

FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES
AGRONOMIQUES DE GEMBLOUX
(Belgique)

Unité de Zoologie générale et appliquée

Etude des phénomènes responsables de la
résistance spécifique au malathion chez
Tribolium castaneum HERBST
(Col., Tenebrionidae)

Eric HAUBRUGE

Dissertation originale présentée
en vue de l'obtention du grade
de docteur en sciences agronomiques

Promoteur: C. GASPAR
Rapporteurs: J.-B. BERGE
B. SCHIFFERS

1995

HAUBRUGE Eric (1995). Etude des phénomènes responsables de la résistance spécifique au malathion chez *Tribolium castaneum* (HERBST) (Coleoptera, Tenebrionidae) (thèse de doctorat). Gembloux, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, 273 p., 51 tabl., 47 fig.

Résumé: - Des tests toxicologiques ont mis en évidence des souches de *Tribolium castaneum* résistantes spécifiquement au malathion. L'étude génétique montre d'une part, que ce phénomène de résistance est caractérisé chez cet insecte par une dominance incomplète et d'autre part, qu'il est contrôlé par un seul gène ou plusieurs gènes autosomiques et étroitement liés. Au cours du temps et même en l'absence de traitement au malathion, la proportion du phénotype résistant reste stable au sein des populations de *T. castaneum*. Pour expliquer cette stabilité, plusieurs paramètres biologiques sont envisagés. L'étude du comportement des mâles lors de l'accouplement indique que les individus mâles résistants sont plus compétitifs pour s'accoupler et pour transférer leur sperme que les insectes sensibles. Ce phénomène peut expliquer l'apparente contradiction entre les "critères classiques de fitness" moins performants des individus de la souche résistante et le maintien des insectes résistants dans les populations. La caractérisation biochimique de la résistance spécifique au malathion a été ensuite envisagée. Bien qu'il n'y ait pas de réduction de la pénétration de l'insecticide, on observe une excrétion plus importante chez les insectes résistants, liée à une métabolisation du malathion en acide malathion monocarboxylique et dicarboxylique par l'action de carboxylestérases. L'électrophorèse PAGE a permis de mettre en évidence une carboxylestérase dégradant spécifiquement le malathion (MCase). Cette enzyme a été purifiée chez la souche sensible et la souche résistante. Bien que la protéine possède un poids moléculaire de l'ordre de 52 KDa chez les deux souches, le point isoélectrique est différent. Il ne s'agit donc pas de protéines identiques. De plus, la MCase présente un pouvoir catalytique plus important et une meilleure affinité vis-à-vis du malathion chez la souche résistante que chez la souche sensible, alors que le phénomène inverse s'observe à l'égard de l'acétate d' α -naphthyle. La carboxylestérase présente chez la souche résistante, aurait subi une (ou des) modification(s) qualitative(s) lui permettant de dégrader préférentiellement le malathion par rapport à d'autres substrats comme l'acétate d' α -naphthyle.

Copyright. Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous une autre forme est donc faite en violation de la loi.

HAUBRUGE Eric (1995). Study of malathion specific resistance in *Tribolium castaneum* (HERBST) (Coleoptera, Tenebrionidae) (in french). Gembloux, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, 273 p., 51 tabl., 47 fig.

Summary: - Malathion specific resistant strains of *Tribolium castaneum* have been detected by toxicological tests. Genetic study show that the resistance has been characterized by incomplete dominance and has been controlled by one gene or several.

Resistant phenotype has been stable in the population of *T. castaneum* during the time and without malathion treatment. Several biological parameters have been studied for understanding this stability. The study of mating competition show that resistant male is more competitive for the mating and the sperm transfer than susceptible male. This phenomenon can explain the contradiction between the classical fitness disadvantages for resistant insects and the stability of resistant phenotype in population.

Biochemical mechanisms of malathion specific resistance in *T. castaneum* has been also studied. In resistant insects, a more important excretion has been associated with a hydrolysis of malathion in monoacid and diacid malathion by carboxylesterases. Electrophoresis separation (PAGE) show a malathion specific carboxylesterase (MCASE). This enzyme has been purified from the susceptible and resistant strains. For the two strains, the protein has a molecular weight of 52 KDa but the isoelectric point is different. The kinetic studies suggest that MCASE of resistant insect is capable of a rapidly malathion hydrolysing than carboxylesterase for susceptible insects and that she possess more affinity for malathion than for naphthyl esters. Malathion carboxylesterase has arisen by qualitative modifications in a esterase gene or susceptible malathion carboxylesterase gene, giving more affinity for organophosphate than for naphthyl ester substrates.

à André, Christian et Jean-Claude

Remerciements

En 1989, le Professeur Charles GASPARD m'a donné l'opportunité de travailler avec lui à l'Unité de Zoologie générale et appliquée. Au fil des ans, j'ai pu apprécier son approche scientifique, son intelligence exceptionnelle et ses qualités humaines.

Qu'il trouve une fois de plus l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur Jean-Baptiste BERGE, Directeur de Recherches à l'Institut National des Recherches Agronomiques, m'a régulièrement accueilli dans son laboratoire au Centre de Recherches d'Antibes. L'écoute attentive qu'il m'a accordée, son enthousiasme et ses compétences scientifiques ont joué un rôle important dans le déroulement des mes expérimentations.

Mon ami André CUANY, Ingénieur de Recherches à l'INRA (Antibes), avec ses talents de manipulateur, son imagination et ses qualités humaines, m'ont fait découvrir les véritables valeurs du métier de chercheur. Mes compagnons de route Jean-Claude GILSON et Christian WONVILLE m'ont soutenu techniquement et ont subi ma bonne mais aussi ma mauvaise humeur au cours de ces six années de recherches. Je leur dédie, à tous les trois, cet ouvrage.

Je tiens à remercier Monsieur Bernard WATHELET, Chef de Travaux à l'Unité de Chimie générale et organique, pour son soutien scientifique et moral tout au long de ce travail

Je remercie également mon ami Georges LOGNAY, Chef de Travaux à l'Unité de Chimie générale et organique. Sa compétence et sa disponibilité m'ont été précieuses lors de la rédaction et la finalisation de la thèse.

J'ai encore le plaisir de remercier Monsieur Jacques MIGNON, Assistant à l'Unité de Zoologie générale et appliquée qui par la qualité des observations réalisées dans le cadre de son travail de fin d'études a apporté une importante contribution à l'étude de la compétition des mâles lors de l'accouplement.

Ma reconnaissance s'adresse également aux Professeurs Alfred COPIN, Philippe DREZE, Philippe LEPOIVRE et Michel PAQUOT, ainsi qu'à Monsieur Bruno SCHIFFERS pour leur conseils judicieux lors de l'élaboration de ce manuscrit.

Monsieur Marcel AMICHOT, Chargé de Recherches à l'INRA (Antibes) a été prompt à faire bénéficier ma recherche de ses compétences de biochimiste et d'intéressantes perspectives s'ouvrent grâce à lui.

Messieurs Christophe BLECKER, Jean KUMMERT, Richard KETTMANN, Pascale LAMBERT, Daniel PORTETELLE et Robin WILKIN ont toujours été ouverts à la discussion.

Je tiens également à remercier Laurence BRABANT pour la dactylographie et la mise en page de ce travail.

J'exprime également toute ma gratitude à l'ensemble du personnel de l'Unité de Zoologie générale et appliquée pour son amabilité et sa disponibilité.

Au cours de ses six années, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec Jean-Louis HEMPTINNE, Valérie LIENARD et Dogo SECK. Leur contact m'a été d'un grand enrichissement.

Enfin, je remercie mon épouse Catherine et mes enfants Coline et Gil pour leur soutien et les sacrifices qu'ils ont consentis.

TABLE DES MATIERES

Résumé

Summary

Remerciements

Table des matières

Liste des espèces citées

CHAPITRE 1 .

Les insecticides et la rançon du progrès.... 1

CHAPITRE 2 .

La résistance aux insecticides :
compréhension des mécanismes..... 11

2.1. Introduction..... 11

2.2. Résistance comportementale..... 14

2.2.1. *Résistance comportementale dépendante du
stimulus*..... 14

2.2.2. *Résistance comportementale indépendante du
stimulus*..... 15

2.3. Résistance physiologique.....	16	a. Définition et caractéristiques.....	32
2.3.1. Modification de la cinétique de pénétration de l'insecticide.....	16	b. Activité catalytique des estérases.....	33
2.3.2. Excrétion et séquestration des insecticides....	18	c. Implication des estérases dans la résistance aux insecticides.....	33
2.4. Résistance biochimique.....	18	d. Quelles peuvent être les causes de la résistance ?.....	37
2.4.1. Introduction.....	18	e. En guise de conclusions.....	38
2.4.2. Augmentation de l'activité des systèmes de détoxification.....	19	2.4.3. Modification des cibles moléculaires.....	39
2.4.2.1. Les monooxygénases à cytochrome P-450.....	21	2.4.3.1. Le canal sodium.....	39
a. Définition et caractéristiques.....	21	a. Implications du canal sodium dans la résistance.....	40
b. Activité catalytique des PSMOs.....	23	b. Quelles peuvent être les causes de la résistance?.....	41
c. Implication des monooxygénases à cytochrome P-450 dans la résistance aux insecticides.....	25	2.4.3.2. L'acétylcholinestérase (AChE).....	43
d. Quelles peuvent être les causes de cette résistance ?.....	26	a. Implication de l'acétylcholinestérase dans la résistance...	43
e. En guise de conclusion.....	29	b. Quelles peuvent être les causes de la résistance ?.....	44
2.4.2.2. Les glutathion-S-transférases (GST).....	29	2.5. Conclusions.....	45
a. Définition et caractéristiques.....	29		
b. Activité catalytique des GST.....	30		
c. Implications des glutathion-S-Transférases dans la résistance aux insecticides.....	30		
d. Quelles peuvent être les causes de cette résistance ?.....	32		
2.4.2.3. Les estérases	32		

CHAPITRE 3 .

La résistance aux pesticides chez les insectes ravageurs des denrées entreposées.....

3.1. Quelle est la situation actuelle ?.....	46
3.2. Comment peut-on gérer la résistance aux pesticides chez les insectes des denrées ?....	49

3.2.1. La méthode de lutte chimique.....	50
3.2.1.1. Le choix d'un insecticide.....	50
3.2.1.2. Préservation des insectes sensibles.....	50
3.2.1.3. Destruction des insectes résistants.....	51
a. Utilisation de molécules synergistes.....	51
b. Utilisation de pesticides à effet choc et à faible rémanence.....	51
C. Utilisation combinée de deux insecticides.....	52
3.2.2. Méthodes alternatives de lutte.....	52
3.2.2.1. Traitement thermique des grains.....	52
3.2.2.2. Traitement par le froid.....	53
3.2.2.3. Stockage sous atmosphère contrôlée.....	53
3.2.2.4. Traitement mécanique des grains.....	54
3.2.2.5. Lutte biologique.....	54
3.2.2.6. Sélection de variétés résistantes.....	55
3.3. Conclusion.....	55

CHAPITRE 4 .

Tribolium castaneum: un modèle biologique pour étudier la résistance aux insecticides 57

4.1.Introduction..... 57

4.2. Description de l'insecte..... 57

4.3. Paramètres biologiques et importance agronomique du modèle "Tribolium castaneum" 59

4.3.1. Origine et importance agronomique..... 59

4.3.2. Milieu d'élevage et substrats nutritifs..... 59

4.3.3. Cycle de développement..... 60

4.3.4. La résistance au malathion chez Tribolium.... 62

4.3.4.1. Comment a évolué la situation de la résistance au malathion chez Tribolium castaneum depuis 1961 ?..... 62

4.3.4.2. Comment peut-on expliquer ce phénomène ?..... 66

4.3.4.3. Quelles sont les causes de la résistance au malathion ?..... 67

4.4. Conclusions..... 68

CHAPITRE 5 .

Conclusions de l'étude bibliographique et buts des expérimentations..... 70

CHAPITRE 6 .

Résistance de T. castaneum à l'égard du malathion : étude toxicologique..... 74

6.1. Introduction.....	74
6.2. Matériel et méthodes.....	74
6.2.1. Conditions expérimentales.....	74
6.2.1.1. L'insecte.....	74
6.2.1.2. Les insecticides et leurs caractéristiques.....	75
6.2.2. Dispositifs expérimentaux.....	78
6.2.2.1. Test toxicologique sur papier-filtre.....	78
6.2.2.2. Test toxicologique en milieu nutritif.....	79
6.2.2.3. Analyses statistiques des résultats.....	80
6.3. Résultats et discussion.....	80
6.3.1. Toxicité du malathion à l'égard de <i>T. castaneum</i>	80
6.3.2. Mise en évidence des souches résistantes au malathion.....	81
6.3.3. La résistance au malathion de la souche PRm est-elle spécifique ou croisée?.....	85
6.3.4. Influence du stade de développement de <i>T.</i> <i>castaneum</i> sur la toxicité du malathion.....	88
6.4. Conclusions.....	91

CHAPITRE 7 .

Caractérisation génétique du mécanisme de résistance spécifique au malathion..... 93

7.1. Introduction..... 93

7.2. Matériel et méthodes..... 94

7.2.1. Mesure de la transmission génétique de la résistance..... 94

7.2.2. Détermination du nombre de gènes impliqués dans la résistance et impact du sexe dans la transmission génétique..... 95

7.3. Résultats et discussion..... 97

7.3.1. Mesure de la transmission génétique de la résistance..... 97

7.3.2. Détermination du nombre de gènes impliqués dans la résistance..... 98

7.4. Conclusion..... 105

CHAPITRE 8 .

Evolution de la résistance spécifique au malathion au sein des populations de <i>Tribolium castaneum</i>	106
8.1. Introduction.....	106
8.2. Matériel et méthodes.....	106
8.3. Résultats.....	107
8.4. Discussion.....	112
8.5. Conclusions.....	113

CHAPITRE 9 .

Etude des paramètres biologiques et comparaison des valeurs sélectives	114
9.1. Introduction.....	114
9.2. Matériel et méthodes.....	114
9.2.1. <i>Quantification de la ponte</i>	114
9.2.2. <i>Estimation de la viabilité des oeufs</i>	115

9.2.3. <i>Durée de développement</i>	116
9.2.4. <i>Evaluation de la valeur sélective</i>	116
9.3. Résultats et discussion.....	117
9.3.1. <i>Quantification de la ponte</i>	117
9.3.2. <i>Estimation de la viabilité des oeufs</i>	120
9.3.3. <i>Evaluation de la durée du cycle de développement</i>	121
9.3.4. <i>Comparaison de la valeur sélective des souches sensibles et résistance en milieu non traité</i>	125
9.4. Conclusion.....	128

CHAPITRE 10 .

Le rôle de la compétition des mâles lors de l'accouplement dans la transmission de la résistance	130
10.1. Introduction.....	130
10.2. Matériel et méthodes.....	131
10.2.1. <i>Mise en évidence de la présence d'une spermathèque</i>	131

10.2.1.1. But.....	131
10.2.1.2. Méthodologie.....	131
10.2.2. Utilisation du sperme par la femelle: impact de la spermathèque sur la transmission de la résistance.....	132
10.2.2.1. But.....	132
10.2.2.2. Méthodologie.....	132
a. Utilisation du sperme par la femelle.....	132
b. Mise en évidence du retrait et du transfert de sperme lors de l'accouplement.....	133
10.2.3. Rôle de la compétition des mâles lors de l'accouplement dans la transmission des gènes de résistance.....	134
10.2.3.1. But.....	134
10.2.3.2. Méthodologie.....	134
a. mesure de la compétition des mâles.....	135
b. évolution de la compétition des mâles au cours du temps.....	136
10.2.4. Accouplement et transfert de sperme.....	137
10.2.4.1. But.....	137
10.2.4.2. Méthodologie.....	137
a. Évaluation de la durée d'accouplement.....	137
b. Mesure de la fréquence d'accouplement.....	138
10.3. Résultats et discussion.....	138

10.3.1. Rôle de la spermathèque dans la transmission des gènes de résistance.....	138
10.3.1.1. Mise en évidence de la présence d'une spermathèque chez <i>T. castaneum</i>	138
10.3.1.2. Utilisation du sperme par la femelle.....	141
10.3.1.3. Mise en évidence du retrait et du transfert du sperme lors de l'accouplement.....	144
10.3.2. Rôle de la compétition des mâles lors de l'accouplement dans la transmission des gènes de résistance.....	145
10.3.2.1. La compétition des mâles lors de l'accouplement.....	145
10.3.2.2. Evolution de la compétition des mâles au cours du temps.....	150
10.3.3. Accouplement et transfert de sperme	
10.3.3.1. Mesure de la durée de l'accouplement.....	154
10.3.3.2. Estimation de la fréquence de l'accouplement.....	156
10.4. Conclusions.....	158
 CHAPITRE 11 .	
Mise en évidence des mécanismes responsables de la résistance spécifique au malathion chez <i>Tribolium castaneum</i>.....	160
11.1. Introduction.....	160

11.2. Matériel et méthodes	160
11.2.1. Les cinétiques de pénétration et d'excrétion du malathion	160
11.2.1.1. But.....	160
11.2.1.2. Méthodologie.....	161
11.2.2. Impact des synergistes sur la résistance: mise en évidence des mécanismes biochimiques responsables de la résistance	164
11.2.2.1. But.....	164
11.2.2.2. Méthodologie.....	165
11.2.3. La métabolisation "in vitro" du malathion..	166
11.2.3.1. But.....	166
11.2.3.2. Méthodologie.....	166
a. Préparation des homogénats d'insectes.....	166
b. Incubation.....	166
c. Extraction du malathion, des métabolites lipophiles et des métabolites acides.....	168
d. Chromatographie sur couche mince.....	168
11.2.4. Mise en évidence du rôle de l'acétylcholinestérase dans la résistance	169
11.2.4.1. But.....	169
11.2.4.2. Méthodologie.....	170
11.3. Résultats	171

11.3.1. Les cinétiques de pénétration et d'excrétion du malathion	171
11.3.2. Mise en évidence du mécanisme responsable de la résistance au malathion par l'utilisation de synergistes	177
11.3.3. Mise en évidence de la métabolisation du malathion par les carboxylesterases	179
11.3.4. Mise en évidence du rôle de l'acétylcholinestérase dans la résistance	182
11.4. Conclusions	184

Chapitre 12 .

Caractérisation des estérases présentes chez *Tribolium castaneum*.....

12.1. Introduction	185
12.2. Matériel et méthodes	186
12.2.1. Préparation des homogénats d'insectes et des fractions cellulaires	186
12.2.1.1. Préparation des homogénats d'insectes.....	186
12.2.1.2. Fractionnement cellulaire.....	186

12.2.2. Dosage des protéines totales.....	186
12.2.3. Dosage de l'activité des estérases totales.....	187
12.2.4. Techniques d'électrophorèse.....	189
12.2.4.1. Electrophorèse PAGE.....	190
12.2.4.2. Isoélectrofocalisation.	
12.2.4.3. Mise en évidence de l'activité estérasique.....	190
12.2.4.4. Mise en évidence de l'activité des carboxylestérases à l'égard du malathion.....	191
12.3. Résultats et discussion.....	191
12.3.1. Activité des estérases totales.....	191
12.3.2. Etude du spectre d'activité des estérases... ..	194
12.3.3. Distribution de l'activité estérasique dans les organes et tissus.....	197
12.3.4. Distribution de l'activité estérasique dans la cellule.....	198
12.3.5. Evolution de l'activité estérasique au cours de l'ontogenèse.....	200
12.3.6. Mise en évidence des différentes estérases par électrophorèse.....	202
12.3.6.1. Isofocalisation.....	202
12.3.6.2. Mise en évidence des carboxylestérases dégradant le malathion.....	204

12.4. Conclusions.....	209
------------------------	-----

Chapitre 13 .

Purification d'une carboxylestérase responsable de la résistance spécifique au malathion chez <i>Tribolium castaneum</i>...	211
13.1. Introduction.....	211
13.2. Matériels et méthodes.....	212
13.2.1. Dosage des protéines totales.....	212
13.2.2. Mesure de l'activité des carboxylestérases sur le malathion.....	212
13.2.2.1. Méthode spectrophotométrique.....	212
13.2.2.2. Mesure radioactive.....	213
13.2.3. Mesure de l'activité des estérases totales.....	214
13.2.4. Diminution de la concentration saline et élimination des colorants naturels.....	214
13.2.4.1. La dialyse.....	214
13.2.4.2. Passage sur colonne de Sephadex G25.....	215
13.2.5. Précipitation des protéines au moyen d'ammonium sulfate.....	215
13.2.6. Détermination du poids moléculaire.....	216

13.2.6.1. Préparation des échantillons et mode opératoire.....	216
13.2.6.2. Révélation des protéines.....	217
13.2.6.3. Evaluation du poids moléculaire de la protéine.....	217
13.2.7. Détermination du point isoélectrique.....	218
13.3. Résultats et discussion.....	218
13.3.1. Purification d'une carboxylestérase dégradant le malathion.....	218
13.3.1.1. Méthodologie.....	218
13.3.1.2. Précipitation à l'ammonium sulfate.....	219
13.3.1.3. Chromatographie de filtration sur gel.....	219
13.3.1.4. Chromatographie d'échange d'ion.....	222
13.3.1.5. Chromatographie d'hydroxyapatite.....	225
13.3.1.6. Isofocalisation préparative.....	227
13.3.1.7. Electrophorèse préparative.....	229
13.3.1.8. Récapitulatif de la purification.....	230
13.3.2. Détermination du poids moléculaire.....	232
13.3.3. Caractéristiques biochimiques des MCases..	236
13.4. Conclusions.....	238

Chapitre 14 .

Conclusion générale et perspectives.....	240
------------------------------------------	-----

14.1. Intérêts et objectifs.....	240
14.2. Le modèle agronomique étudié.....	241
14.3. Les résultats obtenus.....	242
14.3.1. Une approche toxicologique.....	242
14.3.2. Une approche génétique.....	242
14.3.3. Une approche biologique.....	243
14.3.4. Une approche biochimique.....	245
BIBLIOGRAPHIE.....	247

LISTES DES TABLEAUX ET DES FIGURES .

CHAPITRE 14.

Conclusions générales

14.1. Intérêt et objectifs

La lutte chimique constitue un des principaux intrants de l'agriculture moderne. Pour pouvoir produire plus sans augmenter la superficie des terres cultivables, il a fallu d'une part, fertiliser le sol et d'autre part, maintenir les cultures dans un état phytosanitaire excellent en appliquant principalement des pesticides. Mais la lutte chimique intensive contre les ravageurs a été à la base de la sélection d'individus capables de survivre et de se reproduire malgré la présence de pesticides dans leur environnement.

Les conséquences de ce phénomène sont désastreuses:

1. au niveau des utilisateurs qui se trouvent souvent démunis devant l'apparition de ces populations d'insectes résistants;
2. au niveau de l'industrie phytosanitaire, car l'apparition de souches d'insectes résistants est synonyme, à plus ou moins long terme, de la disparition des organochlorés, des organophosphorés et des pyréthriinoïdes;
3. au niveau de l'environnement, car l'augmentation des doses appliquées et la diversification non contrôlée des insecticides utilisés, pour lutter contre la résistance, sont à la base de contaminations importantes des sols et des nappes aquifères.

Alliant les nouvelles technologies du vivant et les connaissances entomologiques, nos travaux de recherche portent d'une part, sur la biologie et l'éthologie du ravageur et d'autre part, sur la compréhension des mécanismes responsables de la résistance chez le ravageur.

Les résultats obtenus permettent la mise au point d'une gestion raisonnée de la résistance aux insecticides, avec pour objectifs:

1. de développer des sondes moléculaires pour suivre l'évolution des gènes de résistance dans les populations;
2. d'utiliser des pesticides plus respectueux de l'environnement;
3. d'utiliser de nouvelles substances non biocides possédant des modes d'action différents de celles couramment employées;
4. de mettre au point des méthodes alternatives de lutte comme la lutte biologique ou la lutte génétique.

14.2. Le modèle agronomique étudié

Nous avons choisi, pour nos recherches, l'écosystème des denrées entreposées qui est cloisonné et entièrement contrôlé par l'homme. On y compte plus d'une centaine d'espèces d'insectes ravageurs des grains et des farines. Depuis une vingtaine d'années, le nombre d'espèces résistantes aux insecticides ne cesse de croître; de plus, afin d'améliorer la qualité nutritionnelle des denrées alimentaires, l'utilisation intensive des pesticides est de plus en plus remise en cause.

Nous nous sommes intéressé au *Tribolium castaneum* et à la résistance spécifique au malathion. Parmi les ravageurs des denrées entreposées, on constate que le coléoptère *Tribolium castaneum* est le seul insecte qui présente des cas de résistance à 66 insecticides et ce, principalement à l'égard du malathion et du lindane. De plus, chez ce coléoptère, la résistance spécifique au malathion est cosmopolite et est également présente dans plus de 80% des souches.

14.3. Les résultats obtenus

La résistance spécifique au malathion chez *Tribolium castaneum* a été étudiée sous quatre aspects.

14.3.1. Une approche toxicologique

La stratégie suivie a donc été de montrer qu'il existe une variabilité de la susceptibilité de *T. castaneum* à l'égard du malathion. Nous avons ensuite mis en évidence des souches résistantes spécifiquement à cet insecticide. Enfin, les tests toxicologiques ont montré d'une part, un ordre de tolérance vis-à-vis du malathion au niveau des différents stades de développement: nymphe>oeuf>larve âgée de 18 jours>adulte>larve âgée d'un jour, et d'autre part, la présence de la résistance au malathion durant tout le cycle biologique.

14.3.2. Une approche génétique

Pour effectuer toutes les autres expérimentations, nous avons choisi la souche résistante PRm et la souche sensible Asm, le facteur de résistance (FR₅₀) entre ces deux lignées étant de 250,1X.

Les croisements réciproques ont montré que la résistance spécifique au malathion chez la souche PRm est caractérisée par une dominance incomplète. La ségrégation mendélienne observée lors des rétro-croisements nous indique également que la résistance spécifique au malathion est contrôlée soit par un seul gène soit par un groupe de gènes étroitement liés.

De plus, nous avons remarqué que, bien que la résistance spécifique au malathion ne soit pas liée au sexe, les femelles sont plus tolérantes au malathion que les mâles. La susceptibilité à l'égard de cet organophosphoré serait liée au poids des individus; les femelles étant significativement d'un poids plus élevé que les mâles.

14.3.3. Une approche biologique

Dans un premier temps, nous avons suivi l'évolution du phénotype résistant au sein de populations constituées d'individus sensibles associés à différentes proportions d'insectes résistants. Cette expérience a montré que la résistance spécifique au malathion est stable au cours du temps.

Pour mieux comprendre ce phénomène, j'ai comparé la valeur sélective de la souche sensible par rapport à celle de la souche résistante. Dans ce but, nous avons évalué les paramètres biologiques classiquement utilisés comme la fertilité, la fécondité, la durée du cycle de développement.

Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas d'expliquer la stabilité du phénotype résistant dans des populations naturelles. La souche résistante spécifiquement au malathion possède en effet une

vigueur biologique plus faible que la souche sensible. D'autres paramètres biologiques ont donc été envisagés.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressé à la compétition des mâles lors de l'accouplement. Nos résultats montrent qu'une spermathèque permet à la femelle de conserver le sperme du mâle pendant plusieurs semaines. Nous avons remarqué que l'utilisation du sperme déposé lors du dernier accouplement avec la femelle pousse le mâle à s'accoupler régulièrement, de telle manière à ce qu'il soit toujours le dernier mâle à féconder la femelle.

La présence d'une spermathèque permet donc à la femelle de conserver le sperme provenant d'un ou de plusieurs accouplements et de l'utiliser ultérieurement pour fertiliser ses ovules. Les accouplements multiples et l'existence d'une spermathèque stockant le sperme issu d'un ou de plusieurs accouplements augmentent les possibilités de dispersion des gènes de résistance dans l'espace et dans le temps.

De plus, les expériences réalisées sur le comportement des mâles lors de l'accouplement nous indiquent que les individus mâles résistants sont plus compétitifs pour s'accoupler et transférer leur sperme que les insectes mâles sensibles. Ceci est d'autant plus important que nous avons montré que lors d'accouplements successifs, le sperme du dernier mâle est utilisé, en premier lieu, pour la fertilisation des ovules.

14.3.4. Une approche biochimique

Nous avons entrepris de caractériser les mécanismes responsables de la résistance spécifique au malathion chez ce coléoptère. Dans un premier temps, en appliquant le pesticide sur l'abdomen de l'insecte, nous avons démontré qu'il n'y a pas de réduction de la pénétration cuticulaire du malathion; mais que l'excrétion du pesticide et de ses métabolites polaires est plus importante chez les adultes résistants de *Tribolium castaneum*.

Nous avons ensuite essayé de savoir quel est le système enzymatique impliqué dans la résistance au malathion. L'utilisation de synergistes associés au malathion ainsi que la métabolisation "in vitro" nous ont montré que la résistance spécifique au malathion est liée à la dégradation en acide malathion monocarboxylique et en acide malathion dicarboxylique par des carboxylestérases.

Nous avons caractérisé les estérases et leurs activités vis-à-vis d'un substrat chromogène (l'acétate d' α -naphthyle) chez les deux souches de *Tribolium castaneum*; l'activité estérasique est plus faible chez les individus résistants de *Tribolium castaneum* que chez les individus sensibles. Ces résultats laissent supposer qu'une ou plusieurs estérases, présentant une moins bonne affinité à l'égard de l'acétate d' α -naphthyle, posséderai(en)t une activité catalytique importante vis-à-vis du malathion chez les individus résistants. Toutefois, l'électrophorèse PAGE en conditions non dénaturantes a permis de montrer que les estérases ayant une activité catalytique à l'égard de l'acétate d' α -naphthyle, ne dégradent pas le malathion. Chez les deux

souches, il existe une autre carboxylestérase qui hydrolyse spécifiquement le malathion (MC_{ase}).

Notre travail expérimental nous a donc poussé à purifier cette MC_{ase} et à étudier ses caractéristiques biochimiques. Nous avons isolé une MC_{ase} chez les deux souches. Bien que les deux protéines possèdent un poids moléculaire de l'ordre de 52 KDa pour la souche PR_m et la souche As_m en analyse SDS-PAGE; le point isoélectrique est respectivement de $7,1 \pm 0,12$ et de $6,8 \pm 0,07$. Il ne s'agit donc pas de protéines semblables.

L'étude des paramètres de l'équation de LINEWEVEAR-BURK laisse apparaître également des différences entre les deux enzymes; la MC_{ase} présente un pouvoir catalytique plus important et une meilleure affinité vis-à-vis du malathion chez la souche résistante que chez la souche sensible, alors que le phénomène inverse s'observe à l'égard de l'acétate d' α -naphthyle. La carboxylestérase présente chez la souche résistante, aurait subi une (ou des) modification(s) qualitative(s) lui permettant de dégrader préférentiellement le malathion par rapport à d'autres substrats comme l'acétate d' α -naphthyle.

L'expression de cette protéine proviendrait d'une ou plusieurs mutation(s) ponctuelle(s) d'un gène codant pour la MC_{ase} présente chez la souche sensible ou pour une autre estérase.

BIBLIOGRAPHIE