytochromes PB-3 et PB-2c du foie de rat.

Ces résultats devront être confirmés par l'identification des métabolites de la testostérone.

3.5. Conclusion de l'étude du métabolisme

Les expériences de métabolisation ont permis de mettre en évidence des différences au niveau enzymatique entre les deux souches sensibles et résistantes.

Pour les différents substrats testés, on observe une quantité plus importante de métabolites chez la souche résistante que chez la souche sensible.

De plus, nous avons montré que l'activité de certaines enzymes de détoxification était plus élevée chez la souche résistante.

La métabolisation par les enzymes microsomales de la souche résistante serait donc accrue.

Cette hypothèse demande à être vérifiée ; la quantification des métabolites obtenus pour différents substrats fera l'objet d'une publication.

Les expériences de métabolisation montrent également des différences qualitatives.

La métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine fait apparaître un métabolite dont la formation est NADPH dépendante, ce métabolite est produit uniquement chez la souche résistante.

La métabolisation du DDT permet de mettre en évidence deux métabolites présents uniquement chez la souche résistante également.

Enfin la métabolisation de la testostérone se produit de manière à peu près identique à part pour un métabolite le 7-α OH.

Ces résultats suggèrent donc qu'il existe des formes différentes de cytochromes P450 impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez les deux souches.

Une étude plus poussée des formes enzymatiques impliquées serait nécessaire.

En conclusion de cette étude du métabolisme il apparait que l'activité des monooxygénases à cytochrome P450 cinq fois plus élevée chez la souche résistante que chez la souche sensible peut être corrélée à la résistance aux pyréthrinoïdes.

Les résultats des tests de métabolisation confirment cette différence quantitative et suggèrent que certaines formes de cytochrome P450 impliqués dans la résistance seraient différentes des cytochromes présents chez la souche sensible.

L'ensemble des résultats de l'étude du métabolisme montrent que la résistance est en partie d'ordre métabolique. Les tests de toxicité de la deltaméthrine ont montré que la résistance était polygénique et qu'en présence de PB le CR passe de 1600 à 90, il est donc probable qu'un autre mécanisme soit aussi impliqué.

Aussi, nous avons étudié un dernier mécanisme possible : la modification de la cible.

C. *MESURE DE LA SENSIBILITE DU SYSTEME NERVEUX A LA DELTAMETHRINE* IN SITU *CHEZ* S. LITTORALIS

1. INTRODUCTION

Les résultats précédents ont montré que la résistance à la deltaméthrine chez la souche Sharkia était en partie dûe à une métabolisation accrue par les systèmes oxydasiques (cytochromes P450).

De plus les tests d'application topique du DDT ont montré qu'il existe un coefficient de résistance au DDT de l'ordre de quatre.

Il nous a paru important de savoir s'il existait en plus d'une résistance de type métabolique, une résistance au niveau de la cible constituée par les canaux Na^+ potentiel dépendant. Nous avons donc comparé la sensibilité à la deltaméthrine *in situ* du système nerveux des deux souches.

2. MATERIEL ET METHODES

Le test consiste à mesurer l'activité électrique globale d'une chaîne nerveuse isolée par dissection ventrale de larves de 4ème stade.

Les préparations nerveuses sont placées dans deux compartiments d'une petite cuve expérimentale (en altuglass). Ces deux compartiments sont électriquement isolés par un pont de vaseline et contiennent un milieu physiologique de composition : NaCl 150 mM, KCl 3 mM, $MgCl_2$ 3 mM, HEPES 10 mM (pH : 6,8).

Ce système expérimental permet de mesurer dans de bonnes conditions l'activité électrique globale spontanément émise par les cellules de la chaîne nerveuse. L'activité électrique est récupérée par deux électrodes extracellulaires situées dans chacun des compartiments et reliées à un amplificateur différentiel (gain 1000 - filtrage 300-3000 Htz) (Fig. IV.17.A)

Les potentiels d'action ainsi mesurés sont comptés grâce à un système électronique et l'histogramme fréquence/temps obtenu est imprimé sur un enregistreur papier (Fig. IV.18, IV.19). Ainsi l'activité électrique sera enregistrée pendant environ 30 minutes est assez régulière en fréquence avec de temps en temps quelques "bouffées" de potentiel d'action se traduisant par un pic sur l'histogramme.

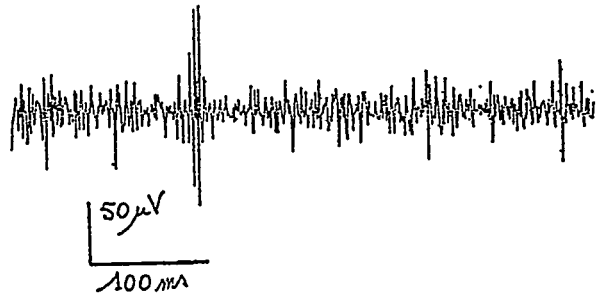
Le système complet d'enregistrement permet de mesurer simultanément la réponse de quatre chaînes nerveuses.

Différentes concentrations de deltaméthrine sont préparées en dilution dans du DMSO . Cette solution est introduite dans du milieu physiologique au moment du test (la concentration de DMSO finale est constante : 0,2%).

Après un temps d'enregistrement témoin, la solution physiologique normale de l'un des compartiments est remplacée par celle contenant la deltaméthrine. L'action du produit est ensuite suivie sur l'histogramme Fréquence/temps (Fig. IV.18).

L'effet de la deltaméthrine sur l'activité électrique se traduit par une augmentation progressive de la fréquence de potentiels d'action. Cette hyperexcitation devient quantitativement très importante après une quinzaine de minutes d'action avec une dose faible de produit (Fig. IV.17.B).

A. Témoin



B. Application de deltaméthrine (10^{-9} M)

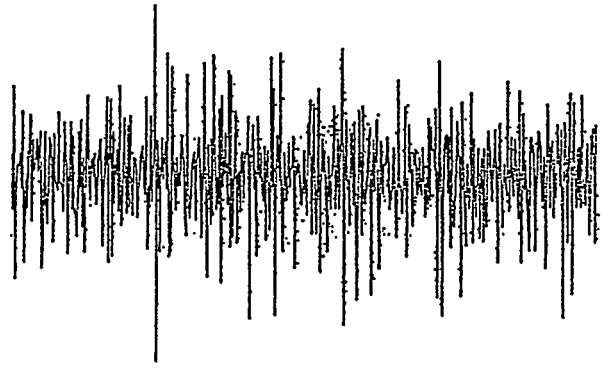


Fig. IV.17 - Exemple d'enregistrement de l'activité électrique de la chaîne nerveuse chez une larve de *S. littoralis* sensible.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

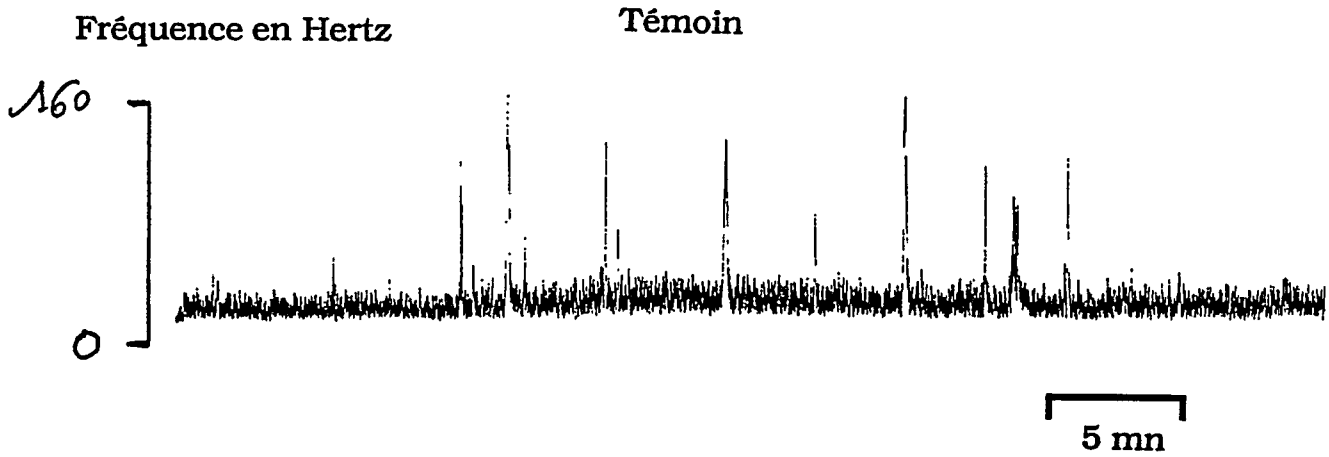


Fig. IV.18 - Enregistrement de l'activité d'une chaîne nerveuse isolée

En l'absence de traitement insecticide ou de stimulation extérieure, l'enregistrement de l'activité spontanée de la chaîne nerveuse montre que l'activité des préparations est relativement faible. Cette activité correspond probablement aux potentiels d'action nerveux. On observe quelquefois de plus grands pics qui correspondent sans doute aux courants de jonctions synaptiques.

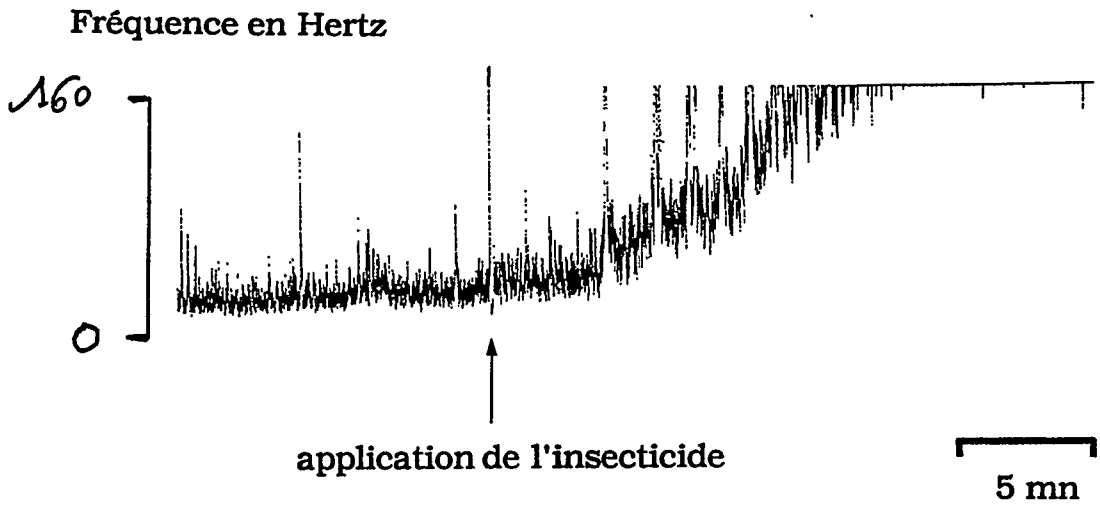


Fig. IV.19 - Effet de l'application d'insecticide

Les effets de la deltaméthrine et des pyréthrinoïdes en général, sur les canaux sodium potentiels dépendant des cellules nerveuses ont été largement étudiés (LAUFER et PELHATE, 1985) et décrits dans le premier chapitre de notre document.

Une légère dépolarisation des membranes cellulaires est responsable dans le cas de notre expérimentation de l'hyperexcitabilité des membranes cellulaires et donc de l'augmentation importante de l'activité électrique spontanée mesurée en fonction du temps. L'action de la deltaméthrine se produit à des doses très faibles (0,1 à 1nM). Sur une chaîne nerveuse contenant un grand nombre de cellules de petites tailles, et des axones de faibles diamètres, une dépolarisation de quelque millivolts suffit à perturber très efficacement l'excitabilité cellulaire. L'augmentation progressive de la fréquence des PA provient à la fois d'une dépolarisation progressive des membranes et d'un nombre de cellules affectées qui augmente avec le temps (pénétration progressive du pyréthrinoïde dans les ganglions) (communication personnelle de M. ROCHE).

Quantification de l'effet de la deltaméthrine :

Pour chaque dose de produit testé la réponse d'une chaîne nerveuse donnée est notée positive (déclenchement d'une hyperexcitation) ou négative.
De 4 à 8 chaînes nerveuses sont testées pour chaque dose.

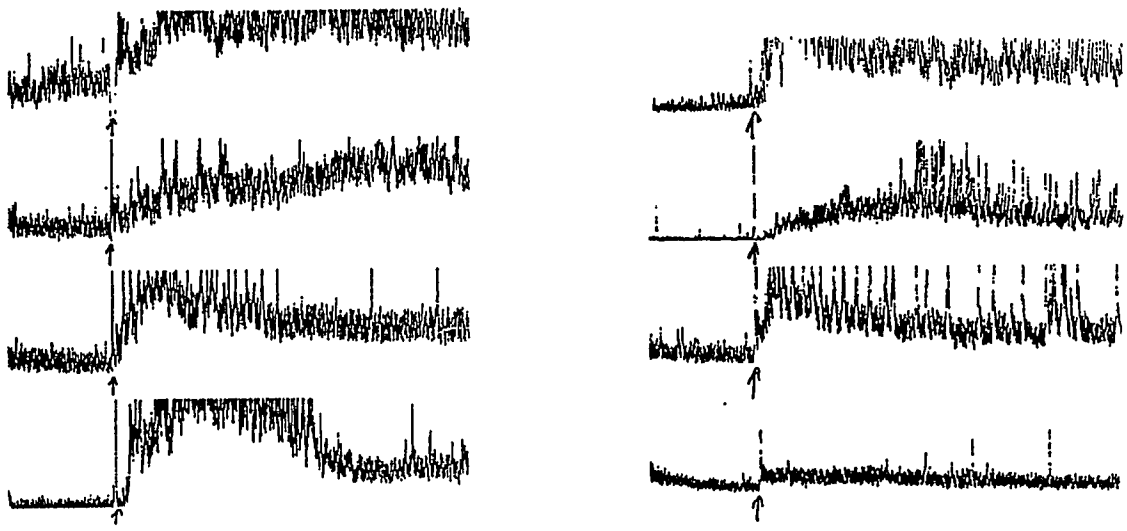


Fig. IV.20 - Enregistrements de la réponse de 8 chaînes nerveuses à une dose de deltaméthrine (3.10^{-9} M) chez la souche R

On peut donc établir la courbe du % de chaînes nerveuses présentant une hyperexcitation en fonction de la dose de deltaméthrine dans le milieu physiologique.

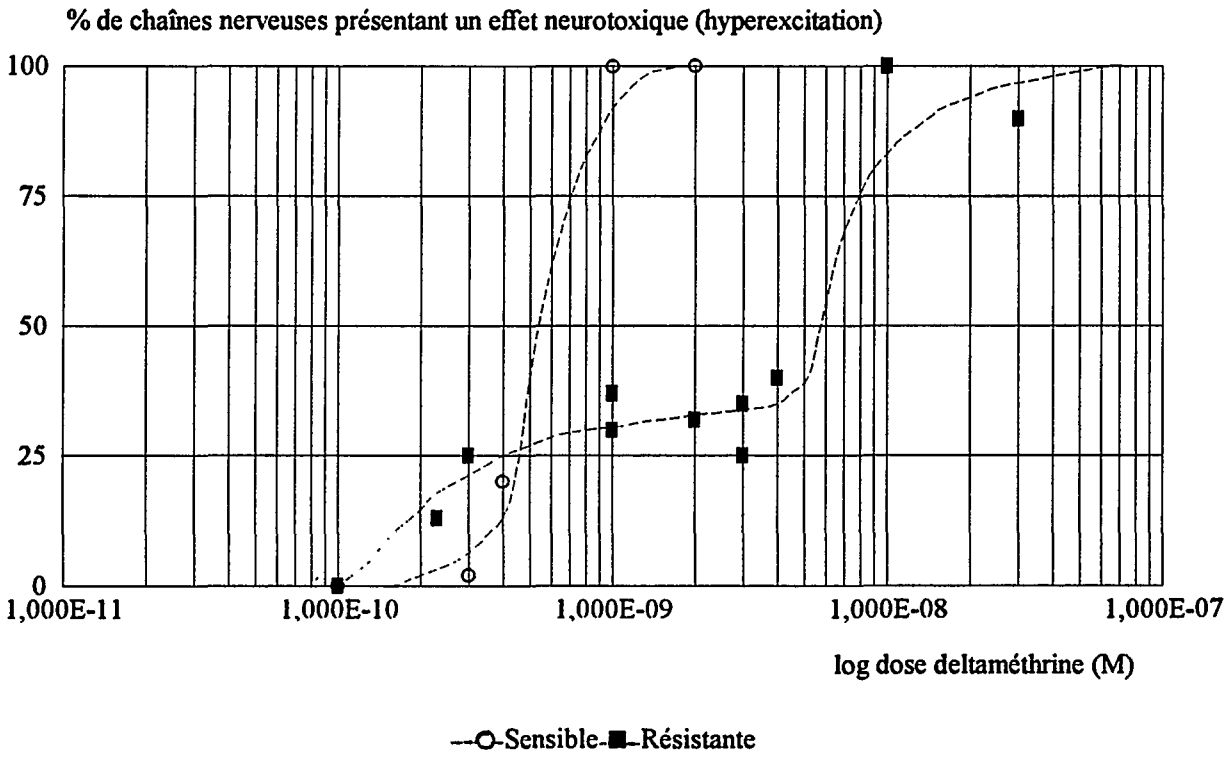


Fig. IV.21 - Courbe de l'hyperexcitation des chaînes nerveuses des deux souches en fonction de la dose de deltaméthrine

La figure ci-dessus montre qu'il existe une différence entre la réponse des chaînes nerveuse issues des souches sensible et résistante en fonction de la dose appliquée.

La dose de deltaméthrine à appliquer pour avoir une excitation de 50% des chaînes nerveuses testées ou CE50 est de $5,5.10^{-10}$ M pour la souche sensible et de $5,5.10^{-9}$ M pour la souche résistante.

Si l'on établit le facteur de résistance de la cible comme étant le rapport de ces deux valeurs, ce facteur est de l'ordre de 10.

Ces mesures d'électrophysiologie ont permis de montrer que la sensibilité du système nerveux des larves était diminué avec un facteur de résistance de la cible de l'ordre de 10.

Des études approfondies, permettraient de préciser le type de modification mis en jeu mais ces techniques dépassent le cadre de notre sujet de thèse et éventuellement pourront être étudiées ultérieurement.

La résistance à la deltaméthrine s'explique donc par un mécanisme métabolique associé à la modification de la cible de l'insecticide au niveau du système nerveux.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Notre étude avait pour but de déterminer les **mécanismes de résistance à la deltaméthrine** chez un insecte ravageur du cotonnier, *S. littoralis* afin d'améliorer la gestion de la résistance sur le terrain.

La recherche des mécanismes de résistance a été effectuée en utilisant deux souches de *S. littoralis* :

- une souche d'origine égyptienne résistante aux pyréthrinoïdes (souche R)
- une souche de référence sensible (souche S).

Les résultats des tests de toxicité ont permis de calculer, pour différents insecticides, le coefficient de résistance (CR).

le coefficient de résistance à la deltaméthrine chez la souche R est de **1 600**.

Des tests de toxicité avec un autre pyréthrinoïde, la cyperméthrine ont montré qu'il existait une résistance croisée à ce pyréthrinoïde (CR = 78).

Au contraire cette souche R, ne présente pas de résistance croisée aux organophosphorés tels que le chlorpyriphos-éthyl (CR = 1,3).

Le coefficient de résistance au DDT est de quatre (CR = 4,2), ce qui laisse supposer qu'il existe **une résistance croisée vis-à-vis de cet organochloré**.

L'héritabilité de la résistance étudiée par des tests de toxicité de la deltaméthrine sur les larves issues de différents croisements (F1 et backcross) semble indiquer également que la **résistance est polygénique**.

Nous avons donc décidé d'étudier les principaux mécanismes pouvant expliquer la résistance aux insecticides :

- la modification de la pénétration,
- la modification du métabolisme,
- la modification de la cible.

Dans un premier temps, des travaux sur la **pénétration de la deltaméthrine** ont permis de montrer que ce mécanisme **n'intervient pas dans la résistance**. En effet, l'application d'une dose de deltaméthrine marquée au carbone 14 à différents temps permet d'établir que la cinétique de pénétration de la deltaméthrine est identique chez les larves des deux souches sensible et résistante.

Nous avons ensuite étudié la résistance métabolique.

L'utilisation d'un inhibiteur d'oxydases, le **PB**, augmente la toxicité de la deltaméthrine ; le coefficient de résistance passe de **1 600 à 90** en présence d'inhibiteur.

Ce résultat laisse supposer que les monooxygénases jouent un rôle dans la résistance.

De plus, ceci ouvre des perspectives intéressantes quant à l'utilisation du PB pour la gestion de la résistance aux pyréthrinoïdes sur le terrain.

Par contre le DEF inhibiteur d'estérases ne modifie pas la toxicité de la deltaméthrine.

Le coefficient de résistance à la deltaméthrine reste stable en présence de DEF.

Dans ce cas on ne peut pas émettre d'hypothèse quant au rôle des estérases dans la résistance.

D'après ces premiers résultats, **la résistance métabolique** serait un des **mécanismes possibles** responsable de la résistance aux pyréthrinoïdes chez la souche étudiée.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons effectué une étude biochimique des enzymes de détoxification des pyréthrinoïdes.

Les mesures d'activité des estérases vis-à-vis de deux substrats spécificiques l'α-naphtyl et le ß-naphtyl-actétate montrent que **l'activité estérasique est la même** chez les deux souches.

Par contre, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet d'observer des profils estérasiques différents pour les deux souches.

Ce résultat pourrait s'expliquer par l'origine géographique différente des deux souches.

En ce qui concerne les monooxygénases, la spectrophotométrie permet de calculer les teneurs en cytochromes P450 dans les fraction microsomiales, elles sont identiques chez les deux souches.

Les mesures d'activité de déséthylation des monooxygénases à cytochrome P450 montrent que **l'activité oxydasique est cinq fois plus élevée** chez la souche résistante que chez la souche sensible.

Ces résultats nous permettent de corréler la résistance à une activité accrue des monooxygénases à cytochrome P450.

Nous avons également mesuré l'activité des glutathion-S-transférases dans les fractions cytosoliques des deux souches vis-à-vis de deux substrats spécifiques de ces enzymes le CDNB et le DCNB.

L'activité des GST vis-à-vis du substrat **CDNB, est 1,5 fois plus élevée** chez la souche résistante que chez la souche sensible.
Par contre, l'activité vis-à-vis du DCNB est identique.

les glutathion-S-transférases pourraient intervenir dans la résistance.

L'étude enzymatique permet donc de confirmer les résultats obtenus avec les inhibiteurs d'enzymes.

La résistance métabolique serait donc impliquée dans le phénomène de résistance aux pyréthrinoïdes et serait due à une activité accrue des oxydases.

Pour préciser et caractériser le rôle de ces enzymes nous avons étudié la métabolisation de divers substrats par les fractions microsomales des deux souches.

Les tests de métabolisation *in vitro* et *in vivo* de la deltaméthrine ont permis de proposer une voie métabolique de la deltaméthrine chez *S. littoralis* et de mettre en évidence des différences qualitatives et quantitatives au niveau des métabolites produits par les microsomes des deux souches.

La métabolisation *in vitro* du DDT par les enzymes microsomales met en évidence deux métabolites observés seulement chez la souche résistante et provenant d'une forte oxydation.

La métabolisation *in vitro* de la testostérone par les fractions microsomales des deux souches permet une caractérisation fonctionnelle des cytochromes P450.

Les cytochromes P450 des deux souches diffèrent quant à la régiosélectivité de l'hydroxylation de la testostérone.

Les caractéristiques des cytochromes P450 ne semblent pas identiques pour les deux souches.

Il semble qu'il existe au moins deux formes de cytochrome P450 impliqués dans la résistance ; les caractéristiques de ces cytochromes sont proches de celles des cytochromes P450 3-C et 2-C du foie de rat.

Ces résultats ont donc fait apparaître que **la modification du métabolisme** par les monooxygénases à cytochrome P450 **est** un des mécanismes **impliqués** dans la résistance.

Le mécanisme de résistance métabolique ne peut à lui seul expliquer un coefficient de résistance aussi élevé. De plus la première partie de l'étude montrait qu'il existait une résistance croisée au DDT et que la résistance semblait polygénique.

Nous avons donc étudié la sensibilité du système nerveux aux pyréthrinoïdes chez les deux souches.

Des mesures d'électrophysiologie sur chaînes nerveuses isolées de larves des deux souches ont permis d'établir le % de chaînes nerveuses hyperexcitées en fonction de la dose de deltaméthrine appliquée.
Cette étude nous a permis de mesurer un facteur de résistance du système nerveux de l'ordre de 10.

Nous avons donc montrer que la résistance à la deltaméthrine était dûe à une résistance métabolique et à une modification de la cible au niveau du système nerveux. La résistance métabolique est essentiellement due à une augmentation de l'**activité des monooxygénases à cytochromes P450** et à l'intervention de **formes de cytochromes P450 impliquées différentes** de celles de la souche sensible.

Au niveau fondamental, cette étude ouvre des perspectives intéressantes.

Il serait intéressant dans un premier temps de caractériser les cytochromes P450 des deux souches, ceci éventuellement en utilisant des substrats plus spécifiques, et à l'aide de techniques de biochimie (électrophorèse de protéines).

L'étude de la modification de la cible pourrait également être plus approfondie. L'utilisation de techniques récentes en électrophysiologie (Patch-Clamp) permettrait ainsi de définir avec plus de précision cette modification au niveau du système nerveux.

Au niveau appliqué, les résultats de notre étude permettent d'envisager des orientations pour la gestion de la résistance sur le terrain.

Nous avons montré que l'utilisation de butoxyde de pipéronyle ou PB augmentait la toxicité de la deltaméthrine chez la souche résistante de *S. littoralis*.

L'association PB-deltaméthrine pourrait être utilisée au champ pour lutter contre les larves résistantes aux pyréthrinoïdes.
Ce mélange est utilisé en Australie sur la culture du coton pour lutter contre *H. armigera*.

Un autre moyen de lutte utilisable pour la gestion de la résistance est le principe de la "fenêtre" qui consiste à limiter la période où les pyréthrinoïdes peuvent être utilisés. On leur substitue en début ou fin de campagne un insecticide d'origine biologique (*Bacillus thuringiensis*), un carbamate (thiodicarbe) ou un organochloré (endosulfan) (FORRESTER, 1990).

Nous avons vu que la résistance était due également à la modification de la cible.
Ce résultat suggère donc soit l'utilisation d'insecticides ayant une cible différente de celle des pyréthrinoïdes (organophosphorés, carbamates,..), soit l'association d'un insecticide d'une de ces familles avec un pyréthrinoïde.

L'utilisation d'associations d'insecticides ayant des sites d'action différents est d'ailleurs préconisée dans la prévention de la résistance, de même que la rotation d'insecticides, soit dans l'espace (mosaïque), soit dans le temps (alternance). Une étude est d'ailleurs en cours au laboratoire sur ces différentes stratégies de prévention de la résistance.

D'après les premiers résultats, l'utilisation de mélange semble la stratégie la plus indiquée (communication personnelle de T. ALAUX).

En Afrique Francophone, des associations à base de pyréthrinoïdes et d'organophosphorés (par exemple : deltaméthrine et triazophos ou cyperméthrine et chlorpyriphos-éthyl) sont utilisées depuis une dizaine d'années et pour l'instant aucun cas de résistance des Lépidoptères aux pyréthrinoïdes n'a été signalé.

Notre étude a donc permis de caractériser les différents mécanismes impliqués dans la résistance à la deltaméthrine chez *S. littoralis* et elle ouvre des perspectives au niveau fondamental comme appliqué.

ANNEXES

ANNEXE 1. : Analyse log-probit de la toxicité d'un insecticide chez un insecte

ANNEXE 1. [1]. : Analyse de la DL50
[GINER, M., Rapport Interne CIRAD-CA]

A) LE LOGICIEL D'ANALYSE DL50 Version 4.6

1) LES OBJECTIFS DU LOGICIEL

Ce logiciel permet d'analyser statistiquement, sur micro-ordinateur et de façon conversationnelle, l'effet de concentrations croissantes d'une matière active insecticide sur le taux de mortalité de lots d'insectes (relation dose x effet), par ajustement des résultats à une droite, après transformation logarithmique des concentrations, et probit des fréquences cumulées de mortalité (droite de Henry) ce qui permet de résoudre le problème de la régression entre des pourcentages et des doses. Il permet de déterminer des doses-seuils ou doses-létales remarquables (DL20, DL50, DL90) entrainant certains taux de mortalité dans la population (respectivement 20%, 50%, 90%) et de tracer le graphique de cette régression linéaire. Il permet également d'archiver les données et les résultats de chaque essai, et d'effectuer le test de parallélisme des droites de régression prises deux à deux.

2) MÉTHODE

La méthode suivie s'inspire du modèle d'analyse proposé par J. GRY (Expérimentation insecticide: détermination des doses létales - INA-PG), lui-même dérivant de celui de FINNEY (probit analysis). Sa programmation s'appuie sur l'algorithme mis au point par DAVIES complété, amélioré et testé par Mr LOTODE (IRCC). Elle comporte les étapes suivantes :

1) Saisie et archivage dans un fichier ou lecture des données : nombre de doses, nombre d'insectes testés et morts dans l'échantillon témoin non traité, doses de toxique, nombre d'insectes testés et morts pour chaque dose.

2) Transformation logarithmique des doses (log10)

3) Calcul de la proportion de mortalité corrigée pour chaque dose, en fonction de la proportion de mortalité naturelle dans le témoin, selon la formule d' ABBOTT :

$$P = \frac{(P'-C)}{(1-C)}$$

avec P = proportion de mortalité corrigée
P'= proportion de mortalité observée
C = proportion de mortalité dans le témoin

4) Conversion de la mortalité corrigée en probit empirique Y utilisant l'algorithme d'approximation polynomiale de la distribution normale inverse de HASTINGS, avec affectation des valeurs extrèmes suivantes :

8,4 pour 100% de mortalité et 1,6 pour 0%

5) Calcul de la régression provisoire probit empirique/log10 dose (droite de HENRY) aprés élimination des doses ayant donné 0 ou 100% de réponse. Si le nombre de doses restantes est inférieur à 5, le programme s'arrête.

6) Calcul itératif, par la méthode du maximum de vraisemblance (avec 10 itérations maximum), des probits attendus, des poids, des probits de travail, puis de la régression pondérée jusqu'à stabilisation de l'estimation du coefficient de régression B (écart relatif inférieur à 0,005 entre 2 itérations).

A partir de la régression provisoire on estime les probits attendus Y1, et les ordonnées Z de la courbe normale de probabilité par la formule :

$$Z = \frac{e^{(-0.5(Y-5)^2)}}{\sqrt{2\pi}}$$

La mortalité P1 correspondant à un probit attendu Y1 (c'est-à-dire l'aire en dessous de la courbe normale de moins l'infini à (Y-5)) est calculée à l'aide d'un autre algorithme d'approximation polynomiale de HASTINGS. Connaissant Z et P1 on peut alors calculer les coefficients de pondération avec la formule de FINNEY :

$$W = \frac{Z^2}{Q\left(P1 + \frac{C}{1-C}\right)}$$

où Q = 1-P1
C = proportion de mortalité dans le témoin

Les poids WN sont obtenus en multipliant ces coefficients de pondération par le nombre d'insectes testés pour chaque dose, et les probits de travail Y2 par la relation :

$$Y2 = Y1 + (P - P1) / Z$$

La régression pondérée peut alors être calculée. Le terme constant (A), la pente (B) et son écart-type sont édités.

7) Test de validité de l'ajustement linéaire (test de Chi2) et application éventuelle d'un facteur d'hétérogénéïté (Chi2/ddl) en cas de Chi2 significatif à P0.05, pour calculer les doses létales 20, 50 et 90% et leur intervalle de confiance I à P0.05 :

$$I = \pm \left(\frac{Chi2}{ddl} * t(P0.05;ddl) * \text{écart-type}\right)$$

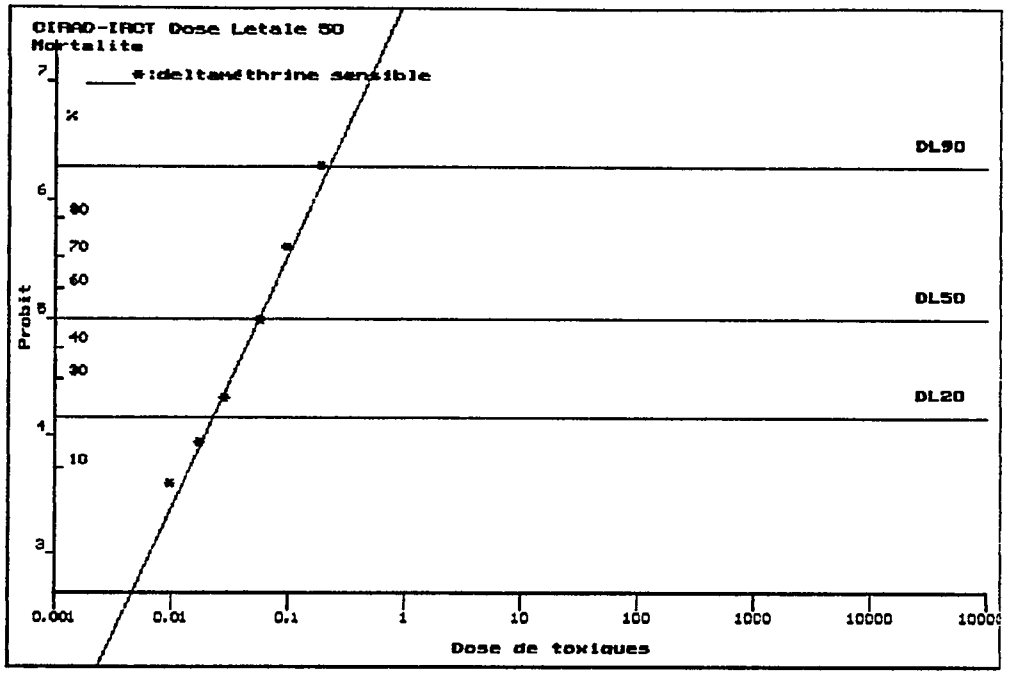
avec ddl=nombre de doses-2
sinon, en cas de Chi2 non significatif : $I = \pm 1{,}96 * \text{écart-type}$

8) Archivage des résultats en fin de fichier

9) Représentation graphique des points expérimentaux et de la droite de régression pondérée en coordonnées log.doses et probits de mortalité.

10) Comparaison de deux essais déjà analysés : test de parallélisme de deux droites de régression (test t sur l'écart entre les coefficients B1 et B2)

11) Calcul de % de mortalité et de doses létales à partir des équations des droites de régression pondérées.



Nom du fichier : DST

Titre de l'essai : **deltaméthrine sensible**
Date de l'essai :
Auteur : **Véronique Pinchard**
Espèce: ***S.littoralis s.***
Stade: **Larve 4**
Durée: **48 h**
Temp: **25°C**
Matières actives N°1 : **deltaméthrine**
N°2 :
Ratio :
Méthode de traitement : **Application topique**
Nombre de doses : **6** exprimées en : **µg/g de chenille**
Nombre d'insectes testés dans l'échantillon témoin : **90**
Nombre d'insectes morts dans l'échantillon témoin : **0**
Pourcentage de mortalité naturelle dans l'échantillon témoin : **0.00000%**

N°	Doses	Pop.test	Morts	Log10.dose	Mort.Corrigée	Probit empir.
1	0.01000	90	7	-2.00000	0.07778	3.57956
2	0.01800	90	13	-1.74473	0.14444	3.93942
3	0.03000	90	22	-1.52288	0.24444	4.30821
4	0.06000	90	44	-1.22185	0.48889	4.97222
5	0.10000	90	65	-1.00000	0.72222	5.58910
6	0.20000	90	81	-0.69897	0.90000	6.28173

Régression provisoire : Y= **7.67082 +(2.11942 *X)**
Nombre de réponses éliminées (0% ou 100% de mortalité) : **0**

Numero de dose	Probit attendu	Poids	Probit de travail
1	3.38789	21.04447	3.38789
2	3.93713	37.56702	3.93713
3	4.41446	50.52819	4.41446
4	5.06215	57.21542	5.06215
5	5.53948	51.50463	5.53948
6	6.18717	33.72648	6.18717

Régression pondérée :

** Convergence dans l'estimation du coefficient B de la régression pondérée atteinte après 2 itérations (Ecart relatif sur B < 0.005)

- Paramétres statistiques :

Sommes :

Poids	SWNX	SWNX2	SWNY	SWNY2	SWNXY
251.58621	-329.56848	469.11735	1225.83936	6148.37505	-1525.34875

Paramètres de la régression :

X moyen	Y moyen	SX2	SXY	SY2	Pente	Ecart type(B)
-1.30996	4.87244	37.39503	80.45476	175.54309	2.15148	0.16353

- Equation de la droite de régression pondérée :

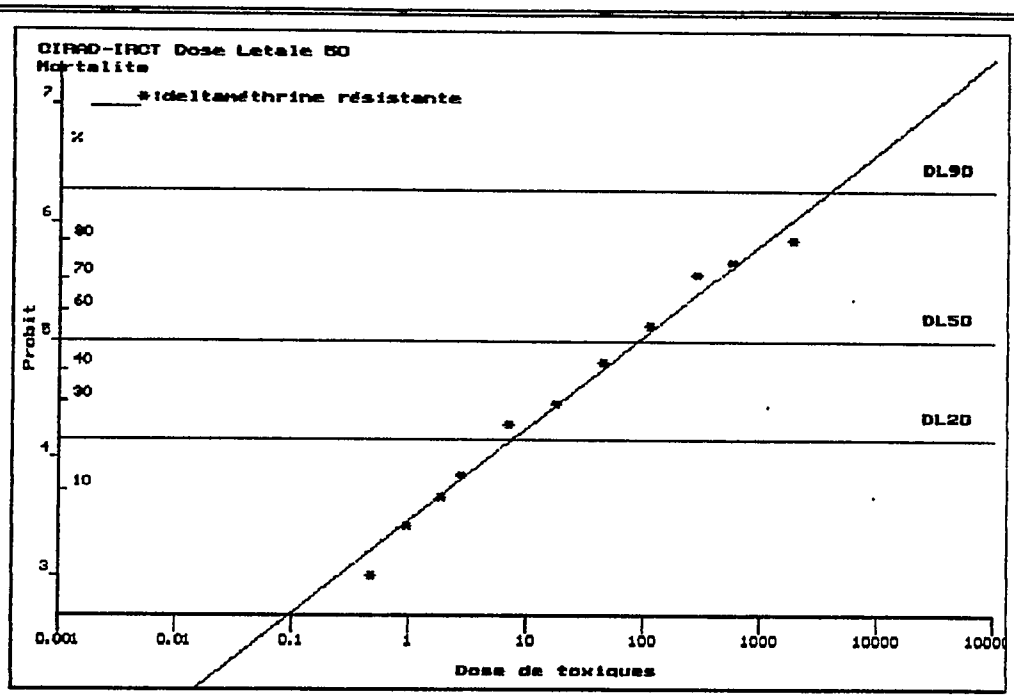
Y = 7.69080+(2.15148*X)

- Test de non linéarité de l'ajustement :

* Chi2 calculé: **2.446*** Degrés de liberté: **4*** Probabilité du Chi2: **65.432%**
** Test de Chi2 non significatif à 5% : ajustement linéaire légitime

- Doses létales et limites de confiance pour une probabilité fixée de 5 % :

	Log10.DL	Ecart-type/log.DL	Doses	Limite inférieure	Limite supérieure
DL90	-0.65499	0.05777	0.22131	0.17052	0.28723
DL50	-1.25067	0.02965	0.05615	0.04912	0.06419
DL20	-1.64185	0.03867	0.02281	0.01916	0.02716



Nom du fichier : DRT

Titre de l'essai : **deltaméthrine résistante**
Date de l'essai :
Auteur : **Véronique Pinchard**
Espèce: ***S.littoralis r.***
Stade: **Larve 4**
Durée: **48 h**
Temp: **25°C**
Matières actives N°1 : **deltaméthrine**
N°2 :
Ratio :
Méthode de traitement : **Application topique**
Nombre de doses : **11** exprimées en : **µg/g de chenille**
Nombre d'insectes testés dans l'échantillon témoin : **90**
Nombre d'insectes morts dans l'échantillon témoin : **0**
Pourcentage de mortalité naturelle dans l'échantillon témoin : **0.00000%**

N°	Doses	Pop.test	Morts	Log10.dose	Mort.Corrigée	Probit empir.
1	0.50000	90	2	-0.30103	0.02222	2.98969
2	1.00000	90	5	0.00000	0.05556	3.40644
3	2.00000	90	8	0.30103	0.08889	3.65215
4	3.00000	90	11	0.47712	0.12222	3.83595
5	7.50000	90	21	0.87506	0.23333	4.27235
6	18.93000	90	26	1.27715	0.28889	4.44375
7	47.54000	90	38	1.67706	0.42222	4.80416
8	119.41000	90	49	2.07704	0.54444	5.11138
9	300.00000	90	64	2.47712	0.71111	5.55625
10	600.00000	90	67	2.77815	0.74444	5.65679
11	2000.00000	90	72	3.30103	0.80000	5.84146

Régression provisoire : Y= **3.41610 +(0.80278 *X)**
Nombre de réponses éliminées (0% ou 100% de mortalité) : **0**

Numero de dose	Probit attendu	Poids	Probit de travail
1	3.23192	16.97240	3.23192
2	3.46761	23.28150	3.46761
3	3.70329	30.33193	3.70329
4	3.84116	34.60592	3.84116
5	4.15273	43.92992	4.15273
6	4.46754	51.64764	4.46754
7	4.78064	56.30145	4.78064
8	5.09381	57.11283	5.09381
9	5.40704	53.93392	5.40704
10	5.64273	49.23036	5.64273
11	6.05212	37.89584	6.05212

Régression pondérée :

** Convergence dans l'estimation du coefficient B de la régression ponderée atteinte après 2 itérations (Ecart relatif sur B < 0.005)

- Paramétres statistiques :

Sommes :

Poids	SWNX	SWNX2	SWNY	SWNY2	SWNXY
455.24371	733.44810	1658.64086	2152.75059	10477.35665	3841.95312

Paramètres de la régression :

X moyen	Y moyen	SX2	SXY	SY2	Pente	Ecart type(B)
1.61111	4.72879	476.97463	373.63318	297.45731	0.78334	0.04579

- Equation de la droite de régression pondérée :

Y = 3.46674+(0.78334*X)

- Test de non linéarité de l'ajustement :

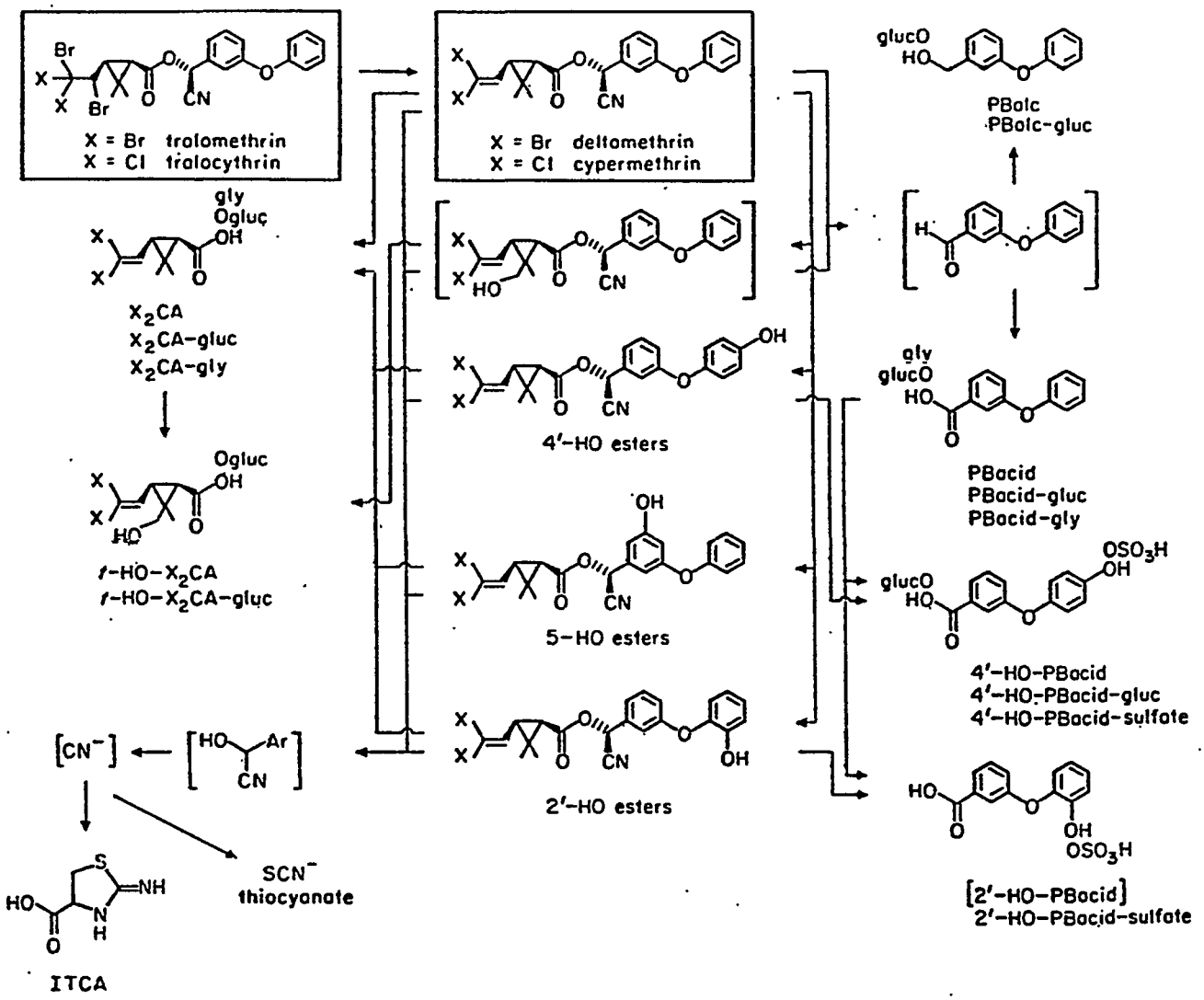
* Chi2 calculé: **4.776*** Degrés de liberté: **9*** Probabilité du Chi2: **97.557%**
** Test de Chi2 non significatif à 5% : ajustement linéaire légitime

- Doses létales et limites de confiance pour une probabilité fixée de 5 % :

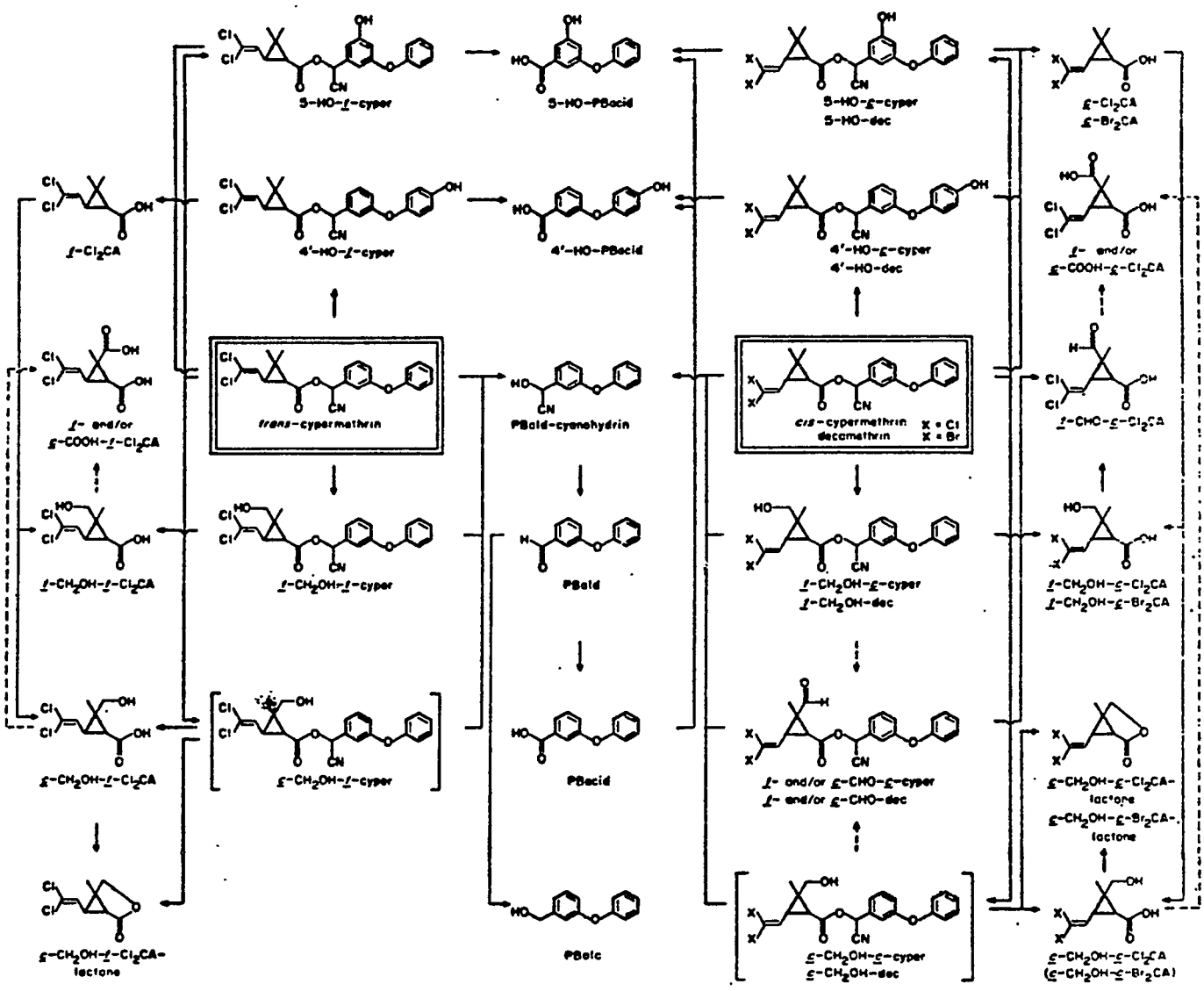
	Log10.DL	Ecart-type/log.DL	Doses	Limite inférieure	Limite supérieure
DL90	3.59341	0.13041	3921.10965	2176.77655	7063.24262
DL50	1.95734	0.06316	90.64362	68.16183	120.54057
DL20	0.88296	0.07343	7.63771	5.48339	10.63841

ANNEXE 2 : Métabolisation des pyréthrinoïdes chez divers organismes

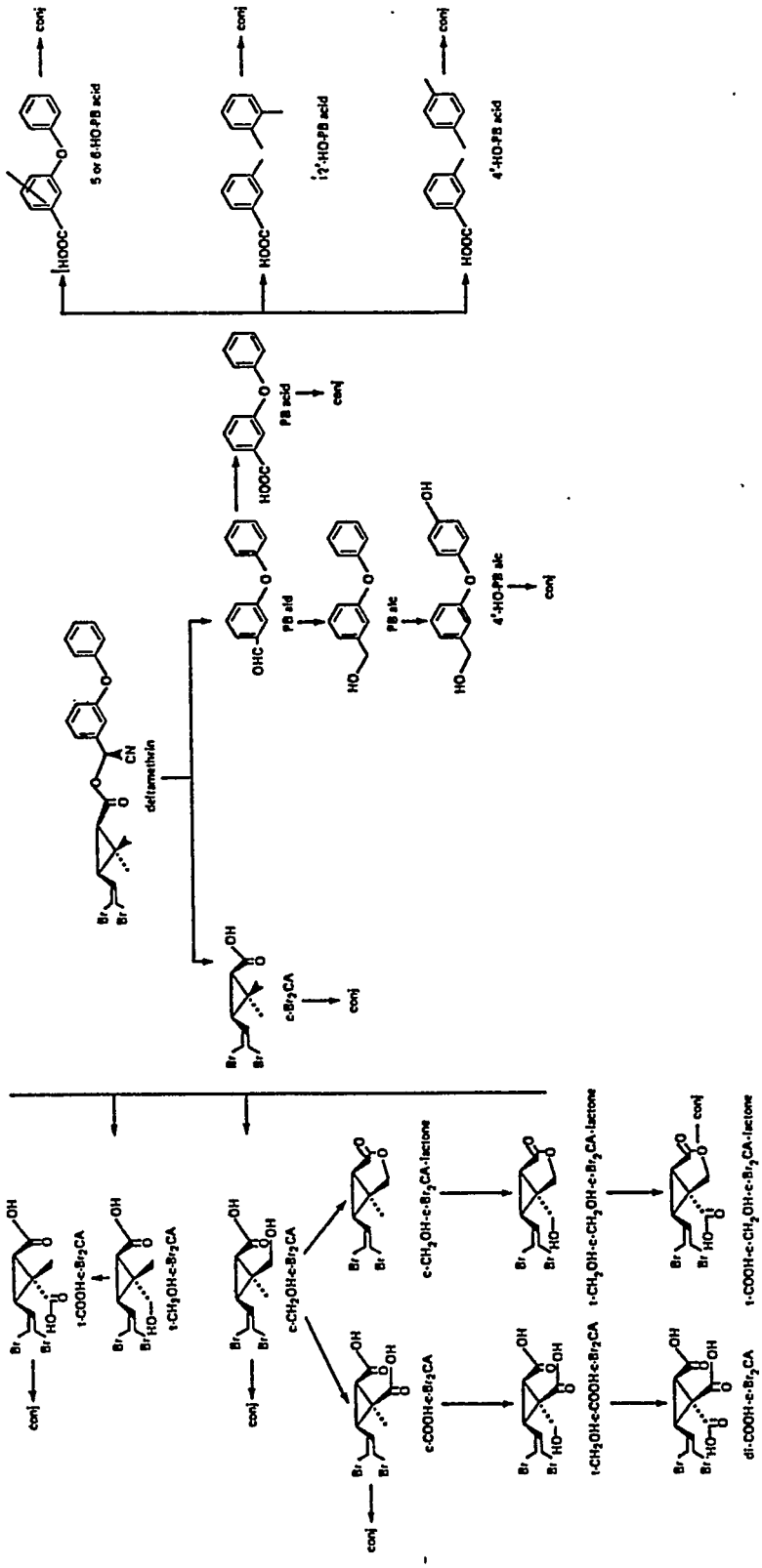
ANNEXE 2.[1] Métabolisme de la deltaméthrine et de la cyperméthrine chez le rat [COLE et *al.*, 1982]



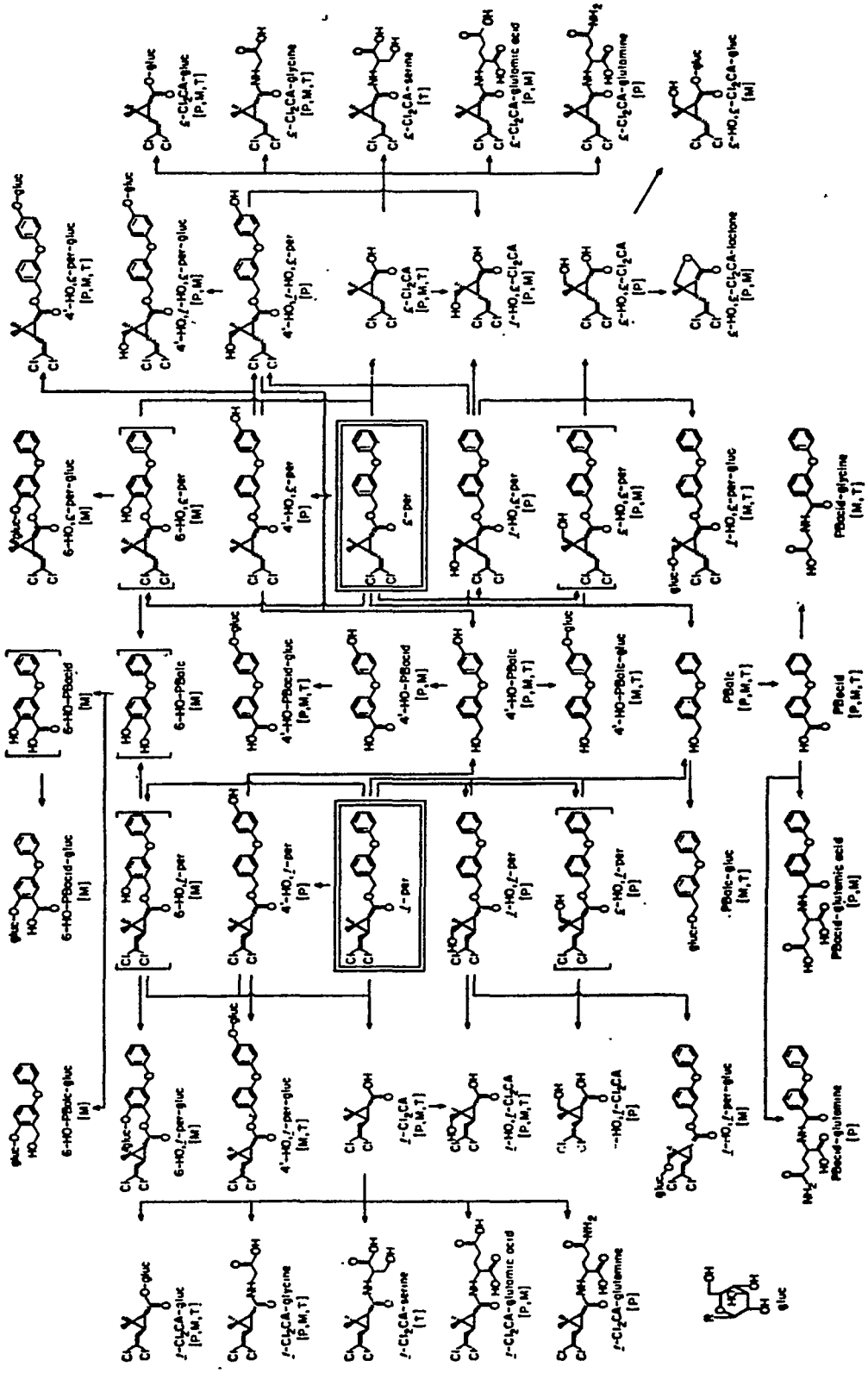
ANNEXE 2.(2). : Métabolisme de la deltaméthrine et de la cyperméthrine chez la souris (SHONO et *al.*, 1979)



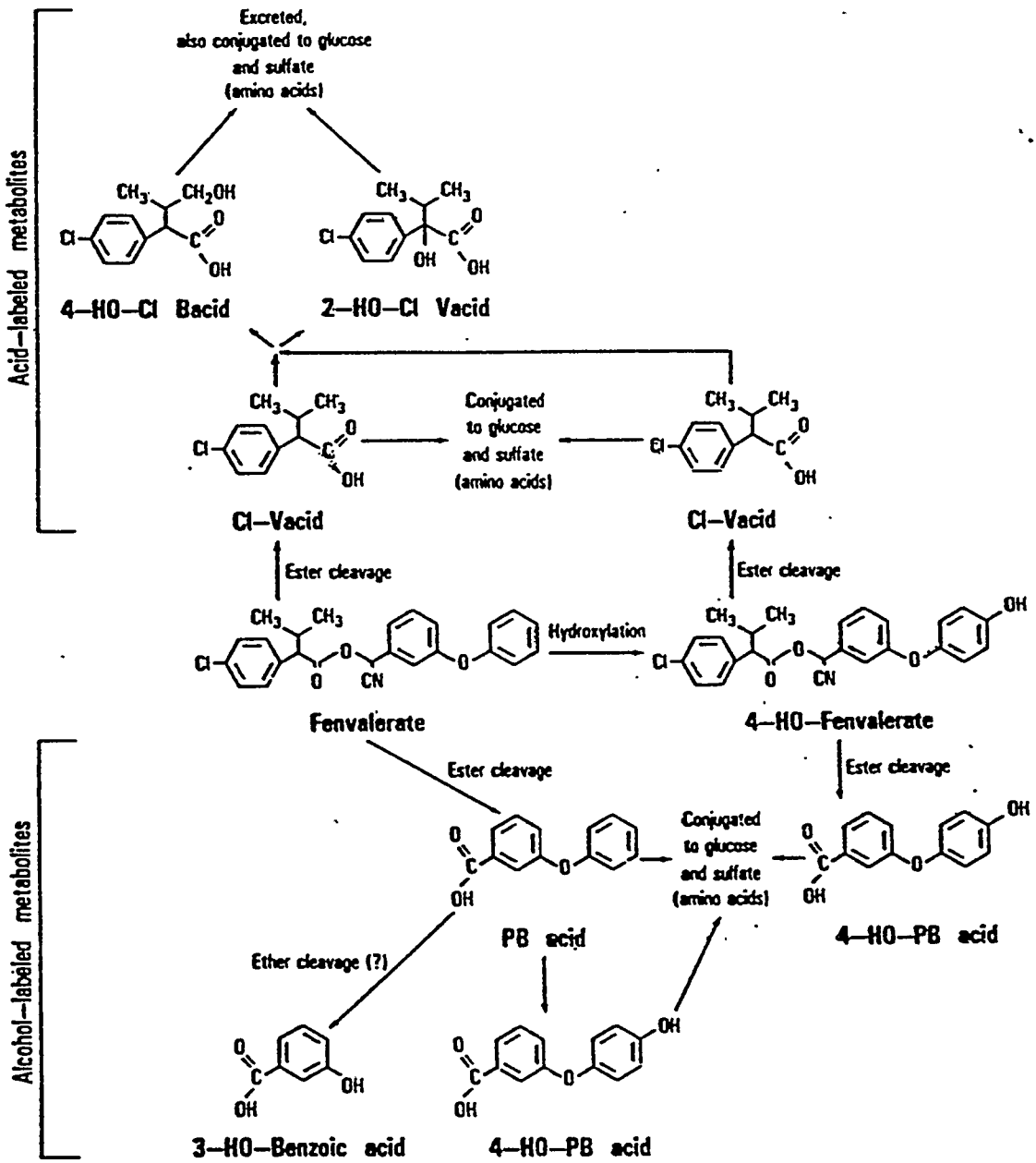
ANNEXE 2.(3). : Métabolisme de la deltaméthrine chez l'oiseau (AKHTAR et *al.*, 1985)



ANNEXE 2.(4). : Métabolisme des pyréthrinoïdes chez plusieurs insectes (SHONO et *al.*, 1979)

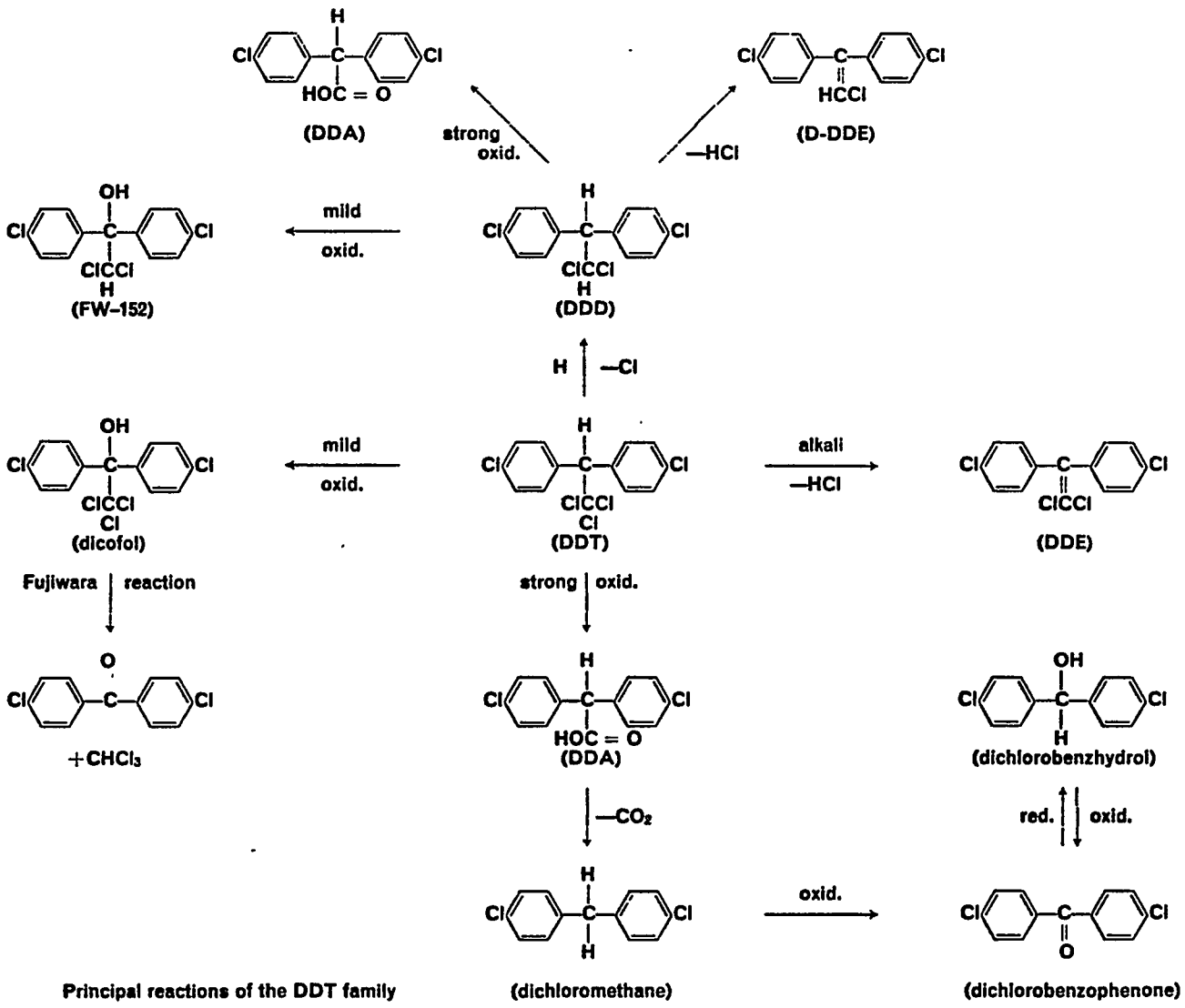


ANNEXE 2.(5). : Métabolisme du fenvalérate chez la mouche domestique (GOLENDA et FORGASH, 1989)



ANNEXE 3 : Métabolisation du DDT

ANNEXE 3.(1). : Métabolisation du DDT (HODGINS non référencié)



ANNEXE 3.(2). : Métabolisation du DDT (BROOKS, 1976)

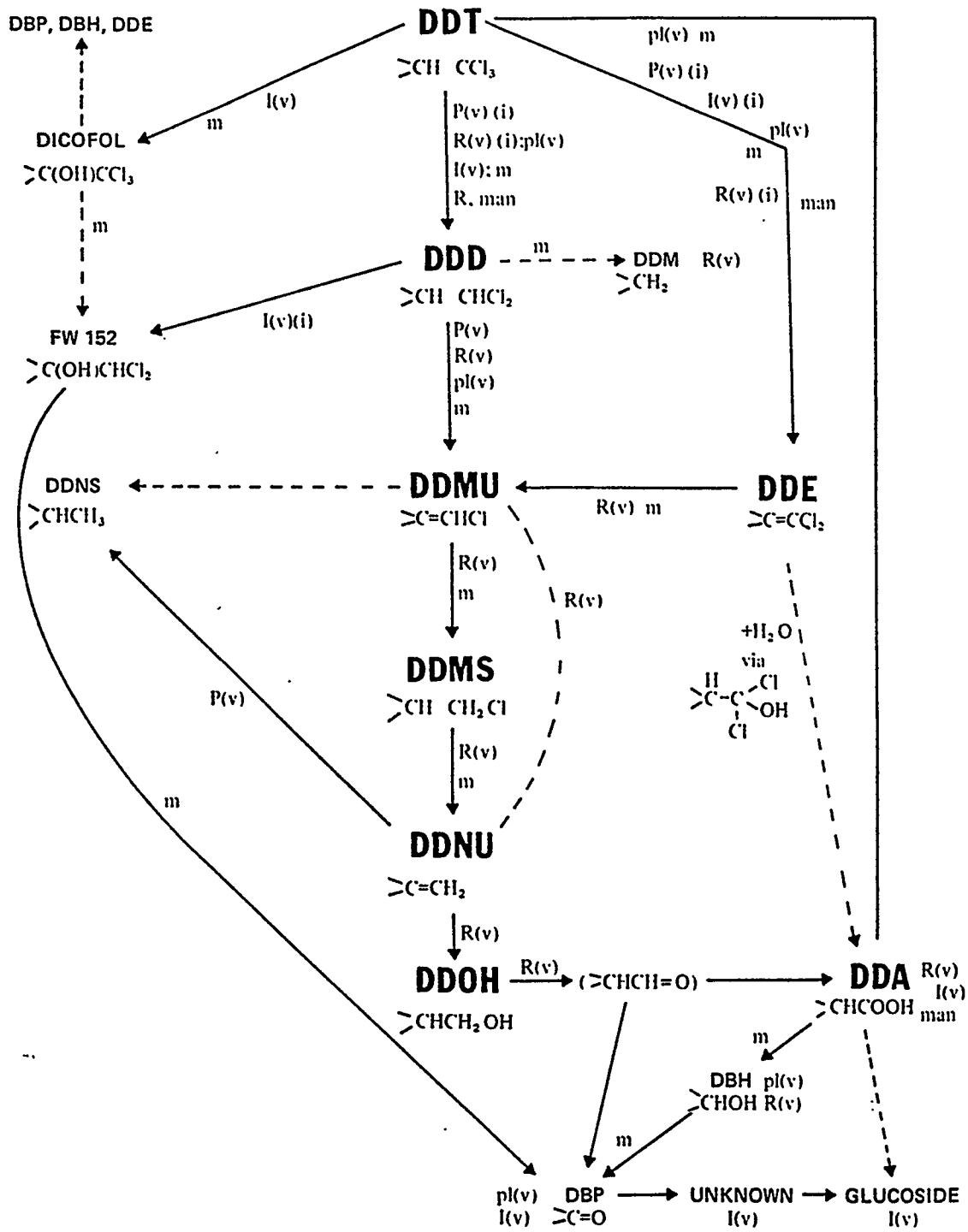


FIGURE 8. Pathways and products of DDT metabolism in some living organisms. I = insects; m = microorganisms; P = pigeon; pl = plants; R = rat; i = in vitro; v = in vivo

ANNEXE 4. : Métabolisation de la testostérone

ANNEXE 4 : Identification des métabolites de la testostérone chez le rat [WATERMAN et JOHNSON, 1991]

SILICA GEL MOBILITIES OF MONOHYDROXYTESTOSTERONES

Compound	Source[a]	Mobility (relative to testosterone)[b]		
		Solvent AB	Solvent BB	Solvent AA
15α-OH-T	1	0.29	0.43	0.09
11α-OH-T	2	0.31	0.45	0.09
16α-OH-T	1, 2	0.38	0.56	0.12
15β-OH-T	4	0.43	0.59	0.22
14α-OH-T	1	0.44	0.61	0.20
7α-OH-T	1, 2	0.46	0.65	0.16
RLM2 metabolite[c]	5	0.48	0.67	0.16
1α-OH-T	*d*	0.48	0.65	0.17
11β-OH-T	2	0.50	0.67	0.25
19-OH-T	2	0.52	0.69	0.26
7β-OH-T	4	0.54	0.71	0.32
1β-OH-T	*d*	0.54	0.73	0.26
6α-OH-T	1	0.61	0.79	0.35
6β-OH-T	1, 2	0.65	0.82	0.41
18-OH-T	1	0.71	0.91	0.43
16β-OH-T	1, 2	0.71	0.84	0.49
2β-OH-T	1	0.74	0.86	0.51
2α-OH-T	1	0.78	0.89	0.57
6-Dehydro-T	2	0.95	1.00	0.96
Testosterone	2, 3	=1.0	=1.0	=1.0
Androstenedione	2, 3	1.18	1.15	1.26
Progesterone	2, 3	1.22	1.17	1.35
		Testosterone migration (cm)[e]		
		10.5–11.9	10.8–12.0	8.5–9.4

[a] See "Materials and Methods" section for listing of sources of authentic steroid standards. OH-T, Hydroxytestosterone. The following five monohydroxytestosterone standards were unavailable for characterization: 4-OH-T, 8-OH-T, 9-OH-T, 12αOH-T, and 12βOH-T.

[b] Results generally based on at least three or four independent determinations. Mobility differences of at least 0.02 were highly reproducible. See Table I for solvent compositions.

[c] Major unidentified testosterone metabolite formed by P450 RLM2 (IIA2) [D. J. Waxman, D. P. Lapenson, K. Nagata, and H. D. Conlon, *Biochem. J.* 265, 187 (1990)] and previously thought to be 7β-OH-T [I. Jansson, J. Mole, and J. B. Schenkman, *J. Biol. Chem.* 260, 7084 (1985)].

[d] Gift of Dr. A. Parkinson, Kansas University Medical Center, Kansas City, KS.

[e] Range of testosterone migration distances in a series of independent analyses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBASSY, M.A., ASHRY, M., ZEIN, A.A., EL-NAWAWY A.S., & HAMED A., 1982. - Insecticide resistance and penetration in and lipid content of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Med. Fac Landbouw. Rijksuniv. Gent,* 47 (2), p. 687-694.

ABBOTT, W. S., 1925 - A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Ento.*, 18, p. 265-267.

ABO-EL-GHAR, M.R., NASSAR, M.E., RISKALLA, M.R., & ABD-EL-GHAFAR, S.F., 1983. - Rate of development of resistance and pattern of cross-resistance in fenvalerate and decamethrin resistant strains of *S. littoralis. Agricultural Research Review.* 61 (1), p. 141-147.

ABOU EL GHAR., 1963. - Efficacité de quelques insecticides contre le ver du cotonnier. (*Prodenia litura* F.). Département de la Protection des Plantes de la Faculté d'Agriculture à l'Université d'Ain Shams au Caire. PFLANZENSCHUTZ-NACHRICHTEN " *Bayer* " 2/1964, p. 45-54.

AHMED, M.T., AHMED, Y.M., & MOUSTAFA, A.S., 1987. - Some studies on the development of resistance to diflubenzuron in the egyptian cotton leafworm. *Med. Fax. Landbouww. Rijksuniv. Gent,* 52 (2a), p. 447-483.

AHN, Y.-J., SHONO, T., & FUKAMI, J. 1986 - Inheritance of pyrethroid resistance in a housefly strain from Denmark. *J. Pestic. Sci.*,11, p. 591-596.

AKHTAR, M.H., HAMILTON, R.M.G., & TRENHOLM, H.L., 1985. - Metabolism, Distribution, and Excretion of Deltamethrin by Leghorn Hens. *J. Agric. Food Chem.* 33, p. 610-617.

ALCOCK, K.T., LE RUMEUR, C., SCHWEHR, R.D., 1991. - Insecticide management in cotton. *International Congres on IRM, Rio.*

AMICHOT, M., CASTELLA, C., CUANY, A., BERGE, J-B., & PAURON, D., 1992 - Target modification as a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster. Pestic. Biochem. Physiol.* 44, p. 183-190.

AMICHOT, M., CASTELLA, C., BERGE, J-B., & PAURON, D., 1993 - Transcription analysis of the 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 (3), p. 381-390.

ARNOLD, A.J., 1965. - A high speed automatic micrometer syringe. *J. Sci. Instrum.*, 42, p. 350-351.

AYAD, F.A., KEDDIS, M.E., EL-DEEB, W.M., GHONEIM, Y.F., & EL-GUINDY, M.A., 1989. - Monitoring of resistance to insecticides in field strains of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) during 1987 and 1988 cotton growing seasons. Proc. 1st. Conf. Econ. Vol II p. 469-476.

BAEZA-SQUIBAN, A., BEST-BELPOMME, M., & MARANO, F., 1989. - Cytotoxicity, Accumulation, and Metabolism of deltamethrin, a Pyrethroid Insecticide, in *Drosophila melanogaster* Cells. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 33, p. 201-212.

BALACHOWSKY, A.S., 1972. - Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome II, Lépidoptères. Vol. 2, *Zygaenoidea, Pyraloidea, Noctuoidea.* Masson, Paris. 1634 p.

BERGE, J.B., 1987. - Insectes contre insecticides : La résistance s'organise. *Biofutur*, p. 45-50.

BERNARD, L., LAGADIC, L., & ECHAUBARD, M., 1991. - Effets de la cyfluthrine sur la croissance et la consommation alimentaire au cours du 4ème stade larvaire de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (*Lepidoptera, Noctuidae*). Med. Fac. Landbooww., Rijksuniv. Gent, 56, p. 1089-1098.

BLOOMQUIST, J.R., & MILLER, T.A., 1986. - Sodium channel neurotoxins as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotox.*, 7, p. 217-224.

BRADFORD, M.M., 1976. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

BROOKS, G.T., 1976. - Chlorinated Insecticides. Vol II. Biological and Envirenmental Aspects. p. 197.

BUSVINE, J. R., 1951. - Mechanism of resistance to insecticide in house flies. *Nature*, 168, p. 193-195.

BUSVINE, J.R., 1957. - A critical review of techniques for testing insecticides. *Commonwealth Bureau*, London.

BUSVINE, J.R., 1958. - Insecticide resistance in bed-bugs. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 19, p. 1042-1052.

CARLE, P.R., 1982. - Destruction des insectes domestiques dans " Monographie Deltaméthrine " *Ed. Roussel-Uclaf*, p. 233-257.

CARLE, P.R., 1985. - Mode d'action et utilisation des pyréthrinoïdes. *Colloque National "Insectes, Insecticides, Santé". Angers 19-22 Novembre, p. 225-245.*

CARTER, S.W., 1989. - A review of the Use of Synthetic Pyrethroïds in Public Health and Vector Pest Control. *Pestic. Sci.*, 27, p. 361-374.

CASIDA, J.E., 1970. - Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *J. Agric. Food Chem.* 18, p. 753-772.

CAUQUIL, J., 1986. - Maladies et ravageurs du cotonnier en Afrique francophone au sud du Sahara. *Supplément à la revue "Coton et Fibres Tropicales"*. IRCT-CIRAD, 92 p.

CHENG, K., & SCHENKMAN, J.B., 1983. - Testosterone Metabolism by Cytochrome P-450 Isozymes RLM_3 and RLM_5 and by Microsomes. *J. Biol. Chem.*, 258 (19), 10 p. 11738-11744.

CLARK, J.M., & MATSUMURA, F., 1982. - Two types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve calcium A.T.P.ase and calcium + magnesium activity in the squid *Logilo paelei. Pestic. Biochem. Physiol., 18*, 2, p. 180-190.

CLARK, A.G., & SHAMAAN, N.A., 1984 - Evidence that DDT - dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22, p. 249-261.

CLARK, A.G., SHAMAAN, N.A., DAUTERMAN, W.C., & HAYAOKA, T., 1984 - Characterization of multiple glutathione transferases from the house fly, *Musca domestica* (L). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22, p. 51-59.

CLARK, A.G., 1990. - The glutathion S-transferases and resistance to insecticides. *In Glutathion S-transferases and Drug Resistance.* (Edited by Hayes, J., Pickett, C.B., & MANDLE, T.J.). p. 369-378. Taylor & Francis, London.

CLARKE, S.E., WALKER, C.H., & McCAFFERY, A.R., 1990. - A comparison of the in vitro metabolism of cis-cypermethrin in a resistant and susceptible strain of *Heliothis virescens.* Brighton Crop Protection Conference (Pests and Diseases - 1990), p. 1201-1206.

COLAS, R., 1982. - Destruction des insectes de denrées et produits entreposés. Dans " Monographie Deltaméthrine " *Ed. Roussel-Uclaf*, p. 219-231.

COLE, L.M., et CLARKE, P.H., 1961. - Development of resistance to synergised pyrethrins in body lice and cross-resistance to D.D.T. *J. Econ. Entomol.*, 54, p. 649-659.

COLE, L.M., UZZO, L.O., WOOD, E.J., & CASIDA, J.E., 1982. - Pyrethroid Metabolism : Comparative Fate in Rats of Tralomethrin, Tralocythrin, Deltamethrin, and (1*R*,*α*S)-cis-Cypermethrin*J. Agric. Food Chem.*, 30, p. 631-636.

COUILLOUD, R., & GIRET, M., 1978. - Améliorations possibles dans la conduite de l'élevage d'*H. armigera. Note n° 7 - LENI/CIRAD Montpellier*, p. 19.

COUILLOUD, R., & GIRET, M., 1980. - Multiplication d'*H. armigera* Hbn. (Lep. noctuidae) : améliorations possibles grâce à l'adoption d'une technique d'élevage en groupe de chenilles. *Cot. Fib. Trop.*, 35 (2), p. 217-224.

CROW, J.F., 1957. - Genetics of insect resistance to chemicals. *Ann. Rev. Entomol.*, 2, p 227-246.

CUANY, A., BERGE, J.B., 1990. - Les Monooxydases a Cytochrome P-450 et la résistance aux Insecticides. ANPP - Deuxième Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture (Versailles 4,5,6 décembre 1990). p. 89-96.

CUANY, A., PRALAVORIO, M., PAUDRON, D., BERGÉ, J-B., FOURNIER, D., LAIS, C., LAFONT, R., SALAÜN, J-P., WEISSBART, D., LARROQUE, C., & LANGE, R., 1990. - Characterization of Microsomal Oxidative Activities in a Wild-Type and in a DDT Resistant Strain of *Drosophila melanogaster. Pestic. Biochem. Physiol.*, 37, p. 293-302.

DELORME, R., 1985. - Les phénomènes de résistance : mécanismes biochimiques et physiologiques. *Colloque National " Mode d'action et utilisation des insecticides. Angers 19-22 Novembre*, p. 257-273.

DELORME, R., FOURNIER, D., CHAFFAUX, J., CUANY, A., BRIDE, J. M., AUGE, D., & BERGE, J.B., 1988. - Esterase metabolism and reduced penetration are causes of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* HUB (Noctuidae : Lepidoptera). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 32, p. 240-246.

DELORME, R., & MAUCHAMP, B., 1987 - Mode d'action des insecticides. *La défenses des Végétaux.* 247, p. 25-32.

DEMOUTE, J.P., - 1989. - A Brief Review of the Environmental Fate and Metabolism of Pyrethroids. *Pestic. Sci.,* 27, p. 375-385.

DEVONSHIRE, A., & MOORES, G., D., 1982. - A carboxylesterases with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae). Pestic. Biochem. Physiol.,* 18, p. 235-246.

DYBALL, R.E.J., 1982. - Inhibition by decamethrin and resmethrin of hormone release from the isolated rat neurohypophysis. A model mammalian neurosecretory system. *Pestic. Biochem. Physiol., 17,* p. 42-47.

EL-GUINDY, M.A., MADI, S.M., KEDDIS, M.E., ISSA, Y.H., & ABDEL-SATTAR M.M., 1982. - Development of resistance to pyrethroïds in field populations of the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Int. Pest Contr.,* p. 6-11.

EL-GUINDY M.A., EL-REFAI A.-R.A. & SALEH W.S., 1982. - The role of esterases in the defence mechanism against intoxication by fenitrothion in susceptible and field tolerant strains of *Spodoptera littoralis* Boisd. *Int. Pest Contr.,* 22, p. 100-108.

EL-NASSAR, M.E., & ABO-EL-GHAR, M.R., RISKALLA, R.R., ABD-EL-GHAR, S.F., 1983. - Synergistic effects of some synesgists on the toxicity of fenvalerate and decamethrin against larvae of susceptible and resistant strains of *S. littoralis. Agric. Res. Rev.,* 61, (1), p. 133-139.

EL-SAYED, M.M., ABDEL-RAZIK, M., YOUSSEF, A.M., & SALEM, H., 1982. - Penetration, excretion and metabolism of monocrotophos insecticide in the susceptible and the tolerant larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Agric. Res. Rev.,* 60, p. 55-71.

ELLIOTT, M., FARHAM, A.W., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H., & PEARSON, B.C., 1967. - Benzyl-3-furylmethyl Chrysanthemate : a New Potent Insecticide. *Nature (London),* 213, p. 493-494.

ELLIOTT, M., FARHAM, A.W., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H., PULMAN, D.A., & STEVENSON, J.H., 1973. - A Photostable Pyrethroïd. *Nature (London)*, 246, p. 169-170.

ELLIOTT, M., 1977. - Synthetic pyrethroïds. *In* : Elliott M. (Ed.), ACS Symposium Series, 42, 1-28. *American Chemical Society, Washington D.C.*

ELLIOTT, M., 1989. - The pyrethroïds. Early discovery, recent advances and the future. *Pestic. Sci.*, 27, p. 337-351.

EMAM, A. K., & DEGHEELE D., 1988. - Toxicity of three benzoylphenyl ureas against a susceptible and monocrotophos-resistant strain of *Spodoptera littoralis* (BOISD.). *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv.* Gent 53/2b, p. 745-749.

FOURNIER, D., BRIDE, J.M., POIRIE, M., BERGE, J-B., & PLAPP, F.W., 1992. - Insect Glutathione Transferases. *J. Biol. Chem.*, 267, (3) p.1840-1845.

FEYEREISEN, R., KOENER, J.F., FARNSWORTH, D.E., & NEBERT, D.W. 1989. - Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica. Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 86, p. 1465-1469.

FFRENCH-CONSTANT, R.H., ROCHELEAU, T.A., STEICHEN, J.C., & CHALMERS, A.E., 1993. - A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, 363, p. 449-451.

FINNEY, D. J., 1971. - Probit analysis - III edition. *Cambridge University Press.* p. 333.

FORGASH, A.J., 1984. - History, evolution, and consequences of insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22, p. 178-186.

FORGASH, A.J., COOK, B.J., & RILEY, R.C., 1962. - Mechanisms of resistance in diazinon-selected multi-resistant *Musca domestica. J. Econ. Entomol.*, 55, p. 544-551.

FORRESTER, N.W., 1990. - Designing, Implementing and Servicing an Insecticide Resistance Management Strategy. *Pestic. Sci.*, 28, p. 167-179.

FORRESTER, N.W., & CAHILL, M., 1986. - Insecticide management strategy for control of resistance of *Heliothis armigera* (Hbn.) in Australia IVème congrés sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical, Marseille, p. 248-252.

FORSHAW, P.J., LISTER, T., & RAY, D.E., 1993. - Inhibition of a neuronal voltage-dependent chloride channel by the type II pyrethroid, deltamethrin. *Neuropharmacology*, 32, p.105.

FRÖHLICH, G., & RODEWALD, W., 1970. - Pests and diseases of tropical crops and their control. *Pergamon Press*, Oxford. p. 371.

GAMMON, D.W., 1980. - Pyrethroid resistance in a strain of *Spodoptera littoralis* is correlated with decreased sensitivity of the CNS *in vitro*. *Pestic. Biochem. Physiol.*,13, p. 52-56.

GAMMON, D.W., BROWN, M.A., & CASIDA, J.E., 1981. - Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol., 18,* p. 181-191.

GAMMON, D.W., 1989. - The pyrethroid insecticides. A Scientific Advance for Human Welfare. *In* : Elsevier Applied Science Publishers. *Society of Chemical Industry, 27,*

GEORGHIOU, G.P., 1985. - Quoted in Agrochemical Age. March 1985 p. 10-24.

GEORGHIOU, G.P., 1990. - Overwiew of insecticide resistance. In Managing resistance to agrochemicals : from fondamental research to practical strategy, series 421, p. 18-41.

GLOMOT, R., 1982. - Toxicité de la deltaméthrine sur les vertébrés supérieurs. Dans Monographie de la deltaméthrine. Roussel Uclaf, p. 109-136.

GOLENDA, C.F., & FORGASH, A.J., 1989. - The Distribution and Metabolism of Fenvalerate in Pyrethroid-Resistant and Susceptible House Flies. *Pest. Biochem. Physiol.*, 33, p. 37-48.

HABIG, W.H., & JAKOBY, W.B., 1981. - Assays for differentiation of glutathione S-transferases. In Jakoby, W.B. (Ed.), Methods in Enzymology. Vol. 77, Detoxication and drug metabolism, Conjugation and related systems. Academic Press, New York. p. 398-405.

HAYNES, K.F., 1988. - Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Ann. Rev. Entomol.*, 33, p. 149-168.

HILL, D.S., & WALKER, J.M., 1988. Pests and Diseases of Tropical Crops. Vol 2. Field Handbook, p. 160-162.

HIRANO, M., 1989. - Characteristics of Pyrethroïds for Insect Pest Control in Agriculture. *Pestic. Sci.*, 27, p. 353-360.

HODGSON, E., 1983. - The significance of cytochrome P-450 in insects. *Insect Biochem.*, 13 (3), p. 237-246.

HODGSON, E., & PLAPP, F.W.jr., 1970 - Biochemical Characteristics of Insect Microsomes. *J. Agr. Food Chem.*, 18 (6), p. 1048-1055.

HOLDEN, J.S., 1979. - Absorption and Metabolism of Permethrin and Cypermethrin in the Cockroach and the Cotton-leafworm Larvae. *Pestic. Sci.*, 10, p. 295-307.

HUE, B., 1985. - La synapse centrale chez la blatte. Electrophysiologie-Pharmacologie. Applications à l'étude du mode d'action d'insecticides. *Colloque National "Insectes, Insecticides, Santé". Angers 19-22 Novembre, p. 175-178.*

ISHAAYA, I., SIMON ASCHER K.R., & CASIDA J.E., 1983 - Pyrethroïd synergism by esterase inhibition in *Spodoptera littoralis* (Boisduval) larvae. *Crop Protection*, 2 (3), p. 335-343.

ISSA, Y.H., KEDDIS, M.E., ABDEL-SATTAR, M.A., AYAD, F.A., & EL-GUINDY, M.A., 1985. - Survey of resistance to pyrethroids in field strains of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) during 1980-1984 cotton growing seasons. *Bull. Ent. Soc.*, Egypt, Econ. Ser., 14 p. 405-411.

JACQUEMARD, P., 1988 - Evolution de l'efficacité de trois insecticides sur une souche de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) originaire de Madagascar comparée à une souche originaire d'Afrique élevée à Montpellier. Rapport interne IRCT/CIRAD Montpellier, 7p.

JACQUES, Y., ROMEY, G., CAVEY, M.T., KARTALOUSKY, B., & LAZDUNSKI, M., 1980. - Interaction of pyrethroids with the Na^+ channel in mammalian neuronal cells culture. *Biochem. Biophys., Acta 600*, p. 882-897.

JANSSON, I., MOLE, J., & SCHENKMAN, J.B., 1985. - Purification and Characterization of a New form (RLM2) of Liver Microsomal Cytochrome P-450 from Untreated Rat. *J. Biol. Chem.*, 260 (11), p. 7084-7093.

KEDDIS, M.E., AYAD, F.A., ABDEL-FATTAH, M.S., & EL-GUINDY, M., 1986. - Studies of resistance to urea derivatives and their mixtures with insecticides in field strains of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) during the cotton seasons 1983, 1984 and 1985. *Bull. ent. Soc. Egypt.*, Econ. Ser. 15, p. 229-234.

KEDDIS, M.E., OMAR, M.E., & EL-GUINDY, M.A., 1988. - Monitoring Insecticides resistance in field strains of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, Boisd., during 1986 cotton season. *Agric. Res. Rev.*, 66 (1), p. 25-31.

KENNAUGH, L., PEARCE, D., DALY, J.C., & HOBBS, A.A., 1993 - A piperonyl butoxyde synergizable resistance to permethrin in *Helicoverpa armigera* which is not due to increased detoxification by cytochrome P450. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 45, p. 234-241.

KOENER, J.F., CARINO, F.A., & FEYEREISEN, R., 1993. - The cDNA and deduced protein sequence of house fly NADPH-cytochrome P450 reductase. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, 23 (4) p. 439-447.

LAGADIC, L., & CRESTEIL, T., 1993. - Enhanced *in vitro* Metabolism of Testosterone by Microsomes from Insecticide-Resistant *Spodoptera littoralis* Larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 23 (4) p. 475-480.

LAGADIC, L., CUANY, A., BERGÉ, J-B., & ECHAUBARD, M., 1992. - Purification and Partial Characterization of Glutathione S-Transferases from Insecticide-resistant and Lindane-induced Susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd.) Larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 23 (4), p. 467-474.

LAGADIC, L., LEICHT, W., FORD, M.G., SALT, D.W., & GREENWOOD, R., 1993. - Pharmacokinetics of cyfluthrin in *Spodoptera littoralis* (Boisd.). I. In vivo Distribution and Elimination of [^{14}C]Cyfluthrin in Susceptible and Pyrethroid-Resistant Larvae. *Pestic. Biochem and Physiol.*, 45, 105-115.

LANGE, R., DUCLOUX, N., PERIN, F., LARROQUE, C., VAN LIER, J.E., & ZAJDELA, F., 1989. - Particular cytochrome P-450-dependent steroid metabolism : a new class of mouse liver tumor markers. *Carcinogenesis* 10 (10), p. 1871-1877.

LANGEN, H., EPPRECHT, T., LINDEN, M., HEHLGANS, T., GUTTE, B., & BUSER, H-R., 1989. - Rapid partial degradation of DDT by a cytochrome *P*-450 model system. *Eur. J. Biochem.*, 182 p. 727-735.

LAUFER, J., ROCHE, M., PELHATE, M., ELLIOTT, M., JANES, N.F., & SATELLE, D.B., 1984. - Pyrethroid insecticides : actions of deltamethrin and related compounds on insect axonal sodium channels. *J. Insect. Physiol., 30,* 5, p. 341-349.

LAUFER, J., PELHATE, M., & SATELLE, D.B., 1985. - Actions of Pyrethroid insecticides on Insect axonal sodium channels. *Pestic. Sci.*, 16, p. 651-661.

LEE, S.S.T., & SCOTT, J.G., 1989. - Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenases in the House Fly (*Musca domestica* L.) : Biochemical Changes Associated with Pyrethroid Resistance and Phenobarbital Induction. *Pest. Biochem. Physiol.*, 35, p. 1-10.

LITTLE, E.J., McCAFFERY, A.R., WALKER, C.H., & PARKER, T., 1989. - Evidence for an Enhanced Metaolism of Cypermethrin by a Monooxygenase in a Pyrethroid-Resistant Strain of the Tobacco Budworm (*Heliothis virescens* F.). *Pest. Biochem. Physiol.*, 34, p. 58-68.

LIU, M.Y., & PLAPP, F.W., 1991. - Apparent reduction in the number of nerve membrane sodium channels in the house fly in relation to metabolic resistance to insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41, p.1-7.

MATSUMURA, F., 1982. - Influence of chlorinated and pyrethroid insecticides on cellular calcium regulatory mechanisms. 5th Int. Congr. Pest. Chem. *in* Pestic. Chem. Human Welfare Environ. Pergamon, Oxford U.K.

MATSUMURA, F., 1985. - Toxicology of insecticides. 2nd edition. Plenum Press, New York. 598 p.

MIANZE, T., 1985. - Toxicité de différentes matières actives insecticides vis-à-vis de deux ravageurs du cotonnier *H. armigera* (Hbn.) et *S. littoralis* (Boisd.) : Etude des DL50. Mémoire de DEA. CIRAD/CA.

MILANI, R., & TRAVAGLINO, A., 1957. - Richerche genetiche sulla resistenza al D.D.T. in *Musca domestica* concatenazione del gene kdr (knock down resistance) con due mutanti morfologigi. *Riv. Parasitol.*, 18, p. 199.

MILLER, T.A., KENNEDY, J.M., & COLLINS, C., 1979 - CNS insensitivity to pyrethroids in the resistant *kdr* strain of house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 12, p. 224-230.

NARAHASHI, T., 1962. - Effects of the insecticide allethrin on membrane potentials of coackcroach giant axons. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, p. 61-65.

NARAHASHI, T., 1971. - Effects of insecticides on excitable tissues. *Adv. Insect Physiol.*, *10*, p. 1-93.

NARAHASHI, T., 1986. - Mechanisms of action of pyrethroids on sodium and calcium channel gating. *In* FORD, M.G., REAY, R.C., & USHERWOOD, P.N.R., (Eds.), Neuropharmacology and pesticide action. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England. p. 36-60.

NARAHASHI, T., 1992. - Nerve membrane Na+ channel as targets of insecticides. *Tips Reviews* 131, p. 236-241.

NICHOLSON, R.A. & MILLER, T.A., 1985 - Multifactorial resistance to transpermethrin in field-collected strains of the tabacco budworm *Heliothis virescens* F. *Pestic. Sci.*, 16, p. 561-570.

NOLAN, J., ROULSTON, W. J., & WHARTON, W. H., 1977 - Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT-resistant strain of *Boophilus microplus*. *Pestic. Sci.*, 8, p. 484-486.

NOMEIR, A.A., MAHRAN, A.A., MOUSTAFA, F.I, & KASSEM, S.M.I., 1987. - Mixed function oxidase and glutathione s-transferase activities and their relationship. To organophosphorus insecticide resistance in the egyptian cotton leafworm. *Alex. J. Agric. Res.*, 32, (1), p. 397-393.

NORMANN, T.C., 1979. - Release of neurohormones in the blowfly *Calliphora vicina* with respect to insecticidal action. Insect. Neurobiol. Pestic. Activ. / Proc. Soc. Chem. Ind. Symp. p.305-312.

OHNO N., 1973. - 2-Arylalkanoates, a new Group of Synthetic Pyrethroïd Esters not Containing Cyclopropanecarboxylates. *Pest. Sci.*, 7, p. 241-246.

OPPENOORTH, F.J., 1984. - Biochemistry of insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22, p. 187-193.

ORCHARD, I., 1980. - The effects of pyrethroids on the electrical activity of neurosecretory cells from the brain of *Rhodnius proxilus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13, p. 220-226.

OSBORNE, M. P., & HART, R. J., 1979 - Neurophysiological studies of the effects of permethrin upon pyrethroid resistant (*kdr*) and susceptible strains of dipteran larvae. *Pestic. Sci.*, 10, p. 407-413.

OSBORNE, M. P., & SMALLCOMBE, A., 1983 - Site of action of pyrethroid insecticides in neuronal membranes as revaled by the *kdr* resistance factor, *In* J. Miyamoto and P. C. Kearney (eds), *Pesticide chemistry : human welfare and environnement*, Pergamon, Oxford (3).

PAURON, D., BARHANIN, J., & LAZDUNSKI, M., 1985 - The voltage-dependant Na^+ channel of insect nervous system identified by receptor sites for tetrodotoxin and scorpion and sea anemone toxines. *Biochem. Biophys.*, 131, p. 1226-1233.

PAURON, D., BARHANIN, J., AMICHOT M., PRALAVORIO, M., BERGE, J-B., & LAZDUNSKI, M., 1989. - Pyrethroid receptor in the insect Na+ channel : Alteration of its properties in pyrethroid-resistance flies. *Biochem.*, 28, p. 1673-1677.

PAYNE, G.T., BLENK, R.G., BROWN, T.M., 1988 - Inheritance of permethrin resistancein the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 81, p. 65-73.

PEARSON, E.O., 1958. - The insects pests of cotton in Tropical Africa. Inst. Entomol., Eastern Press, London.

PELHATE, M., 1985. - L'axone géant de la blatte. Electrophysiologie-Pharmacologie. Applications à l'étude du mode d'action d'insceticides. *Colloque National "Insectes, Insecticides, Santé". Angers 19-22 Novembre, p. 185-189.*

PELHATE, M., LAUFER, J., & SATTELLE, D.B., 1985. - Actions of deltamethrin isomers and others synthetic pyrethroids on the axonal membrane of the coackroach. 190th American Chemic. Soc. Nat. Meeting, Chicago, I11.

PINCHARD, V., 1991. - Mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes chez *S. littoralis. Med. Fac. landbouww. Rijksuniv. Gent*, 56/3b, p. 1109-1117.

PLAPP, F.W.Jr., & HOYER, R.F., 1968 - Insecticide resistance in the house fly : decreased rate of absorption as the mechanism of action of a gene that acts as an intensifier of resistance. *J. Econ. Entomol.*, 61, p. 1298-1303.

POIRIÉ, M., & PASTEUR, N., 1991. - La résistance des Insectes aux insecticides. *La Recherche*, 234, juillet-août, 22, p. 875-882.

PRIESTER, T.M., & GEORGHIOU, G.P., 1979. - Inheritance of Resistance to Permethrin in *Culex pipiens quinquefasciatus. J. Econ. Entomol.*, 72, p. 124-127.

RAYMOND, G., 1993. - Compétitivité. Grandeur et misère de la zone franc. Courrier Afrique n°15. p.2-3.

RAYMOND, M., PASTEUR, N., & GEORGHIOU, P., 1987. - Inheritance of chlorpyrifos resistance in *Culex pipiens* L. (diptera : culicidae) and estimation of the number of genes involved. *Heredity*, 58, p. 351-356.

REIDY, G.F., ROSE, H.A., VISETSON, S., & MURRAY, M., 1990 - Increased glutathion S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pestic. Biochem. Physiol*, 36, p. 269-276.

RIBA, G., et SILVY, C., 1989. - Combattre les ravageurs des cultures. Enjeux et perspectives, INRA Paris, 230 p.

RISKALLAH, M.R., 1980. - Reduced sensitivity of cholinesterase as a factor of resistance in leptophos selected strain of the Egyptian cotton leafworm. *J. Environ. Sci. Health., B*, 15, p. 181-187.

RISKALLAH, M.R., 1983. - Esterases and Resistance to Synthetic Pyrethroids in the Egyptian Cotton Leafworm. *Pestic. Biochem.Physiol.*, 19, p. 184-189.

RISKALLAH, M.R., EL-DEBB, W.M., & EL-GUINDY, M.A., 1979. - Esterase activity in relation to insecticides resistance in the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Zeitschnift für angewandte Entomologie, 88*, (1), p. 70-76.

ROCHE, M., 1990. - Le mode d'action des pryréthrinoïdes. *Revue interne (Roussel Uclaf) non publiée.*

RONIS, M. J. J., HODGSON, E., & DAUTERMAN, W. C., 1988 - Characterization of Multiple Forms of Cytochrome *P*-450 from an Insecticide Resistant Strain of House Fly (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 32, p. 74-90.

ROUSH, R.T., & TABASHNIK, B.E., 1990. - Pesticides resistance in arthropods, Chapman and Hall, London, 303 p.

RUZO, L.O., COHEN, E., & CAPUA, S., 1988. - Comparative Metabolism of the Pyrethroids Bifenthrin and Deltamethrin in the Bulb Mite *Rhizoglyphus robini. J. Agric. Food Chem.*, 36, p. 1040-1043.

SALEH, W.S., ABDEENN, S.A.O., AHMED, N.M., & ABDEL-KAWY, A.M., 1986 - Esterase activity in relation to fenitrothion resistance in cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Bull. ent. Soc. Egypt. Ser.*, 15, p. 13-17.

SALGADO, V.L., IRVING, S.N., & MILLER, T.A., 1983 - Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroids in susceptible and *kdr*-resistant house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20, p. 100-114.

SATTELLE, D.B., 1990. - GABA receptors of incects. *Adv. Insect. Physiol.*, 22, p. 1-113.

SATTELLE, D.B., & YAMAMOTO D., 1988. - Molecular targets of pyrethroïd insecticides. *Adv. Insect Physiol.*, 20, p. 147-213.

SATTELLE, D.B., LEECH, C.A., LUMMIS, S.C.R., HARRISON, B.S., ROBINSON, H.P.C., MORRES, G.D., & DEVONSHIRE, A.C., 1988. - Ion channel properties of insects susceptible and resistant to insecticides. *In " Neurotox'88 : Molecular Basis of Drug and Pesticide Action "* (Ed. G.G. LUNT), Elsevier, London, p. 563-582.

SAWICKI, R.M., 1978 - Unusual response of DDT-resistant house flies to carbinol analogues of DDT. *Nature*, 275, p. 443-444.

SAWICKI, R.M., & FARNHAM, A.W., 1968. - Examination of the isolated autosomes of the SKA strain of houseflies (Musca domestica L.) for resistance to several insecticides with and without pretreatement with sesamex and T.B.T.P. *Bull. Entomol. Res.*, 59, p. 409-421.

SCHECHTER, M.S., GREEN, N., & LAFORGE, F.B., 1949. - Cinerolone and the Synthesis of related Cyclopentenolones. *Journ. of the Amer. Chem. Soc.*, 71, p. 3165-3173.

SCHOENE, B., FLEISHMANN, R.A., REMMER, H., & V. OLDERSHAUSEN, H.F., 1972. - Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 4, p. 65-73.

SCOTT, J.G., & GEORGHIOU, G.P., 1985. - Rapid Development of High-level Permethrin Resistance in a Field-collected Strain of the House Fly (Diptera : Muscidae) Under Laboratory Selection. *J. Econ. Entomol.*, 78, p. 316-319.

SCOTT, J.G., & GEORGHIOU, G.P., 1986. - Mechanisms responsible for high levels of permethrin resistance in the house fly. *Pestic. Sci.*, 17, 195-206.

SCOTT, J.G., & LEE, S.S.T., 1993$_a$. - Tissue distribution of microsomal cytochrome P450 monooxygenases and their inductibility by phenobarbital in the insecticide resistant LPR strain of house fly, *Musca domestica. Insect. Biochem. Molec. Biol.*, 23 (6), p. 729-738.

SCOTT, J.G., & LEE, S.S.T., 1993$_b$. - Purification and characterization of a cytochrome P450 from insecticide susceptible and resistant strains of house fly, *Musca domestica*, before and after phenobarbital exposure. Arch. Insect. Biochem. Physiol., 24 (1), p. 1-19.

SCOTT, J.G., & MATSUMURA, F., 1981. - Characteristics of a DDT-induced case of cross-resistance to permethrin in *Blattela germanica. Pestic. Biochem. Physiol.*, 16, p. 21-27.

SHONO, T., OHSAWA, K., & CASIDA, J.E., 1979. - Metabolism of trans- and cis-Permethrin, trans- and cis-Cypermethrin, and Decamethrin by Microsomal Enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (2), p. 316-325.

SODERLUND, D.M., 1979. - Pharmacological behavior of enantiomeric pyrethroid esters in the coackroach *Periplaneta americana* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 12, p. 38-48.

SODERLUND, D.M., 1980. - Pharmacokinetic modifications of intrinsic insecticide activity. Neurotox. 1979. *In* "Insect Neurobiology and Pesticide Action". p. 449-456.

SODERLUND, D.M., HESSNEY, C.W., & HELMUTH, D.W., 1983. - Pharmacokinetics of cis and trans substitued pyrethroids in the american cockcroach. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20, 161-168.

SODERLUND, D.M., & BLOOMQUIST J.R., 1989. - Neurotoxic actions of pyrethroids insecticide. *Ann. Rev. Entomol.*, 34, p. 77-96.

STAUDINGER, H., & RUZICKA, L., 1924. - Insektentötende Stoffe. 1 - Über Isolierung und Konstitution des Wirksamen Teiles des dalmatinischen insektenpulvers. *Helv. Chim. Acta*, 7, p. 177-201.

SUBIHA, A.D., ABDEL-MEGEED, M.I., EL-DEEB, W.M., MARIY, F.M., & HASSANEIN, A.A., 1984. - The rate of resistance development of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.), to synthetic pyrethroids, Caybolt and Fenvalerate. *Zeitschrift fur Angewandte Zoologie,* 71 (4), p. 351-397.

SUNDSETH, S.S., KENNEL, S.J. & WATERS, L.C., 1989 - Monoclonal Antibodies to Resistance-Related Forms of Cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster. Pestic. Biochem. Physiol.,* 33, p. 176-188.

TAYLOR, M.F., HECKEL, D.G., BROWN, T.M., KREITMAN, M.E., & BLACK, B., 1993. - Linkage of pyrethroid insecticide resistance to sodium channel locus in the tobacco budworm. *Insect. Biochem. Molec. Biol.,* 23 (7), p. 763-775.

TESSIER, J., 1982$_a$. - Vers la deltaméthrine. Dans Monographie de la deltaméthrine (Roussel Uclaf). p. 25-35.

TESSIER, J., 1982$_b$. - Structure et propriétés physico-chimiques de la deltaméthrine. Dans Monographie de la deltaméthrine (Roussel Uclaf). p. 37-65.

VAISSAYRE, M., 1985. - Development of pyrethroid-organophosphate associations for cotton pest control in French Speaking Africa. Rapport interne IRCT/CIRAD et IDESSA, Bouaké, Sect. Entomologie.

VIJVERBERG, H.P.M., & DE WEILLE, J.R., 1985. - The interaction of pyrethroids with voltage-dependent sodium channels. *Neurotoxicology,* 6, p. 23-34.

VIJVERBERG, H.P.M., & OORTGIESEN, M., 1988. - Steric structure and action of pyrethroids. In Ariens, E.J., van Rensen, J.J.S., & Welling, W., (Eds.), Chemicals in agriculture, Vol.1. Stereoselectivity of pesticides. Biological and chemical problems. Elsevier, Amsterdam. p. 151-182.

VINSON, S.B., & LAW, P.K., 1971. - Cuticular composition and D.D.T. resistance in the tobacco budworm. *J. Econ. Entomol.,* 64, p. 1387-1390.

WATERMAN, M.R.,& JOHNSON, E.F., 1991 - Cytochrome P450. Methods in Enzymolology. Academic Press, Inc. Volume 206.

WATERS, L.C., & NIX, C.E., 1988 - Regulation of insecticide resistance-related cytochrome P-450 expression in *Drosophila melanogaster. Pestic. Biochem. Physiol.*, 30, p. 214-227.

WATERS, L.C., ZELHOF, A.C., SHAW, B.J., & CHANG, L.Y., 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,* (24) p.12109. (Dec 15).

WAXMAN, D.J., ATTISANO, C., GUENGERICH, F.P., & LAPENSON, D.P., 1988. - Human Liver Microsomal Steroid Metabolism : Identification of the Major Microsomal Steroid Hormone 6ß-Hydroxylase Cytochrome P-450 Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 263 (2), p. 424-436.

WAXMAN, D.J., KO, A., & WALSH, C., 1983. - Regioselectivity and Stereoselectivity of Androgen ydroxylations Catalyzed by Cytochrome P-450 Isozymes Purified from Phenobarbital-induced Rat Liver. *J. Biol. Chem.,* 258 (19), p. 11937-11947.

WHEELOCK, G.D., & SCOTT, J.G., 1991. - Rapid microsome preparation from limited numbers of house flies. *Entomol. exp. appl.*, 61, p. 295-299.

WHEELOCK, G.D., & SCOTT, J.G., 1991. - Anti-P4501PR antiserum inhibits specific monooxygenase activities in LPR house fly microsomes. J. Exp. Zool. 264 (2), p. 153-158.

WHITEHEAD, G.B., 1959. - Pyrethrum resistance confered by resistance to D.D.T. in the blue tick. *Nature,* 184, p. 378-379.

WILKINSON, C. F., 1983. - Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance, In G. P. Georghiou and T. Saito (eds), *Pest Resistance to Pesticides.*, Plenum, New-York. 175-205.

WILLIAMSON, M.S., DENHOLM, I., BELL, C.A., & DEVONSHIRE, A.L., 1993. - Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genetics*, 240 (1), p. 17-22.

WOOD, A.W., RYAN, D.E., THOMAS, P.E., & LEVIN, W., 1983. - Regio- and Stereoselective Metabolism of Two C_{19} Steroids by Five Highly Purified and Reconstituted Rat Hepatic Cytochrome P-450 Isozymes. *J .Biol. Chem.*, 258 (14), p. 8839-8847.

YU, S. J., 1991. - Insecticide Resistance in the fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 39, p. 84-91

YU, S.J. & TERRIERE, L.C., 1979 - Cytochrome *P*-450 in Insects. 1. Differences in the Forms Present in Insecticide Resistant and Susceptible House Flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 12, p. 239-248.

SOMMAIRE DETAILLE

SOMMAIRE DETAILLE

LISTE DES ABREVIATIONS 5

INTRODUCTION GENERALE ..... 6 à 10

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 11 à 46

A. LES PYRÉTHRINOIDES 12

1. LEUR ORIGINE 12

2. LA DELTAMÉTHRINE 15

2.1. Propriétés physico-chimiques 15
2.2. Toxicité de la deltaméthrine vis-à-vis des vertébrés supérieurs 16

3. MODE D'ACTION DES PYRÉTHRINOIDES CHEZ LES INSECTES .. 17

3.1. Symptômes d'intoxication 17
3.2. Mode d'action des pyréthrinoïdes 18

3.2.1. L'excitabilité membranaire 18
3.2.2. La synapse et les neuromédiateurs 20
3.2.3. Sites d'action des pyréthrinoïdes 21

3.2.3.1. Cible principale des pyréthrinoïdes Action sur les canaux Na^+ 21
3.2.3.2. Cibles secondaires 22

3.3. Conclusion 22

4. UTILISATION DES PYRÉTHRINOIDES EN AGRICULTURE 23

B. LA RÉSISTANCE AUX PYRÉTHRINOIDES 23

1. GENERALITES 23

2. MÉCANISMES BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE LA RÉSISTANCE AUX PYRETHRINOïDES 26

2.1. Modification de la pénétration 27
2.2. Résistances métaboliques 28

2.2.1. Modification des réactions de phase I 28
2.2.1.1. Les hydrolases 29
2.2.1.2. Les monooxygénases 30
2.2.2. Modification de la phase secondaire ou phase de conjugaison 33

2.3. Altération des sites d'action 34

2.3.1. Modification du canal Na^+ (gène kdr) 34
2.3.2. Modifications des cibles secondaires 36

2.4. Conclusion 36

C. *SPODOPTERA LITTORALIS* ET LA RÉSISTANCE AUX INSECTICIDES . 37

1. *S. LITTORALIS* 37

2. DIFFÉRENTES MÉTHODES DE LUTTE UTILISÉES SUR COTONNIER 39

2.1. Position du coton en Afrique 39
2.2. Protection du cotonnier 40

2.2.1. Protection du coton en Afrique 40
2.2.2. Vers une lutte intégrée 41
2.2.3. La résistance des ravageurs du cotonnier aux insecticides 41

3. *S. LITTORALIS* ET LA RÉSISTANCE AUX INSECTICIDES 42

4. CONCLUSION 45

D. BUT DE NOTRE ÉTUDE 46

CHAPITRE II : BIOLOGIE ET CONDITIONS D'ÉLEVAGE DE *S.LITTORALIS* ..... 47 à 57

1. PRÉSENTATION DU RAVAGEUR 48

1.1. Position systématique 48
1.2. Répartition géographique 48
1.3. Description et biologie 49

1.3.1. Description de *S. littoralis* (cf. Planche photo n°2 p. suivante) 49
1.3.2. Le cycle biologique 52

2. TECHNIQUES D'ÉLEVAGE DE *S. LITTORALIS* 53

2.1. Élevage de *S. littoralis* 53
2.2. Description des souches étudiées 55
2.3. Problèmes posés par l'élevage de masse : 56

CHAPITRE III : SPECTRE D'ACTIVITE DE DIFFERENTS INSECTICIDES SUR LES DEUX SOUCHES ..... 58 à 74

1. INTRODUCTION 59
2. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR UN TEST INSECTICIDE 59

2.1. Les solutions insecticides 59
2.2. Constitution des lots expérimentaux de larves 60
2.3. Les applications d'insecticides 61

2.3.1. Traitement par application topique 61
2.3.2. Les insecticides testés 62
2.3.3. Contrôle de mortalité 63

2.4. Relation dose-mortalité 65

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION 65

3.1. Toxicité de la deltaméthrine 66
3.2. Toxicité de la cyperméthrine 68
3.3. Toxicité du chlorpyriphos-éthyl 69
3.4. Toxicité du DDT 71
3.5. Héritabilité de la résistance 72

4. CONCLUSION 74

CHAPITRE IV : RECHERCHE DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX PYRÉTHRINOIDES CHEZ *S. LITTORALIS* ..... 75 à 129

A. ÉTUDE DE LA PÉNÉTRATION CUTICULAIRE DE LA DELTAMÉTHRINE CHEZ *S. LITTORALIS* 76

1. INTRODUCTION 76

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 77

2.1. Principe 77
2.2. Méthode 78

2.2.1. Cinétique de pénétration 78
2.2.2. Partition de phase 78

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION 79

3.1. Cinétique de pénétration de la deltaméthrine 79
3.2. Partition de phase 80

4. CONCLUSION 81

B. RÉSISTANCE MÉTABOLIQUE 82

1. UTILISATION DE SYNERGISTES 82

1.1. Introduction 82
1.2. Matériels et méthodes 82
1.3. Résultats et discussion 83
1.3.1. Résultats 83
1.3.2. Discussion 86
1.4. Conclusion 87

2. ÉTUDE ENZYMATIQUE 88

2.1. Les estérases 88

2.1.1. Introduction 88
2.1.2. Matériels et méthodes 88
2.1.2.1. Mesures d'activités estérasiques 88
2.1.2.2. Mise au point d'une technique d'électrophorèse 89
2.1.3. Résultats et discussion 90
2.1.3.1. Activité estérasique 90
2.1.3.2. Electrophorèses 91

2.2. Les mono-oxygénases à cytochrome P450 93

2.2.1. Introduction 93
2.2.2. Matériel et méthodes 93
2.2.3. Résultats et discussion 96
2.2.3.1. Dosage des protéines 96
2.2.3.2. Dosage du cytochrome P450 96
2.2.3.3. Activité des cytochromes P450 98

2.3. Les gluthation-S-transférases 99

2.3.1. Introduction 99
2.3.2. Matériel et méthodes 99
2.3.3. Résultats et discussion 99

2.4. Conclusion 100

3. EXPÉRIENCES DE MÉTABOLISATION 102

3.1. Métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine 102

3.1.1. Introduction 102
3.1.2. Matériel et méthodes 103
3.1.3. Résultats et discussion 104

3.2. Expériences de métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine 108

3.2.1. Introduction 108
3.2.2. Matériel et méthodes 108
3.2.3. Résultats et discussion 109
3.2.3.1. Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine : phase aqueuse 109
3.2.3.2. Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine : phase organique 110

3.3. Métabolisation in vitro du DDT 113

3.3.1. Introduction 113
3.3.2. Matériel et méthodes 113
3.3.3. Résultats et discussion 114

3.4. Métabolisation de la testostérone 117

3.4.1. Introduction 117
3.4.2. Matériel et méthodes 117
3.4.3. Résultats et discussion 118

3.5. Conclusion de l'étude du métabolisme 122

C. MESURE DE LA SENSIBILITE DU SYSTEME NERVEUX A LA DELTAMETHRINE *IN SITU* CHEZ *S. LITTORALIS* 124

1. INTRODUCTION 124

2. MATERIEL ET METHODES 124

3. RESULTATS ET DISCUSSION 126

CONCLUSION GENERALE ..... 130 à 136

ANNEXES ..... 137 à 155

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 156 à 174

SOMMAIRE DETAILLE ..... 175 à 182

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX et PLANCHES PHOTOS ..... 183 à 185

LISTE DES TABLEAUX, FIGURES et PLANCHES PHOTOS

1. FIGURES

Fig. I.1 - Les constituants du pyrèthre 12
Fig. I.2 - Les alléthrines 13
Fig. I.3 - Esters pyréthrinoïdes 13
Fig. I.4 - Structures de pyréthrinoïdes photostables 14
Fig. I.5 - La deltaméthrine 14
Fig. I.6 - Stéréoisomère le plus actif de la deltaméthrine 15
Fig. I.7 - Métabolisme des pyréthrinoïdes 18
Fig. I.8 - L'excitabilité membranaire 19
Fig. I.9 - Mode d'action des pyréthrinoïdes 20
Fig. I.10 - Evolution de la résistance aux insecticides 25
Fig. I.11 - Les mécanismes de résistance aux insecticides 27
Fig. I.12 - Hydrolyse des pyréthrinoïdes 29
Fig. I.13 - A. Structure de l'hème - B. Structure d'un cytochrome P450 30
Fig. I.14 - Cycle réactionnel de l'activité momooxygénase 31
Fig. I.15 - Hydroxylation des pyréthrinoïdes par les monooxygénases à cytochrome P450. 32
Fig. I.16 - Réactions de conjugaison des pyréthrinoïdes 33
Fig. I.17 - Déshydrochlorination du DDT par une GST 34
Fig. I.18 - Part de l'Afrique dans la production mondiale de coton-fibre 40

Fig. II.1 - Répartition géographique de *S. littoralis* 48
Fig. II.2 - Répartition géographique de *S. litura* 49
Fig. II.3 - Cycle Biologique de *S. littoralis* 52

Fig. III.1 - Microapplicateur de Arnold 61
Fig. III.2 - Relations effet-dose de la deltaméthrine chez les souches sensible te résistante de *S. littoralis* 67
Fig. III.3 - Relations effet-dose de la cyperméthrine chez les souches sensible te résistante de *S. littoralis* 69
Fig. III.4 - Relations effet-dose du chlorpyriphos-éthyl chez les souches sensible te résistante de *S. littoralis* 70
Fig. III.5 - Relations effet-dose du DDT chez les souches sensible te résistante de *S. littoralis* 72
Fig. III.6 - Relations effet-dose de la deltaméthrine chez plusieurs souches de *S. littoralis* issues de croisements 73

Fig. IV.1 - Marquage de la molécule de deltaméthrine 77

Fig. IV.2 - Cinétique de pénétration de la deltaméthrine marquée au C14 chez *S. littoralis* 79
Fig. IV.3 - Relations dose-mortalité de la deltaméthrine chez *S. littoralis* avec ou sans DEF 84
Fig. IV.4 - Relations dose-mortalité de la deltaméthrine chez *S. littoralis* avec ou sans PB 85
Fig. IV.5 - Gels d'électrophorèse sur polyacrylamide : estérases 91
Fig. IV.6 - Déséhylation de la 7-éthoxycoumarine 95
Fig. IV.7 - Spectres de différence : Concentrations en cytochromes P450 dans les microsomes de *S. littoralis* 97
Fig. IV.8 - Marquage de la deltaméthrine 102
Fig. IV.9 - Métabolisation *in vitro* de la deltaméthrine chez *S. littoralis* 104
Fig. IV.10 - Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine chez *S. littoralis* : phase aqueuse 109
Fig. IV.11 - Métabolisation *in vivo* de la deltaméthrine chez *S. littoralis* :phase organique 110
Fig. IV.12 - Voies principales de métabolisation de la deltaméthrine chez *S. littoralis* 112
Fig. IV.13 - Métabolisation *in vitro* du DDT chez *S. littoralis* 114
Fig. IV.14 - Voies de métabolisation *in vitro* du DDT par les microsomes des larves résistantes de *S. littoralis* 116
Fig. IV.15 - Métabolisation *in vitro* de la testostérone chez *S. littoralis* 119
Fig. IV.16 - Sites d'hydroxylation de la testostérone chez le rat et chez *S. littoralis*. 122
Fig. IV.17 - Exemple d'enregistrement de l'activité électrique de la chaîne nerveuse chez une larve de *S. littoralis* 125
Fig. IV.18 - Enregistrement de l'activité d'une chaîne nerveuse isolée . 126
Fig IV.19 - Effet de l'application d'insecticide 126
Fig. IV.20 - Enregistrement de la réponse de 8 chaînes nerveuses à une dose de deltaméthrine (3.10^{-9} M) chez la souche R. 127
Fig. IV.21 - Courbe de l'hyperexcitation des chaînes nerveuses des deux souches en fonction de la dose de deltaméthrine 128

2. TABLEAUX

Tab. I.1 - Toxicité aïgue par voie orale de la deltaméthrine 16
Tab. I.2 - Toxicité relative mouche/rat de divers insecticides 16
Tab. I.3 - Evolution du nombre d'espèces d'insectes résistants aux pesticides 24
Tab. I.4 - Nombre d'espèces résistantes suivant les différents groupes chimiques de pesticides 25
Tab. I.5 - Principaux pays producteurs de coton en Afrique 39

Tab. I.6 - Facteurs de résistance à divers insecticides chez *S. littoralis* dans la province Sharkia en Egypte 43
Tab. II.1 - Conditions d'élevage de *S. littoralis* 53
Tab. II.2 - Composition du milieu artificiel 54

Tab. III.1 - Insecticides testés 63
Tab. III.2 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 de la deltaméthrine chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis* 66
Tab. III.3 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 de la cyperméthrine chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis* 68
Tab. III.4 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 du chlorpyriphos-éthyl chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis* 69
Tab. III.5 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 du DDT chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis* 71
Tab. III.6 - Valeurs des DL20, DL50, DL90 de la deltaméthrine chez les larves de 4ème stade de *S. littoralis* issues de croisements 72

Tab. IV.1 - Répartition de la radioactivité 80
Tab. IV.2 - Concentration des inhibiteurs 83
Tab. IV.3 - Valeurs des DL50 de la deltaméthrine chez *S. littoralis* S et R en présence ou absence de DEF 83
Tab. IV.4 - Valeurs des DL50 de la deltaméthrine chez *S. littoralis* S et R en présence ou absence de PB 84
Tab. IV.5 - Valeurs des coefficients de résisitance à la deltaméthrine chez *S. littoralis* S et R en présence ou absence d'inhibiteur 86
Tab. IV.6 - Activité estérasique totale chez les deux souches 90
Tab. IV.7 - Dosage protéique microsomal 96
Tab. IV.8 - Dosage des cytochromes P450 chez les deux souches de *S. littoralis* 97
Tab. IV.9 - Activité des cytochromes P450 chez les deux souches de *S. littoralis* 98
Tab. IV.10 - Plan d'expérience pour la mesure d'activité des GST 99
Tab. IV.11 - Activité des glutathion-S-transférases 100
Tab. IV.12 - Identification des métabolites de la ^{14}C testostérone produits par les microsomes de larves de *S. littoralis* 118

PLANCHES PHOTOS

Planche N°1 : Dégâts sur cotonnier causés par *S. littoralis* 38
Planche N°2 : Biologie de *S. littoralis* 51
Planche N°3 : Tests de toxicité par application topique 64

La Goutte d'Encre .

ATELIER DE REPROGRAPHIE

67.65.30.96

Titre : Etude des mécanismes de résistance à la deltaméthrine chez un ravageur du cotonnier : *Spodoptera littoralis* (Boisd.)(*Lepidotera, Noctuidae*).

Auteur : Véronique PINCHARD

Résumé : *Spodoptera littoralis*, noctuelle déprédatrice du cotonnier, constitue un bon modèle pour l'étude des mécanismes de résistance.
Deux souches de *S. littoralis* différant par leur sensiblité à la deltaméthrine, ont été élevées au laboratoire d'entomologie appliquée du CIRAD/CA : une souche résistante (R) d'origine Egyptienne et une souche sensible (S) de référence. Le **coefficient de résistance** à la **deltaméthrine** de la souche R est de **1 600**.
Des croisements entre les souches S et R semblent montrer que la **résistance** est **polygénique**.
La **cinétique de pénétration** de la **deltaméthrine** marquée au carbone 14 (^{14}C) est **identique** chez les deux souches.
En présence de **DEF, inhibiteur d'estérases**, le coefficient de résistance ne varie pas, alors que l'addition d'un **inhibiteur d'oxydases** le Butoxyde de pypéronyle **(PB)**, entraîne une diminution.
Des mesures d'activités enzymatiques ont été effectuées : il n'existe pas de différence d'activité estérasique chez les deux souches.
L'activité des **glutathion-transférases** est **1,5 fois** plus élevée chez la souche **R** que chez la souche **S**.
L'activité des **cytochromes P450** est **cinq fois** plus importante chez la souche R que chez la souche S.

Des expériences de **métabolisation** *in vitro* et *in vivo* de la **^{14}C deltaméthrine** et *in vitro* du **^{14}C DDT**, ont permis de préciser le **rôle des cytochromes P450** dans la résistance et de proposer des **schémas de biotransformation** de ces deux insecticides chez *S. littoralis*.
La **métabolisation** de la **^{14}C testostérone** permet de **caractériser les cytochromes P450** impliqués dans la résistance.
Toutefois, ces facteurs métaboliques ne peuvent pas à eux seuls expliquer un tel niveau de résistance.
Nous avons donc étudié la **réponse des chaînes nerveuses** de larves des deux souches en fonction de la **dose de deltaméthrine** appliquée. **La dose neurotoxique 50** de la souche R est **10 fois plus élevée** que celle de la souche S.

La résistance est donc liée à une diminution de sensibilité du système nerveux et à une résistance métabolique par les oxydases.

Mots clés : *Spodoptera littoralis*, deltaméthrine, résistance, métabolisme, cytochrome P450, système nerveux.

Title : Study on deltamethrin resistance mechanisms in the Egyptian cotton leafworm : *Spodoptera littoralis* (Boisd.)(*Lepidoptera, Noctuidae*).

Author : Véronique PINCHARD

Summary : The Egyptian cotton leafworm, *S.littoralis* is a good model to study resistance mechanisms.
Two strains of *S.littoralis* with different susceptibility have been reared in the laboratory of "Entomologie appliquée" of CIRAD/CA : a deltamethrin resistant (R) strain from Egypt and a susceptible (S) one.
Resistance ratio between the two strains is **1 600**.
Crossing between the two strains seems to indicate that **resistance is polygenic**.
Using an esterasic inhibitor DEF, the resistance ratio is the same, but with an oxydasic inhibitor (PB) it decreases.
Deltamethrin **penetration kinetic** is the **same** for the two strains.
We measured some enzymatic activities in the two strains.
Esterasic activity is the **same** for S and R but electrophoretic bands are different.
Glutathion-transferases activity is **1,5 fold** in the R strain compared to the S strain.
Cytochrome P450 activity is higher in the R strain **(x 5)**.
Metabolic resistance is one of the resistance mechanisms.
Deltamethrin metabolism and DDT metabolism, have shown the **implication of cytochrome P450** into resistance, and some metabolic pathways can now be proposed.
Testosterone metabolism has given some results on **caracterization of cytochrome P450**.
Some measures on nerve cord response with different doses of deltamethrin showed a factor ten between neurotoxic doses 50 of the two strains.
Deltamethrin resistance is due to reduce susceptibility of the nerve system and to metabolic resistance by oxydases.

Key words : *Spodoptera littoralis*, deltamethrin, resistance, metabolism, cytochrome P450, nervous system.