

Utilisation de *Bacillus thuringiensis* en protection des cultures et résistance des insectes

Vincent Sanchis, Josette Chaufaux, Didier Lereclus

Les plantes cultivées font l'objet, à très grande échelle, de nombreux traitements phytosanitaires. Cependant, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime que plus d'un quart de la production végétale mondiale est détruit chaque année avant récolte et qu'environ 10 % supplémentaires sont perdus au cours du stockage. Les insectes phytophages sont responsables d'une partie importante de ces pertes, soit directement en tant que consommateurs primaires, soit indirectement en tant que vecteurs de maladies parasitaires des plantes.

Actuellement, la lutte contre les insectes ravageurs repose essentiellement sur l'utilisation d'insecticides organiques de synthèse dont l'efficacité et le faible coût de production ont favorisé l'utilisation à grande échelle. L'usage de ces substances pose cependant un certain nombre de problèmes :

– la plupart de ces produits présentent une certaine toxicité pour l'homme, les animaux domestiques, le gibier et certains insectes pollinisateurs comme les abeilles ;

– leur absence de biodégradabilité favorise leur accumulation dans des milieux naturels ;

– leur manque de sélectivité conduit parfois à une destruction presque totale de la faune entomologique non cible dans la zone des cultures traitées.

Un autre problème extrêmement préoccupant est celui de l'apparition rapide d'insectes résistants à ces substances. En 1989, la FAO recensait plus de cinq cent cinquante espèces d'arthropodes devenues résistantes à un ou plusieurs produits phytosanitaires et dix-sept espèces devenues résistantes à toutes les familles d'insecticides actuellement commercialisées. Par ailleurs, l'étude, la mise au point puis la formulation de nouveaux produits de substitution (qui doivent être à la fois moins rémanants, moins toxiques et plus spécifiques pour répondre aux nouvelles normes et réglementations) s'avèrent de plus en plus coûteuses et difficiles. Tous ces éléments font que, à plus ou moins long terme, cette méthode de lutte contre les insectes nuisibles pourrait être remise en cause. C'est dans ce contexte qu'est né le concept dit de « lutte intégrée » qui, compte tenu du milieu et de la dynamique des populations considérées, tente d'harmoniser l'utilisation des méthodes chimiques et biologiques en vue de contrôler les populations de ravageurs.

Nous traiterons ici de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) qui est la bactérie entomopathogène la plus largement utilisée comme biopesticide dans la protection des végétaux et, plus récemment, dans la lutte contre certains insectes diptères vec-

teurs de maladies humaines (paludisme, fièvre jaune, onchocercose). L'objectif de cette synthèse est de faire le point sur l'utilisation de *Bt* en protection des cultures et d'aborder le problème de l'apparition d'insectes résistants à ce biopesticide. Dans une première partie, nous présenterons différents aspects de la biologie de ce micro-organisme entomopathogène, en mettant l'accent sur la variété et le mode d'action des toxines insecticides produites par la bactérie. Nous ferons ensuite une description de l'utilisation de *Bt* en protection des cultures et nous analyserons les principaux cas de résistance à *Bt* qui ont été sélectionnés en laboratoire ou qui sont apparus dans la nature. Nous terminerons en définissant les stratégies d'utilisation de ce bio-insecticide susceptibles de retarder l'apparition d'insectes résistants.

Bacillus thuringiensis : un réservoir naturel d'insecticides

La bactérie

Bacillus thuringiensis est une bactérie du sol, sporulante, Gram-positive et aérobie facultative. Au cours du processus de sporogénèse, elle synthétise une inclusion parasporale de nature protéique (souvent appelée cristal). Le rôle de

V. Sanchis, D. Lereclus : Unité de biochimie microbienne, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

V. Sanchis, J. Chaufaux, D. Lereclus : Station de recherches de lutte biologique, Inra, La Minière, 78285 Guyancourt cedex, France.

Tirés à part : V. Sanchis (Institut Pasteur)

l'inclusion cristalline dans l'activité entomopathogène de *B. thuringiensis* fut établi en 1954 par Angus [1] qui montra que l'inclusion purifiée était toxique pour des larves de lépidoptères. Pendant plusieurs années, l'espèce *Bt* fut considérée comme regroupant des bactéries toxiques uniquement pour les larves de lépidoptères. En 1977 puis en 1983, deux nouvelles souches (*Bt israelensis* et *Bt tenebrionis*) furent isolées et caractérisées; elles étaient respectivement actives contre les larves de diptères et de coléoptères. Ces nouvelles potentialités insecticides suscitèrent un regain d'intérêt pour la bactérie et de nombreux programmes de recherches furent entrepris de par le monde; environ 50 000 souches de *Bt* ont ainsi été isolées à partir de différentes sources (insectes, sols, plantes, etc.) d'origines géographiques variées.

Certaines de ces souches ont été répertoriées et classifiées au Centre collaborateur OMS de recherche et de référence (Unité des bactéries entomopathogènes, Institut Pasteur, Paris) où, sur la base de leurs caractères biochimiques et de leurs antigènes flagellaires, elles ont été regroupées en quarante-cinq sérotypes. Cependant, cette classification ne reflète pas le pathotype de la souche, essentiellement défini par les protéines insecticides appelées δ -endotoxines qui constituent le ou les cristaux synthétisés par les bactéries. En effet, *Bt* produit généralement plusieurs types de δ -endotoxines. Ce sont donc la présence et l'expression simultanées de plusieurs types de gènes et les multiples combinaisons possibles qui déterminent le spectre d'activité insecticide d'une souche donnée.

Bt se multiplie de façon végétative jusqu'à ce que le milieu devienne carencé pour l'un des nutriments essentiels. La bactérie entre alors en phase stationnaire et s'engage dans un processus qui aboutit à la formation de spores. Les δ -endotoxines sont toujours produites pendant la phase stationnaire, de façon concomitante à la sporulation. Elles s'accumulent dans la cellule mère pour former un cristal qui, en fin de sporulation, peut représenter environ 25 % du poids sec de la bactérie (photo 1).

Les δ -endotoxines, diversité et mode d'action

Depuis 1981, date à laquelle le premier gène de δ -endotoxine a été cloné [2], on

Summary

The use of *Bacillus thuringiensis* in crop protection and the development of pest resistance

V. Sanchis, J. Chaufaux, D. Lereclus

The paper discusses the use of the entomopathogenic bacteria Bacillus thuringiensis (Bt) in crop protection and the development of resistance to Bt-based products. First, we present an overview of the biology of Bt and of the mode of action of its insecticide toxins. Several examples of the use of Bt as biological control agent are described, and the following aspects of resistance to Bt are discussed: 1) laboratory and field selection of Bt-resistant insects; 2) genetics, stability and fitness cost of resistance; and 3) cross resistance and mechanisms of resistance to Bt- δ -endotoxins. Finally, based on our present knowledge of the mode of action of δ -endotoxins, the physiology of the toxin's biological target and the genetics and mechanisms of resistance, we describe several possible management strategies for delaying resistance development.

*The crystal inclusions produced by Bt (photo 1) are made of insecticidal proteins (also called δ -endotoxins or Cry proteins) that are stomach poisons. After proteolytic activation in the insect midgut, they cause lysis of the midgut epithelial cells. δ -endotoxins have been classified into 14 major classes and a simplified classification of Bt toxins is shown in table 1. The high insect-specificity of these toxins has been correlated with the presence of specific receptors in the midgut of susceptible insects. Insecticide products based on Bt are now widely used in agriculture, forestry and human health for eliminating disease vectors. However, although Bt has been used for more than 30 years, there have been only a few documented cases (always involving the diamondback moth, *Plutella xylostella*) of Bt resistance in the field. In contrast, several researchers have successfully selected resistance to Bt in laboratory experiments (table 2). Bioassays on the progeny from crosses between resistant and susceptible insects and backcross data suggest that, in most cases, resistance to Bt is primarily controlled by one or a few genes and is autosomally inherited (table 3). The most common mechanisms of resistance found seem to be receptor modification. In two cases, however, insects exhibiting cross-resistance to Bt toxins have been selected. This highlights the urgent need to design a Bt resistance management programme to prevent resistance from arising in the field. Moreover, recent advances in biotechnology, in particular the transfer of δ -endotoxin genes into transgenic plants (photo 2), may increase the risk of resistance. When Bt is used in sprays, resistance management programmes – using pesticide rotation, combined with a reduced number of treatments, and resistance monitoring – are generally thought to be promising approaches to control resistance. In the case of transgenic plants, a useful recommendation could be to engineer plants to produce Bt toxins only in tissues prone to insect attack, and to create refuge areas allowing susceptible insects to survive, reproduce and possibly mate with resistant insects, thereby converting their offspring into susceptible heterozygotes.*

Cahiers Agricultures 1995 ; 4 : 405-16.

peut estimer qu'une cinquantaine de gènes de δ -endotoxines ont été clonés à partir de différentes souches de *Bt*. Ces gènes sont généralement localisés sur des plasmides conjugatifs [3] et inclus dans des structures composées d'éléments transposables [4]. On peut penser que ces deux caractéristiques permettent, en partie, d'expliquer la diversité des gènes de δ -endotoxines et leur dissémination et/ou leur brassage au sein de l'espèce. Une telle flexibilité de l'information génétique est le reflet d'une grande capacité adaptative où les gènes de δ -endotoxines jouent certainement un rôle important pour la survie de l'espèce. La détermination de la séquence nucléotidique des gènes de δ -endotoxines a permis de classer les toxines (désignées protéines Cry) en fonction de leur degré d'homologie. Le *tableau 1* représente la classification des δ -endotoxines les mieux caractérisées. Bien que très simplifiée (on distingue en effet aujourd'hui quatorze classes de toxines), cette classification reflète l'étonnante diversité des toxines insecticides trouvées dans l'espèce *Bt*.

Cette diversité moléculaire est assez bien corrélée avec la diversité du spectre d'activité des différentes toxines. En effet, les protéines d'un même groupe (I, II, III...) sont généralement actives contre les insectes appartenant à un même ordre, mais ce n'est toutefois pas une règle absolue. De plus, à l'intérieur d'un même groupe, on rencontre une importante variété de toxines qui n'ont pas nécessairement le même spectre d'activité insecticide. Toutes les protéines CryI sont toxiques pour les lépidoptères ; en revanche, seule la protéine CryIC a une forte toxicité contre certains lépidoptères du genre *Spodoptera* [5]. Le mode d'action ainsi que la spécificité des activités insecticides des protéines Cry commencent à être connus. La dissolution des cristaux puis l'activation des δ -endotoxines (qui sont en fait des protéines) par les protéases intestinales des insectes sensibles constituent le premier facteur délimitant le spectre d'activité de ces protéines. Une fois activées, les δ -endotoxines se fixent sur des récepteurs spécifiques présents à la surface des cel-



Photo 1. *Bacillus thuringiensis*, spores et cristaux protéiques à activité insecticide (cliché Institut Pasteur, Paris).

Photo 1. *Bacillus thuringiensis*, spores and crystals with insecticidal activity.

Tableau 1

Classification des δ -endotoxines de *B. thuringiensis*

Classe	δ -endotoxines		Insectes sensibles	Souches de <i>B. thuringiensis</i> (exemples)	Structure des cristaux
		Taille (kDa)			
I	A B C D E F	130-140	Lépidoptères	<i>kurstaki</i> <i>berliner</i> <i>entomocidus</i> <i>aizawai</i> <i>kenyae</i>	bipyramidale
II	A	71	Diptères et Lépidoptères	<i>kurstaki</i>	cubique
	B	71	Lépidoptères	<i>kurstaki</i>	
III	A B	68-73	Coléoptères	<i>tenebrionis</i>	rhomboédrique
IV	A B	125-145	Diptères	<i>israelensis</i>	sphérique
V	A	81	Lépidoptères et Coléoptères	<i>kurstaki</i>	bipyramidale
	Cyt	26-28	Diptères (activité cytolytique non spécifique)	<i>israelensis</i>	sphérique

Classification of *B. thuringiensis* δ -endotoxins

lules épithéliales [6]. La corrélation entre la diversité moléculaire des δ -endotoxines et leur spectre d'hôte repose essentiellement sur la présence de ces récepteurs spécifiques chez l'insecte cible. La phase qui suit la liaison de la toxine à son récepteur et l'éventuelle contribution du récepteur à la toxicité n'ont pas été élucidées. Il est toutefois généralement admis que la toxine agit par cytolysse osmo-colloïdale consécutive à la formation de pores dans les cellules intestinales [7]. Il semble donc que les δ -endotoxines peuvent être classées parmi les toxines bactériennes qui ne nécessitent pas une internalisation pour être actives. Dans le cas de la toxine CryIC, il a toutefois été fait mention d'un mécanisme d'action pouvant faire intervenir un phénomène de signalisation intracellulaire consécutif à la fixation de la toxine sur son récepteur. L'activation d'un second messager permettrait de recruter des canaux à calcium qui stimuleraient l'entrée de cet ion dans les cellules. Cette entrée de calcium a pu être corrélée avec une activation progressive de canaux anioniques perméables aux ions Cl⁻ [8]. Pour les auteurs, c'est cette activité qui est à l'origine de l'afflux d'eau dans les cellules et qui, à terme, provoque la lyse cellulaire. Il faut cependant noter que ces données ont été obtenues *in vitro* sur cultures de cellules d'insecte et qu'elles ne reflètent pas nécessairement le mode d'action des δ -endotoxines *in vivo*.

Par ailleurs, il a été démontré que les récepteurs des δ -endotoxines sont situés à la surface des microvillosités qui ornent la membrane apicale (ou bordure en brosse) des cellules de l'intestin moyen des larves. Ces cellules sont séparées de la lumière du tube digestif par une membrane péritrophique qui agit à la manière d'un filtre enveloppant le bol alimentaire et empêchant les particules imparfaitement solubilisées de venir au contact des microvillosités apicales. Chez certains lépidoptères, elle ne peut être traversée que par des particules ou des polypeptides de diamètre inférieur à 7 ou 8 nanomètres, ce qui est le cas uniquement de la toxine activée. Au niveau physiologique, l'intoxication se manifeste par une paralysie quasi immédiate du tube digestif qui entraîne une cessation de prise de nourriture. Cette paralysie est suivie par une destruction rapide et presque totale de l'épithélium intestinal. Il y a alors communication entre l'hémolymphe et la cavité intestinale, aboutissant à une

diminution du pH intestinal. Ceci permet aux spores, qui ont été ingérées en même temps que le cristal, de germer et aux cellules végétatives issues de cette germination de se multiplier dans le cadavre de l'insecte.

En 1991, la structure tridimensionnelle de la δ -endotoxine de type CryIIIa a été déterminée [9]. Elle comporte trois domaines distincts : un premier domaine semble posséder une conformation lui permettant de s'insérer dans la membrane cytoplasmique. Un autre domaine contient les régions de la molécule les moins conservées parmi cette famille de protéines (régions hypervariables) et ressemble au domaine de liaison à l'antigène chez les immunoglobulines. Cette partie de la molécule est responsable de l'interaction toxine/récepteur et donc de la spécificité des δ -endotoxines. La principale caractéristique du troisième domaine concerne l'extrémité carboxyterminale de la protéine qui est enfouie au centre de cette structure, donc très peu accessible aux protéases, de sorte que cette région pourrait être impliquée dans la stabilité des δ -endotoxines dans l'intestin des insectes après activation. L'ensemble des informations fournies par la résolution de la structure tridimensionnelle d'une δ -endotoxine suggère que les δ -endotoxines sont susceptibles de former des pores dans la membrane qui pourraient provoquer une perturbation des échanges ioniques aboutissant à la lyse cellulaire.

B. thuringiensis : un biopesticide de plus en plus utilisé

Place et importance de B. thuringiensis dans la lutte contre les chenilles défoliatrices et dans la lutte antivectorielle

En 1992, le marché mondial des insecticides foliaires était estimé à 2,5 milliards de dollars. Une partie de ce marché (environ 880 millions de dollars) est accessible à *Bt* car elle concerne des ravageurs sensibles à cette bactérie.

Cette même année, les ventes de produits à base de *Bt* se sont élevées à 86 millions de dollars (soit 10 % du secteur concerné). Ces données ne représentent que l'aspect commercial de *Bt* et ne rendent pas compte de l'importance de l'utilisation de *Bt* dans le monde. Les données concernant l'utilisation de *Bt* dans les pays d'Europe de l'Est, de l'ex-Union Soviétique ou en Chine sont encore peu nombreuses, mais cette bactérie y serait produite et utilisée à grande échelle (1 200 tonnes de *Bt* auraient été produites en 1994 en Chine et plus d'un million d'hectares y seraient traités chaque année avec du *Bt*) [10]. Dans les pays de l'ex-Union Soviétique, environ 3 millions d'hectares seraient traités annuellement à l'aide d'insecticides bactériens, dont *Bt* est l'une des composantes majeures [11]. En Europe centrale, 20 000 à 100 000 hectares de forêts sont protégés chaque année à l'aide de produits à base de *Bt* et, dans de nombreuses provinces canadiennes, *Bt* est maintenant le seul insecticide autorisé. Ainsi en 1990, au Canada, 60 % des zones traitées (soit environ 700 000 hectares) l'ont été à l'aide de *Bt* [12]. Dans d'autres pays, comme la Malaisie ou la Thaïlande, *Bt* reste le seul produit encore efficace pour contrôler *Plutella xylostella* qui est devenu résistant à tous les autres insecticides actuellement commercialisés. Enfin, *Bt* est utilisé avec succès, depuis de nombreuses années, dans le cadre du programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Ce programme de très grande ampleur, qui s'étend maintenant à onze pays, permet de traiter chaque année, à un rythme hebdomadaire, environ 18 000 kilomètres de rivières. En 1988, sur un total de 923 000 litres d'insecticides utilisés dans le cadre de ce programme, environ 750 000 litres étaient à base de *Bt* [13].

Quelques exemples d'utilisation

• En forêts

En 1971, en France, 670 hectares de mélèzes ont été traités à l'aide d'une seule pulvérisation de spores-cristaux de *Bt* pour lutter contre la tordeuse grise du mélèze *Zeiraphera diniana*. L'application a été faite alors que les insectes étaient au 3^e stade larvaire et que les dégâts n'étaient pas encore apparents. L'efficacité

té immédiate du traitement a pu être chiffrée aux alentours de 80 %, ce qui a eu pour effet de maintenir la population de tordeuse en dessous du seuil de nuisance [14].

En Amérique du Nord, *Bt* est utilisé à une toute autre échelle : ainsi de 1985 à 1988, près de 2,9 millions d'hectares de forêt ont été traités avec différentes formulations de *Bt* contre *Choristoneura pinus pinus*, la tordeuse des bourgeons de l'épinette (épicéa) (1 856 248 ha), *Choristoneura fumiferana*, la tordeuse du pin gris (836 171 ha), *Lymantria dispar*, le bombyx disparate (157 297 ha) et *Lambdina fiscellaria*, l'arpenreuse de la pruche (35 756 ha). De bons résultats sont obtenus si l'application aérienne est faite au moment opportun au cours du cycle de l'insecte et si les conditions atmosphériques après la pulvérisation sont favorables [15].

• En vignoble et arboriculture

En Suisse, des essais ont été réalisés en microparcelles de vigne pour lutter contre les tordeuses. Plusieurs produits formulés ont été utilisés, en ajoutant ou non une solution sucrée aux suspensions bactériennes, en comparaison avec le parathion. L'efficacité (mortalité) sur *Lobesia botrana* (eudémis) et sur *Eupoecilia ambiguella* (cochylis) a été la suivante : *Bt* Delfin® : 97 %, MVP® : 94 %, Turex® : 89 %, Bactec1® : 85 %, parathion : 96 %. Les deux premiers produits ont montré une efficacité semblable à celle du parathion ; la solution sucrée améliore les résultats [16].

En Tunisie, en 1983-1984, des essais en petites parcelles et à grande échelle ont également été menés sur la 3^e génération de *Prays oleae* (la teigne de l'olivier), avec *Bt* (Bactospéine®), le diflubenzuron et la deltaméthrine. Si l'efficacité du traitement avec cette dernière a été importante et immédiate (100 %), la mortalité avec *Bt* (50 %) et avec le diflubenzuron (21 %) s'est poursuivie pendant un laps de temps plus long jusque dans la génération suivante, suite au maintien des parasites naturels. Il faut noter que les ravageurs, au moment du traitement, étaient aux 4^e et 5^e stades larvaires [17].

• En grandes cultures

Des traitements contre *Heliothis armigera* ont été réalisés sur cotonnier, en Israël, lors d'une très forte infestation de ce lépidoptère en 1985 (32 larves par rangée de 2 m). *Bt* s'est bien comporté

par rapport à un insecticide chimique et, après 5 jours, la population du ravageur a été ramenée à quatre à huit larves par rangée de 2 mètres dans les deux cas, avec l'avantage pour le biopesticide de préserver les ennemis naturels du ravageur. [18].

• En cultures maraîchères

Une comparaison de l'efficacité, du prix de revient et des bénéfices entre un programme insecticide par lutte chimique classique et par *Bt* a été réalisée au Mexique, sur culture de tomates au cours des années 1992 et 1993.

Les dommages dus à trois espèces de ravageurs principaux (*Keiferia lycopersicella* (lépidoptère), *Helicoverpa zea* (lépidoptère) et *Macrosiphum euphorbiae* (hyménoptère) furent réduits dans les parcelles traitées avec *Bt*, mais les bénéfices bruts furent légèrement inférieurs à ceux des parcelles traitées avec le méthomyl et la perméthrine. Cependant, le nombre de traitements du programme *Bt* fut inférieur à celui du programme de lutte chimique (4 contre 9 en 1992 et 3 contre 7 en 1993). Le coût des traitements est donc beaucoup plus bas avec *Bt*, notamment en ce qui concerne la main d'œuvre et l'eau. Les bénéfices nets sont relativement proches pour les deux modes de traitement. De plus, selon les auteurs, d'autres bénéfices sont attendus, à plus long terme, en utilisant le programme de lutte avec *Bt* :

- réduction du tassement du sol par des passages moins fréquents d'engin de pulvérisation ;
- réduction substantielle de la contamination de l'environnement ;
- avantages potentiels dans la commercialisation des fruits produits ;
- utilisation de produits moins toxiques pour les mammifères [19].

• En lutte anti-vectorielle

Sous l'égide de l'OMS, plus de 2 millions de litres de préparations de *Bt israelensis* (*Bti*) ont été utilisés entre 1981 et 1988, en Afrique de l'Ouest, pour lutter contre un complexe de huit espèces de mouches noires, appelé « complexe *Simulium damnosum* », vectrices d'*Onchocerca volvulus*. Dans certaines régions, ces espèces étaient devenues résistantes aux insecticides organophosphorés et pyréthrinoides. La mortalité des mouches noires dans les régions traitées avec *Bti* a été équivalente à celle dans les régions traitées avec d'autres produits chimiques actifs [20].

En Chine, en 1980, 8,4 kilomètres carrés (dont 282,5 hectares de rizières et 24 633 m³ d'eau polluée) ont été traités avec *Bti*. Les traitements ont provoqué 90 % de mortalité chez les moustiques des rizières et 76 % chez les moustiques des eaux polluées ; les cas de malaria ont été réduits significativement dans le même temps [21]. D'autres exemples de traitements effectués en Chine sont rapportés par Becker et Margalit [13]. Depuis quelques années, 10 tonnes de *Bti* sous forme liquide ont été pulvérisées sur 12 000 hectares. Grâce à ces applications et à des pulvérisations de *Bacillus sphaericus*, le nombre de moustiques par personne et par heure est passé de 8 ou 9 en 1986 à 3,7 en 1987, 2 en 1988 et 1,3 en 1989 ; les personnes contaminées par la malaria sont passées de 5,6 pour 10 000 en 1986 à 2,1 en 1987, 1,6 en 1988 et 0,8 en 1989.

Enfin, entre 1981 et 1991 dans la Haute Vallée du Rhin en Allemagne, environ 50 000 hectares ont été traités avec 23 tonnes de poudre mouillable et 19 000 litres de liquide concentré contenant du *Bti* pour lutter contre les moustiques. La population de moustiques a été réduite de 90 % [13]. D'après ces auteurs, d'autres campagnes de traitement de grande envergure ont été amorcées au cours de ces mêmes années aux États-Unis et en Europe, notamment en Espagne, France, Hongrie, Italie, Russie, Slovaquie, Suisse, Tchécoslovaquie et Yougoslavie.

Différents aspects de la résistance à *B. thuringiensis*

Les cas de résistance à *B. thuringiensis*

La résistance aux insecticides est un phénomène extrêmement répandu chez les invertébrés. Elle repose sur une variabilité génétique de la population qui permet aux individus les mieux adaptés de survivre, lorsque les conditions environnementales changent, et donc à l'espèce de se perpétuer. Les vitesses d'apparition ou d'évolution de la résistance peuvent varier d'une espèce à l'autre en fonction de facteurs génétiques (fréquence initiale ou nombre des allèles [gènes] de résistan-

ce dans la population, dominance ou récessivité du caractère de résistance), physiologiques (fécondité de l'espèce, nombre de générations annuelles, monogamie ou polygamie, etc.) ou écologiques (monophagie ou polyphagie, espèce migratoire ou non, etc.).

La résistance à un insecticide se traduit par une diminution de la sensibilité de la population suite à l'apparition d'individus devenus tolérants aux doses qui, normalement, sont létales. Elle se détecte à l'aide de tests toxicologiques de mesure de l'efficacité de l'insecticide. La mesure la plus couramment utilisée est la dose létale 50 (DL50) qui correspond à la dose d'insecticide nécessaire pour tuer 50 % de la population traitée. Elle peut être déterminée en traçant la courbe correspondant au pourcentage de mortalité obtenue pour des doses croissantes d'insecticide. Pour un insecticide donné, une population peut donc être caractérisée par sa courbe de mortalité et sa DL50. Le facteur de résistance est défini comme étant le rapport entre la DL50 de la population « résistante » et la DL50 de la population de référence.

Le premier cas de résistance aux δ -endotoxines de *Bt* décrit dans la littérature

concerne la sélection en laboratoire d'une population du lépidoptère *Plodia interpunctella* pour la résistance à Dipel®, un produit commercial formulé à partir d'une souche de *Bt* du sérotype *kurstaki* [22]. La résistance acquise était de 100 fois en quinze générations et les insectes sélectionnés provenaient de silos à grains où ils avaient déjà été exposés à *Bt* avant la sélection en laboratoire. D'autres cas ont été décrits et la résistance à *Bt* concerne maintenant dix espèces de lépidoptères appartenant à quatre familles (Noctuidae, Pyralidae, Plutellidae et Tortricidae), deux espèces de coléoptères (Chrysomelidae) et trois espèces de diptères (Culicidae et Muscidae). Parmi ces quinze espèces, huit seulement (cinq lépidoptères, deux coléoptères et un diptère) ont développé des résistances supérieures à 10 par rapport à des populations sensibles non sélectionnées en laboratoire (tableau 2).

Le premier cas de résistance à *Bt* apparu dans la nature, sur l'île d'Hawaï, a été rapporté en 1990. Il concerne *Plutella xylostella*, la teigne des crucifères, et le niveau de résistance observé, après plus de cinquante pulvérisations de Dipel® en plein champ, était de l'ordre de 25 à 30

fois [36]. Depuis cette date, d'autres cas de résistance concernant cette même espèce sont apparus en Floride, dans l'État de New York, aux Philippines, en Thaïlande et en Malaisie [31]. Au Japon, une résistance, de l'ordre de 700 fois, de *P. xylostella* à une préparation commerciale formulée à partir d'une souche du sérotype *kurstaki* a été mise en évidence en serre [37].

Jusqu'en 1992, tous les articles concernant la résistance à *Bt* indiquaient une sélectivité par rapport aux différentes δ -endotoxines ou souches de *Bt*. Une souche de *P. interpunctella* résistante au sérotype *kurstaki* de *Bt* restait sensible à vingt et un isolats appartenant à cinq autres sérotypes [38]. Une population de *P. xylostella* ayant acquis un niveau de résistance de plus de 200 fois à Dipel® (qui contient les toxines CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIIA et CryIIB) restait totalement sensible à CryIC et CryIB [39]. Une description détaillée des principaux cas de résistance à *Bt* est présentée dans le tableau 3. Le premier cas de résistance croisée a été observé en 1992 [46]. Une population d'*Heliothis virescens*, sélectionnée pour sa résistance à la toxine CryIA(c) (R = 50 après 17

Tableau 2

Sélection au laboratoire d'insectes résistants à différentes δ -endotoxines de *B. thuringiensis*

Insectes	Toxines ou souches de <i>Bt</i> utilisées	Nombre de générations sélectionnées	Pression de sélection (% mortalité)	Résistance acquise	Références
Lépidoptères					
<i>Plodia interpunctella</i>	<i>Bt kurstaki</i>	15	50	100	[22]
<i>Cadra cautella</i>	<i>Bt kurstaki</i>	21	70-90	7	[23]
<i>Anagasta kühniella</i>	<i>Bt</i> « Anduze »	7	50	1	[24]
<i>Homosoma electum</i>	<i>Bt kurstaki</i>	11	50	1,7	[25]
<i>Heliothis virescens</i>	CryIA(b)	14	70-90	24	[26]
<i>Spodoptera exigua</i>	CryIC	21	70-90	100	[27]
<i>Spodoptera littoralis</i>	CryIC	14	90	> 50	[28]
<i>Trichoplusia ni</i>	CryIA(b)	7	70	1,4	[29]
<i>Plutella xylostella</i>	<i>Bt kurstaki</i>	9	45	66	[30]
<i>Choristoneura fumiferana</i>	<i>Bt sotto</i>	8		3,8	
Coléoptères					
<i>Chrysomela scripta</i>	CryIIIA	24	–	> 50	[31]
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Bt San Diego</i>	12	99	60	[32]
Diptères					
<i>Aedes aegypti</i>	<i>Bt israelensis</i>	14	50	1,1	[33]
<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Bt israelensis</i>	120	90	16	[34]
<i>Musca domestica</i>	<i>Bt thuringiensis</i>	25	–	6	[35]

Laboratory selection for insect resistance to *B. thuringiensis* δ -endotoxins

Tableau 3

Caractéristiques de la résistance des insectes aux δ -endotoxines de *B. thuringiensis*

Insectes	Toxines ou souches de <i>B. thuringiensis</i> responsables de la sélection	Facteur de résistance	Résistance croisée	Caractéristiques de la mutation qui confère la résistance	Références
<i>Plodia interpunctella</i> (laboratoire)	Dipel® (formulation commerciale contenant CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIIA et CryIIB)	Si pression de sélection faible : 150 x Si pression de sélection forte : > 250 x	Pas de résistance croisée avec CryIC et sensibilité à CryI Caugmentée d'un facteur 10	Stable, partiellement récessive, autosomale, monogénique. L'affinité de la toxine pour le récepteur (Kd) est diminuée de 50 x, la concentration en récepteurs reste inchangée	[22, 23, 6]
<i>Plutella xylostella</i> (terrain puis laboratoire)	Javelin® (formulation commerciale contenant les mêmes δ -endotoxines que Dipel®)	30 x			[36]
<i>Plutella xylostella</i> (terrain + laboratoire)	Dipel®	1 800 à 6 800 x à Dipel® variable pour CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c) et CryIIA testées individuellement	3 x pour <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Aizawai</i> (contenant CryIA(a), CryIA(b), CryIC, CryID). Sensibilité inchangée pour CryIC	Réversible, lorsque la pression de sélection est interrompue	[40-42]
<i>Plutella xylostella</i> (terrain + laboratoire)	Dipel®	> 200 x	Sensibilité inchangée pour CryIC et CryIB	La toxine ne se fixe plus sur son récepteur spécifique	[39]
<i>Heliothis virescens</i> (terrain + laboratoire)	CryIA(b) pendant 13 générations, puis Dipel® pendant 4 générations, puis de nouveau CryIA(b) pendant 4 générations	57 x pour Dipel® 16 x pour CryIA(c) 70 x pour CryIA(b)		Autosomale, partiellement dominante pour CryIA(b), codominante ou partiellement récessive pour CryIA(c). Probablement polygénique pour CryIA(b). La résistance décroît de 67 x à 13 x après 5 générations sans pression de sélection. L'affinité de la toxine pour ses récepteurs est diminuée de 4 x pour CryIA(c) et de 2 x pour CryIA(b). La concentration en récepteur est augmentée de 4 x pour CryIA(c) et de 6 x pour CryIA(b)	[43-45]
<i>Heliothis virescens</i> (terrain + laboratoire)	CryIA(c)	50 x après 17 générations	CryIA(b) 13 x CryIIA 53 x De plus, la lignée résistante se développe plus rapidement que la lignée sensible, si élevée sur du milieu contenant CryIA(a), CryIB ou CryIC	L'affinité de la toxine pour son récepteur et la concentration en récepteur restent inchangées chez la lignée résistante	[46]
<i>Trichoplusia ni</i> (laboratoire)	CryIA(b)	31 x en 7 générations	Pas de résistance croisée pour CryIA(a) ou CryIA(c)	CryIA(c) et CryIA(b) semblent se fixer sur le même récepteur malgré l'absence de résistance croisée à CryIA(c)	[47]
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (terrain + laboratoire)	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> contenant CryIIIA	200 x en 29 générations		Autosomale, partiellement dominante, probablement polygénique. La résistance décroît de 200 x à 48 x après 5 générations sans pression de sélection puis se stabilise à ce niveau	[48]
<i>Plodia interpunctella</i> (terrain + laboratoire)	<i>Entomocidus</i> HD 198 contenant CryIA(a), CryIA(b), CryIC et CryID	6 x pour CryIC 13 x pour CryIA(b)	128 x pour CryIA(c)	L'activité protéolytique est diminuée d'environ 5 x. Le produit final d'activation est de taille légèrement supérieure à celui de la lignée sensible (65 à 80 kDa au lieu de 61 à 63 kDa)	[49]

Characteristics of insect resistance to *B. thuringiensis* δ -endotoxins

génération), présentait une résistance croisée à CryIA(b) et CryIIA. Un autre cas de résistance croisée a été mentionné en 1994 et concerne une lignée de *Spodoptera littoralis* qui, sélectionnée pour sa résistance à CryIC (R > 50 en 14 générations), présentait également une résistance croisée avec les toxines CryIE et CryID [28].

Génétique de la résistance

L'étude du déterminisme génétique du mécanisme de résistance aux insecticides consiste principalement à déterminer le nombre de facteurs impliqués dans la résistance, le mode de transmission de la résistance (dominance, récessivité, autosomale ou lié au sexe), sa stabilité en absence de pression de sélection et le coût biologique de l'acquisition de la résistance.

Une telle étude ne peut être abordée que si l'on dispose d'une population composée d'individus homozygotes pour le ou les gènes de résistance. Dans le cas d'une mutation qui confère la résistance à un insecticide (R), un individu pourra être porteur soit de deux exemplaires du gène R (homozygote RR), soit de deux exemplaires du gène S (homozygote SS), soit d'un exemplaire de chaque (hétérozygote RS). Les modes de transmission de la résistance, dominance ou récessivité, autosomale ou non, ainsi que le nombre de gènes impliqués peuvent généralement être déduits des courbes de mortalité obtenues sur une population (F1) issue du croisement de populations homozygotes sensibles et résistantes, ainsi que des rétrocroisements (F1 x population résistante).

Peu d'informations sont disponibles quant au déterminisme génétique de la résistance à *Bt* chez les insectes. Les premières études auraient été réalisées sur des populations qui n'étaient pas entièrement composées d'individus homozygotes et sont donc parfois difficiles à interpréter. La résistance à *Bt* d'une population d'*H. virescens* serait contrôlée par plusieurs facteurs, serait à prédominance autosomale avec quelques facteurs impliqués liés au sexe et dépendrait de l'endotoxine utilisée pour la sélection [50]. Chez *P. interpunctella*, la résistance serait plus ou moins récessive et contrôlée par un seul facteur [22, 23]. Dans une autre étude concernant *H. virescens*, la résistance de cet insecte à CryIA(b) serait autosomale, incomplètement dominante et contrôlée par plu-

sieurs facteurs génétiques, ce qui lui confère un caractère instable [44]. Enfin, la résistance d'une population de *P. xylostella* à une formulation commerciale de *Bt* serait liée à un seul ou quelques rares gènes partiellement récessifs [37].

La stabilité de la résistance et son maintien à travers les générations en absence de pression de sélection dépendent principalement du degré de dominance du gène de résistance (la dominance ou la récessivité est rarement totale) et du « coût » biologique de l'acquisition de la résistance. Plusieurs études indiquent que, lorsque la pression de sélection cesse, la résistance décroît très rapidement [23, 44], ce qui suggère que ces populations comportaient encore une proportion d'individus hétérozygotes et/ou homozygotes (SS) et que le gène qui confère la résistance a été dilué au cours des générations sans sélection. L'une des causes probables de l'instabilité de la résistance des insectes à *Bt* tient au fait que l'acquisition de la résistance se traduit par une diminution de leur potentiel biotique (fécondité ou fertilité moins grande). En absence de pression de sélection, les individus sensibles ou hétérozygotes se reproduisent donc plus, en moyenne, que les individus résistants et leur proportion augmente de génération en génération. D'autres travaux indiquent cependant une stabilité de la résistance : celle de *P. interpunctella* à Dipel® (R = 60) ne diminue pas après vingt-neuf générations sans sélection [23]. De façon moins significative, la résistance d'*H. virescens* à la toxine CryIA(b) (R = 24 en 14 générations) est maintenue pendant deux générations sans sélection [43].

En ce qui concerne le coût biologique de l'acquisition de la résistance à *Bt*, les résultats montrent là encore une très grande variabilité de la réponse des différentes populations sélectionnées. Chez *P. xylostella*, une souche résistante à Dipel® a une fertilité et une fécondité significativement inférieures à celles d'une souche sensible, alors que la durée de développement larvaire, le pourcentage de survivants de l'œuf à l'adulte (en dehors de tout traitement) et le poids des chrysalides ne sont pas significativement différents [51]. Gould et Anderson [52] n'observent pas de différence significative dans le pourcentage de survie et le poids des larves entre une souche sensible et une souche résistante d'*H. virescens*. Enfin, chez une souche de *S. littoralis*

résistante à CryIC, il n'a pas été noté de différence significative avec une population sensible quant au poids des chrysalides, au temps de développement larvaire et au sex-ratio au cours de la sélection [28].

Les facteurs biochimiques et les mécanismes de résistance à *B. thuringiensis*

L'efficacité d'un insecticide dépend en grande partie de la quantité d'insecticide qui atteint sa cible moléculaire. Elle est donc modulée par les différents facteurs qui contribuent à limiter ou à réduire les quantités d'insecticide présentes dans l'insecte. Parmi ces facteurs, on peut notamment citer :

- la vitesse de pénétration de l'insecticide (qui peut varier d'un insecte à l'autre) ;
- la variété et/ou la quantité des protéines de piègeage ou de détoxification susceptibles de fixer et/ou de métaboliser l'insecticide ;
- la vitesse d'élimination (excrétion) de l'insecticide avant ou après métabolisation (ou plus généralement le temps de séjour de l'insecticide sous forme active dans l'insecte) ;
- le nombre et l'affinité des molécules cibles (récepteurs) présentes chez l'insecte.

Dans la plupart des cas, ce sont des modifications qualitatives ou quantitatives d'une ou de plusieurs de ces protéines qui rendent certains insectes moins sensibles à l'insecticide.

Concernant le mode d'action des δ -endotoxines, il apparaît que la solubilisation des cristaux ingérés puis l'activation par protéolyse des molécules de protoxine constituent deux étapes nécessaires pour conférer aux δ -endotoxines leur activité insecticide. L'analyse de la séquence peptidique de la région carboxy-terminale des δ -endotoxines, qui est éliminée au cours de la protéolyse, révèle que cette partie de la molécule contient presque tous les résidus cystéine de la protéine impliqués dans la formation de ponts disulfures entre les δ -endotoxines et, donc, dans la formation du cristal [53]. Le pH élevé et les conditions réductrices qui règnent dans l'intestin de la plupart des insectes sensibles semblent par conséquent nécessaires pour déstabiliser les liaisons ioniques et rompre les ponts disulfures intermoléculaires. Un premier mécanisme possible de résistance

aux δ -endotoxines pourrait consister en une modification du pH ou des capacités réductrices prévalant dans l'intestin des larves, ce qui empêcherait la dissolution des cristaux. Ceux-ci seraient alors simplement éliminés lors du transit intestinal. Une variation dans la quantité ou la spécificité des enzymes protéolytiques qui altérerait l'activation des δ -endotoxines est également envisageable. Le poids moléculaire d'une molécule de protoxine non activée ou imparfaitement activée serait alors trop élevé pour lui permettre de traverser la membrane péritrophique. En fait, un tel mécanisme a été récemment mis en évidence chez une population de *P. interpunctella* [49], où la résistance semble être liée à un défaut d'activation des protoxines par les protéases de l'insecte.

Une autre étape essentielle du mécanisme d'action des δ -endotoxines concerne la fixation des toxines activées sur leurs récepteurs spécifiques. Jusqu'en 1992, tous les articles publiés sur la résistance des insectes à *Bt* indiquaient une sélectivité de la résistance par rapport aux différentes δ -endotoxines. C'est pourquoi un mécanisme de résistance par modification des récepteurs a été privilégié et plus particulièrement recherché dans plusieurs cas de résistance. Des expériences de fixation de toxines radiomarquées sur des vésicules intestinales, préparées à partir de cellules à bordure en brosse provenant d'intestins prélevés sur différentes lignées d'insectes sensibles ou résistants, ont été réalisées. Elles ont permis de montrer que, dans la plupart des cas, la résistance était bien due à une modification du nombre ou de l'affinité des récepteurs pour la toxine [6, 39]. Ces travaux ont également révélé que la plupart des insectes possédaient plusieurs récepteurs distincts reconnus par différentes δ -endotoxines. Ces résultats expliquent pourquoi, dans certains cas, des insectes devenus résistants à une δ -endotoxine demeurent sensibles à une autre δ -endotoxine se fixant sur un récepteur différent.

En 1992, il a été mis en évidence une résistance croisée à plusieurs toxines de *Bt* sans modification de la fixation, de l'affinité ou du nombre de récepteurs à ces toxines [46]. Ce résultat indique que des mécanismes de résistance non spécifique, autres que ceux déjà décrits, sont possibles. À ce jour, le mécanisme de résistance mis en œuvre dans ce cas particulier n'a toujours pas été élucidé. Un mécanisme de résistance intervenant à

l'une des étapes ultérieures à la fixation des toxines sur leurs récepteurs (insertion de la toxine dans les cellules épithéliales et formation du pore) est envisageable mais n'a pas encore été exploré faute de pouvoir disposer des outils nécessaires à ce type d'étude. Enfin, un mécanisme de résistance par modification du comportement ou des habitudes alimentaires de l'insecte est également possible ; il a été recherché sans succès dans un cas de résistance à *Bt* [54].

L'ensemble de ces données semble indiquer que le mécanisme de résistance le plus fréquent concerne la modification de la cible. Cependant, deux mécanismes de résistance non spécifique, dont l'un par modification du processus d'activation des δ -endotoxines par protéolyse, ont également été identifiés. L'existence de mécanismes de résistance, conférant aux insectes une résistance croisée à de nombreuses δ -endotoxines, doit nous inciter à mettre en œuvre rapidement des stratégies permettant de prévenir ou de retarder leur apparition dans la nature. L'élaboration de ces stratégies devra nécessairement s'appuyer sur les connaissances acquises ou à venir concernant l'identification des mécanismes biochimiques et génétiques de la résistance.

Stratégies permettant de contrôler l'apparition de la résistance

La résistance à *Bt*, un phénomène encore rare dans la nature

Comme le confirment les nombreuses tentatives réussies de sélection au laboratoire d'insectes résistants à *Bt* (tableau 2), de très nombreuses espèces entomologiques possèdent les capacités de développer une résistance à ce micro-organisme. Bien que *Bt* soit utilisé en agriculture depuis plus de 30 ans, les cas décrits de développement de populations d'insectes résistants à *Bt* dans la nature sont cependant rares. On peut penser que cette absence apparente de sélection naturelle d'insectes résistants tient aux faits suivants :

– les souches de *Bt* utilisées dans les préparations commerciales contiennent plu-

sieurs gènes codant pour des δ -endotoxines différentes, et la plupart des espèces d'insectes sensibles posséderaient plusieurs récepteurs distincts fixant ces différentes δ -endotoxines ;

– l'utilisation massive et systématique de *Bt* en agriculture est encore exceptionnelle, de sorte que la pression de sélection ne serait encore ni trop forte ni soutenue ;

– les δ -endotoxines sont rapidement inactivées par la lumière ultraviolette et donc les produits à base de *Bt* sont très peu rémanants.

Cependant, dans un cas où deux de ces conditions n'étaient pas réunies, le développement d'une population naturelle de *Plutella xylostella* résistante à *Bt* Dipel® a été observé [36]. La combinaison de plusieurs phénomènes permettrait d'expliquer l'apparition de cette résistance :

– l'intensité de la pression de sélection exercée (les champs ont été traités 50 à 100 fois en l'espace de 5 ans) ;

– bien que la souche de *Bt* HD1 (Dipel®) produise cinq δ -endotoxines différentes (CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIIA et CryIIB), seuls des récepteurs à CryIA(b) et à deux autres toxines, CryIB et CryIC, qui ne sont pas produites par la souche HD1 (Dipel®), ont été mis en évidence chez *P. xylostella* [39] ;

– les traitements ont eu lieu dans des conditions agronomiques relativement « fermées » où les échanges génétiques avec d'autres populations étaient limités, favorisant le développement rapide d'une population génétiquement homogène pour la résistance.

Ces observations donnent une première indication de ce que pourrait être une stratégie efficace d'utilisation de *Bt* en pulvérisations insecticides, afin de retarder l'apparition d'insectes résistants. Tout d'abord, il conviendrait d'utiliser des préparations à base de *Bt* contenant plusieurs δ -endotoxines dont il a été démontré qu'elles reconnaissent plusieurs récepteurs distincts présents chez l'insecte cible. Une autre recommandation importante serait de limiter le nombre d'applications, ce qui aurait pour avantage, non seulement de diminuer la pression de sélection, mais aussi de permettre à une partie de la population d'échapper à la sélection, préservant ainsi des homozygotes sensibles qui pourront diluer les gènes de résistance [55]. Les autres recommandations qui peuvent être avancées concernent l'alternance des traitements à base de *Bt* avec

d'autres pesticides et la constitution de zones refuges indemnes de tout traitement [55]. Il faut cependant souligner que la plupart de ces stratégies relèvent encore du domaine des hypothèses, de modèles théoriques et/ou de simulations. Leur validation au laboratoire dans un premier temps, sur le terrain ensuite, devra confirmer leur fiabilité.

Les plantes transgéniques exprimant les toxines insecticides de *Bt*

Les récents progrès sur la génétique de *Bt* ainsi que les possibilités nouvelles offertes par le génie génétique permettent la construction de micro-organismes et de plantes génétiquement transformés pour leur faire exprimer des gènes codant pour les δ -endotoxines (photo 2). On peut penser que l'utilisation à l'échelle agronomique de tels organismes recombinés accroîtra sensiblement le risque d'apparition d'insectes résistants aux δ -endotoxines de *Bt*. On peut déjà citer, à titre d'exemple, l'encapsulation des toxines de *Bt* dans des bactéries tuées à l'aide d'un procédé physicochimique. Ce procédé (MVP, breveté par la société Mycogen) permet d'améliorer sensiblement l'efficacité des δ -endotoxines. Le cristal est en effet protégé de la dégradation, mais l'augmentation de sa persistance accroît d'autant la pression de sélection. Toutefois, le risque le plus important semble être lié à l'exploitation agronomique de plantes cultivées génétiquement transformées pour exprimer les δ -endotoxines. Aujourd'hui, les plantes

transgéniques de première génération ne contiennent généralement qu'un seul gène de δ -endotoxine sous le contrôle d'un promoteur constitutif, s'exprimant dans toutes les parties de la plante. La commercialisation et l'utilisation de ces plantes à grande échelle vont créer, vis-à-vis des populations cibles, une pression de sélection continue et forte qui risque de conduire à l'apparition rapide de populations d'insectes résistants. La principale stratégie que l'on peut préconiser pour minimiser ce risque est de limiter la pression sélective exercée par la culture de telles plantes. Une première option consisterait à placer le gène de *Bt* sous contrôle de promoteurs spécifiques des tissus, limitant ainsi l'expression des toxines aux parties de la plante exposées à l'attaque [56]. Une autre possibilité est d'utiliser des promoteurs inductibles n'assurant l'expression des gènes de toxines qu'au moment de la manifestation des dégâts (exemple : promoteurs inductibles par une blessure) [56]. La création de zones refuges à différents niveaux, permettant la survie d'individus sensibles, reste bien entendu, dans le cas des plantes transgéniques, une stratégie de choix pour le contrôle de la résistance [55, 57]. Pour les insectes polyphages, des zones refuges existent déjà naturellement ; elles devraient permettre de maintenir la fréquence des gènes de résistance à un niveau relativement faible. Pour les insectes monophages ou pour les plantes qui seront cultivées à très grande échelle en monoculture, l'utilisation de mélanges de graines ayant intégré ou non les gènes de δ -endotoxine peut être envisagée [57]. Il serait également possible

d'effectuer des rotations culturales avec d'autres plantes ou avec la même plante non transgénique [56, 57]. Enfin, l'intégration dans les plantes de plusieurs gènes codant pour des toxines différentes est également envisageable. Cette approche permettrait de se rapprocher de la situation naturelle caractéristique des souches de *Bt* qui expriment plusieurs types de toxines mais présente cependant le risque de favoriser l'apparition des résistances croisées.

Conclusion

La prise de conscience que la lutte chimique n'est pas la panacée en matière de contrôle des populations de ravageurs et qu'elle dégrade l'environnement incite à privilégier des pratiques culturales préservant davantage les ressources naturelles. L'un des avantages de la lutte chimique sur la lutte biologique reste cependant sa simplicité et sa rapidité d'intervention en traitements curatifs. À cette approche interventionniste, la lutte biologique oppose un concept plus global qui vise à maintenir un équilibre entre ravageurs et antagonistes, afin de maintenir la population de ravageurs en deçà d'un seuil économique. Dans la réalité cependant, sa mise en pratique ne va pas de soi car elle est encore mal acceptée par les utilisateurs pour qui l'élimination complète des ravageurs reste un critère de choix. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, les programmes de phytoprotection évoluent plutôt vers une harmonisation de l'utilisation de pesticides chimiques et d'agents de lutte biologique dans le cadre de programmes de lutte intégrée. Le succès de *Bt* tient certainement au fait qu'il combine certains des avantages des deux types de lutte : une grande innocuité pour l'environnement tout en pouvant être utilisé à la manière d'un insecticide chimique (spécifique et non rémanent) en traitements curatifs à effet rapide. On peut cependant craindre qu'une utilisation accrue et non raisonnée de *Bt* en protection des cultures et, surtout, la culture à échelle agronomique de plantes exprimant un ou plusieurs gènes de δ -endotoxines ne provoquent rapidement l'apparition d'insectes résistants. Ceci aboutirait à priver la panoplie (de plus en plus réduite) de molécules utilisables comme pesticides d'un outil de lutte biologique précieux. Ce risque doit nous inciter à poursuivre et à intensifier les



Photo 2. Les gènes codant pour des toxines de *Bacillus thuringiensis* peuvent être introduits dans les plantes. Le tabac transgénique (à gauche) a été protégé des dégâts provoqués par les insectes ravageurs (cliché Inra, Versailles).

Photo 2. Genes coding for *Bacillus thuringiensis* toxins may be introduced into plants. This transgenic tobacco (left) was protected from insect pest damage.

recherches sur l'utilisation de *Bt* en protection des cultures en privilégiant les aspects suivants :

– approfondir les études concernant les mécanismes de résistance afin d'être en mesure de la maîtriser ou de la contourner, ce qui implique une connaissance précise du mode d'action des toxines et de leur interaction avec les récepteurs des insectes ;

– valider sur le terrain les différentes stratégies susceptibles de limiter ou de retarder l'apparition de populations d'insectes résistants ;

– concevoir puis mettre en œuvre les méthodologies permettant de détecter la résistance aussitôt qu'elle apparaît, afin de prendre le plus rapidement possible les mesures pouvant empêcher son extension ;

– enfin, face à l'augmentation prévisible de l'utilisation de *Bt*, il est important d'approfondir nos connaissances sur l'écologie de *Bt* et, notamment, d'étudier sa persistance dans le sol, son incidence vis-à-vis des populations bactériennes indigènes et d'évaluer les risques de transferts horizontaux des gènes codant pour les δ -endotoxines ■

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Christine Dugast pour le temps qu'elle a consacré à la mise en page de ce manuscrit.

Références

1. Angus TA. A bacterial toxin paralysing silk-worm larvae. *Nature* 1954 ; 173 : 54-6.

2. Schnepf HE, Whiteley HR. Cloning and expression of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 2893-7.

3. González JM Jr, Brown BJ, Carlton BC. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 79 : 6951-5.

4. Lereclus D, Ribier J, Klier A, Menou G, Lecadet MM. A transposon-like structure related to the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Embo J* 1984 ; 3 : 2561-7.

5. Sanchis V, Lereclus D, Menou G, Chaufaux J, Lecadet MM. Multiplicity of δ -endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol Microbiol* 1988 ; 2 : 393-404.

6. Van Rie J, McGaughey WH, Johnson DE, Barnett BD, Van Mellaert H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 1990 ; 24 : 72-4.

7. Knowles BH, Dow JAT. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* : models for their mechanism of action on the insect gut. *Bio Essays* 1993 ; 15 : 469-76.

8. Schwartz JL, Garneau L, Masson L, Brousseau R. Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* : involvement of calcium and anionic channels. *Biochem Biophys Acta* 1991 ; 1065 : 250-60.

9. Li J, Carroll J, Ellar DJ. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 1991 ; 353 : 815-21.

10. Xie T, Xu B. Production and large-scale use of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* in Hubei, People's Republic of China. In : *11nd International Conference on Bacillus thuringiensis*. Montpellier : 28 Aug.-2 Sept. 1994 : 495.

11. Salama HS, Morris NO. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In : Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, eds. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide : theory and practice*. Chistester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore : Wiley & Sons, 1993 : 237-53.

12. Frankenhuyzen K (Van). The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In : Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, eds. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide : theory and practice*. Chistester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore : Wiley & Sons, 1993 : 1-35.

13. Becker N, Margalit J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In : Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, eds. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide : theory and practice*. Chistester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore : Wiley & Sons, 1993 : 147-70.

14. Martouret D, Auer C. Effets de *Bacillus thuringiensis* chez une population de tordeuse grise du mélèze, *Zeiraphera diniana* (Lep. : Tortricidae) en culmination gradologique. *Entomophaga* 1977 ; 22 : 37-44.

15. Frankenhuyzen K (Van), Ortiz F. 30 ans de recherche sur *Bacillus thuringiensis* donnent des résultats. *Bull de l'Institut pour la répression des ravageurs forestiers* 1990 ; 9 : 1-35.

16. Charmillot PJ, Pasquier D, Antonin P, Mittaz C. Lutte contre les vers de la grappe eudémis et cochylis au moyen de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) : résultats de 1991. *Revue Suisse Vitic Arboric Hort* 1992 ; 24 : 109-16.

17. Jardak T, Ksantini M. Essais de lutte contre la génération phyllophage de *Prays oleae* par *Bacillus thuringiensis* et le diflubenzuron. *Bull OEPP* 1986 ; 16 : 403-6.

18. Broza M. Seasonal changes in population of *Heliothis armigera* (Hb.) (Lepidoptera ; Noctuidae) in cotton fields in Israel and its control with a *Bacillus thuringiensis* preparation. *J Appl Ent* 1986 ; 102 : 363-70.

19. Trumble JT, Carson WG, White KK. Economic analysis of a *Bacillus thuringiensis*-based Integrated-Pest-Management program in fresh-market tomatoes. *J Econ Entomol* 1994 ; 87 : 1463-9.

20. Guillet P, Kurtak DC, Philippon B, Meyer R. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for Onchocerciasis control in West Africa. In : De Barjac H, Sutherland DJ, eds. *Bacterial control of mosquitoes and blackflies*. London : Unwin Hyman, 1990 : 187-201.

21. Ziniu Y, Longsheng Y. Large-scale field evaluation of larvicidal preparation of *Bacillus thuringiensis* H-14 for mosquito control in town

and rural environment in China. *Bull Soc Vector Ecol* 1990 ; 15 : 189-95.

22. McGaughey WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 1985 ; 229 : 193-5.

23. McGaughey WM, Beeman RW. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indian-meal moth and almond moth (Lepidoptera : Pyralidae). *J Econ Entomol* 1988 ; 81 : 28-33.

24. Yamvrias C. Contribution à l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-à-vis de la teigne de la farine *Anagasta (Ephestia) kuhniella* Zeller (Lepidoptère). *Entomophaga* 1962 ; 7 : 101-59.

25. Brewer GJ. Resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in the sunflower moth (Lepidoptera : Pyralidae). *Environ Entomol* 1992 ; 20 : 316-22.

26. Stone TB, Sims SR. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera : Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* 1993 ; 86 : 989-94.

27. Moar WJ. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua*. *Annu Meet Soc Invertebr Pathol* 26th, 1993 : 41 (Abstr.).

28. Müller-Cohn J, Chaufaux J, Buisson C, Gilois N, Sanchis V, Lereclus D. *Spodoptera littoralis* resistance to the *Bacillus thuringiensis* CryIC toxin and cross-resistance to other toxins. In : *11nd International Conference on Bacillus thuringiensis*. Montpellier : 28 Aug.-2 Sept. 1994 : 66 (Abstr.).

29. Ferré J, Estada U. Toxicity basis and mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* : the *Trichoplusia ni* model. In : *11nd International Conference on Bacillus thuringiensis*. Montpellier : 28 Aug.-2 Sept. 1994 : 194-6 (abstract).

30. Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* : lesson from the diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). *J Econ Entomol* 1991 ; 84 : 49-55.

31. Tabashnik BE. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* 1994 ; 39 : 47-79.

32. Whalon ME, Miller DL, Hollingworth RM, Grafius EJ, Miller JR. Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera : Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* 1993 ; 86 : 226-33.

33. Goldman IF, Arnold J, Carlton BC. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Invertebr Pathol* 1986 ; 47 : 317-24.

34. Georghiou GP. Resistance potential to biopesticides and consideration of countermeasures. In : Casida JE, ed. *Pesticides and alternatives*. New York : Elsevier Science, 1990 : 409-20.

35. Wilson BH, Burns EC. Induction of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a laboratory strain of house flies. *J Econ Entomol* 1968 ; 61 : 1747-8.

36. Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson MW. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). *J Econ Entomol* 1990 ; 83 : 1671-6.

37. Hama H, Suzuki K, Tanaka H. Inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* formulations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera : Yponomeutidae). *Appl Entomol Zool* 1992 ; 27 : 355-62.

38. McGaughy WM, Johnson DE. Indian meal moth (Lepidoptera : Pyralidae) resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* 1987 ; 85 : 1594-600.
39. Ferré J, Réal MD, Van Rie J, Jansens S, Peferoen M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in midgut membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5119-23.
40. Tabashnik BE, Finson N, Chilcutt CF, Cushing NL, Johnson MW. Increasing efficiency of bioassays : evaluating resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). *J Econ Entomol* 1993 ; 86 : 635-44.
41. Shelton AM, Robertson JL, Tang JD, et al. Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *J Econ Entomol* 1993 ; 86 : 697-705.
42. Tabashnik BE, Finson N, Groetters FR, et al. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4120-4.
43. Stone TB, Sims SR, Marrone PG. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically *Pseudomonas fluorescens* containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Invert Pathol* 1989 ; 53 : 228-34.
44. Sims SR, Stone TB. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Invert Pathol* 1991 ; 57 : 206-10.
45. McIntosh SC, Stone TB, Jokerst RS, Fuchs RL. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 8930-3.
46. Gould F, Martinez-Ramirez A, Anderson A, Ferré J, Silva FJ, Moar WJ. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 7986-90.
47. Estada U, Ferré J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of Cabbage. Looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl Environ Microbiol* 1994 ; 60 : 3840-6.
48. Rahardja U, Whalon M. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* CryIIIa δ -endotoxin in Colorado Potatoe Beetle (Coleoptera : Chrysomelidae). *J Econom Entomol* 1995 ; 88 : 21-6.
49. Oppert B, Kramer K, Johnson DE, MacIntosh SE, Mc Gaughy WH. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 193 : 940-7.
50. Marrone PG, McIntosh SC. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. In : Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, eds. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide : theory and practice*. Chischester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore : Wiley & Sons, 1993 : 221-35.
51. Groeters FR, Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Evolution* 1994 ; 48 : 197-201.
52. Gould F, Anderson A. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae). *Environ Entomol* 1991 ; 20 : 30-8.
53. Fast PG. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In : Burgess HD, ed. *Microbiol control of pest and plant diseases, 1970-1980*. London : Academic Press, 1981 : 223-48.
54. Schwartz JM, Tabashnik BE, Johnson MW. Behavioral and physiological responses of susceptible and resistant diamondback moth larvae to *Bacillus thuringiensis*. *Entomol Exp Appl* 1991 ; 61 : 179-87.
55. Roush RT. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol Today* 1993 ; 9 : 174-9.
56. Gould F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. *Bio Science* 1988 ; 38 : 26-33.
57. Roush RT. Designing resistance management programs : how can you choose? *Pestic Sci* 1989 ; 26 : 423-41.

Résumé

Bacillus thuringiensis (*Bt*) est une bactérie du sol, sporulante, Gram-positive et aérobie facultative dont la principale caractéristique est de synthétiser, pendant la sporulation, une inclusion cristalline composée de protéines ayant des propriétés insecticides. L'importante diversité de ces toxines, leur efficacité et leur production relativement peu coûteuse font de *Bt* le biopesticide le plus largement utilisé dans le monde. En agriculture, il permet de lutter contre de nombreux ravageurs de cultures, essentiellement des larves de lépidoptères et de coléoptères. En santé humaine, il permet de contrôler efficacement les populations de plusieurs diptères vecteurs de maladies.

Une utilisation croissante de toxines de *Bt* en tant que biopesticide et, surtout, l'exploitation de plantes génétiquement transformées pour exprimer des toxines de *Bt* incitent à s'interroger sur le risque de sélectionner des insectes résistants. Le principal objectif de cette synthèse est de faire le point sur la résistance des insectes à *Bt*. Au vu des connaissances actuelles sur les mécanismes biochimiques et génétiques de la résistance, les risques d'évolution de la résistance et les moyens à mettre en œuvre afin de retarder son apparition sont discutés.
