

Polymorphisme des estérases et résistance aux insecticides chez un homoptère

Cacopsylla pyri (L.) (Homoptera : Psyllidae)
esterase polymorphism and insecticide resistance

ROBERT BUÈS, JEAN-FRANÇOIS TOUBON, RENÉ RIEUX, FRANÇOIS FAIVRE D'ARCIER

INRA, Station de Zoologie-Apidologie, 84143 Montfavet Cedex, France.

RÉSUMÉ

L'analyse électrophorétique des estérases, chez le psylle du poirier (*Cacopsylla pyri* (L.)), fait apparaître la présence de deux estérases bien différenciées à forte activité. Leurs gradients de répartition montrent l'existence d'un flux génique entre populations. Les DL50 sont respectivement pour l'azymphos-méthyl et la deltaméthrine de 4 et 7 fois plus élevées pour la population d'Avignon que pour celle d'Angers et le taux de synergie du DEF de 2 et 5 fois. Des fluctuations saisonnières de l'activité des estérases et de sensibilité à l'azymphos-méthyle sont observées dans la population d'Avignon. Les résultats étayent l'hypothèse d'une liaison entre l'activité des estérases et la résistance aux insecticides. ▲

Mots clés : électrophorèse, activité estérasique, DL50, variabilité géographique, variabilité saisonnière.

ABSTRACT

The electrophoretic analysis of esterases in pear psylla elicits the presence of 2 well differentiated esterases with high activity. Their geographic distribution gradients show the existence a genetic flow between populations. LD50 for azymphos-methyl and deltamethrin are respectively 4 and 7 times higher for the population of Avignon than for Angers and the synergistic action of DEF 2 and 5 times. Seasonal fluctuations of esterases activity and of susceptibility to azymphos-methyl have been observed within the Avignon population. Our results support the hypothesis of a link between esterases activity and insecticide resistance. ▲

Key words : electrophoresis, esterase activity, LD50, geographic variability, seasonal variability.

Abridged version (see p. 1120)

En 1986 Georgiou [1] recensait environ 450 espèces d'arthropodes résistantes aux insecticides, et ce nombre s'est très vraisemblablement accru. Le coût d'une nouvelle molécule insecticide, les risques de contaminations pour l'environnement exigent la détection précoce des résistances. Parmi les mécanismes répertoriés [2], l'augmentation de la détoxification par des estérases est couramment observée. Chez les aphides (*Myzus persicae*) et les moustiques (*Culex* spp.), une haute activité estérasique correspond à une surproduction des protéines en relation avec une augmentation du nombre de copies du gène codant pour ces enzymes [3, 4]. Depuis plusieurs années, en Amérique du Nord, *Cacopsylla*

pyricola Foerster est résistant aux organo-phosphorés et aux pyréthrinoides [5]. Plus récemment, cette résistance a été associée à une augmentation de la détoxification et à une diminution de la pénétration des molécules au travers de la cuticule [6].

Notre étude réalisée en France, sur *Cacopsylla pyri* L., analyse la différence de sensibilité aux insecticides et la capacité de dispersion de l'espèce, au travers de la répartition géographique d'un polymorphisme des estérases, exprimé par des loci avec une forte activité.

Matériel et méthodes

Les récoltes de psylles

Dans les vergers, elles sont effectuées au stade adulte, soit par frappage pendant la période de repos végétatif, soit par aspiration sur le feuillage durant la période estivale.

Note présentée par Constantin Vago.

Note remise le 13 juin 1994, acceptée après révision le 7 novembre 1994.

Correspondance : R. Buès.

Les adultes réservés aux analyses sont stockés à -70°C . Les 11 localités de prélèvements sont représentées sur la Figure 1.

L'analyse enzymatique

Elle est réalisée sur gels d'amidon [7] à la concentration de 13 % avec un tampon tris citrate pH 6,3 [8]. Chaque individu est broyé dans 15 μl de tampon (tris 14,5 mM, acide borique 0,9 mM, EDTA 0,1 mM et 1 mM de bleu de bromophénol). Les substrats utilisés sont l' α - et le β -naphthyl acétate, à la concentration de 1 mM diluée dans l'acétone. Les gels sont colorés avec du fast garnet GBC à 0,1 %. Selon les individus, 1 ou 2 zones avec une forte activité sont observées (Fig. 2); l'une à migration lente se colore en brun foncé, elle est notée A, l'autre plus rapide se colore en brun rougeâtre, elle est notée B. Dans ce dernier cas, les taches avec une forte activité se superposent avec une zone de faible activité à plusieurs allèles, difficilement identifiables, présente chez tous les individus et se colorant également en rouge.

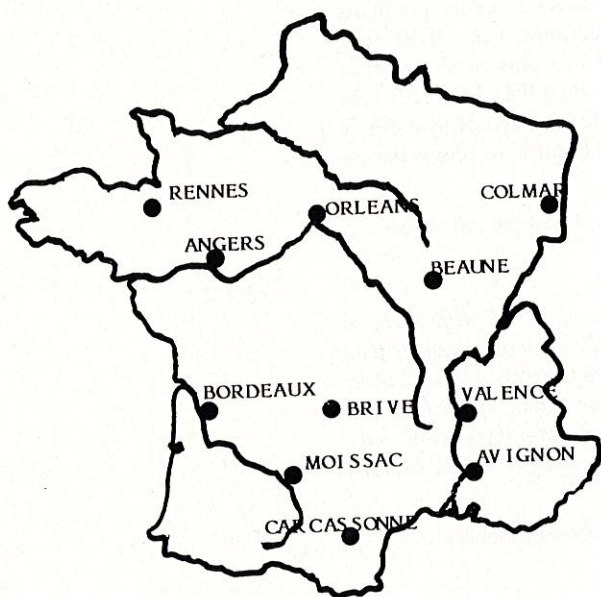


Figure 1. Répartition géographique des sites de prélèvements des échantillons de psylles du poirier.

L'activité estérasique totale

Elle est mesurée par colorimétrie [9]. Vingt-cinq psylles adultes, mâles et femelles en nombre égal à un individu près, sont broyées ensemble dans 250 μl de tampon phosphate de sodium (TPS) (0,02 M, pH 6,5) auquel est ajouté 0,1 % de triton X100. Le broyat est centrifugé 15 min à 10 000 g; 50 μl de surnageant sont prélevés et dilués dans 1 ml de TPS. Puis 30 μl de cette solution diluée sont ajoutés à 795 μl de TPS et 75 μl de solution substrat. Cette dernière est constituée de 20 mg de α -naphthyl acétate dissous dans 1 ml d'acétone et complétée à 15 ml avec du TPS. L'incubation a lieu à 25°C pendant 30 min à l'issue de laquelle on ajoute 100 μl de solution de coloration [75 mg de fast blue BB dans 16,5 ml d'eau distillée et 8,5 ml de sulfate dodécyl de sodium (SDS à 10 %)]. Après 15 min, l'absorbance est

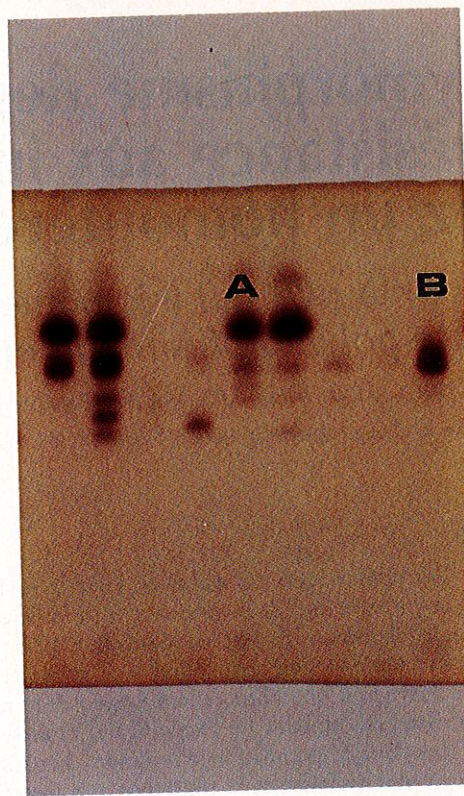


Figure 2. Morphes électrophorétiques d'individus provenant de la région de Bordeaux. A désigne l'estérase colorée par l' α -naphthyl acétate, B l'estérase colorée à la fois par l' α - et β -naphthyl acétate, qui se superpose en partie avec un locus variable coloré par le β -naphthyl acétate.

lue au spectrophotomètre à 600 nm. Cinq répétitions de chaque broyat sont réalisées. La quantité de protéines contenues dans chaque broyat est mesurée par colorimétrie et exprimée en μg par psylle [10]. L'activité estérasique est exprimée en μmoles par min de α -naphthyl acétate hydrolysé, par μg de protéines.

L'activité estérasique par individu

Elle est mesurée suivant la technique du test de papier filtre [11]. La lecture des taches est effectuée à l'aide d'un densitomètre (Ultroscan XL). L'activité est exprimée en densité optique. Vingt-quatre à 48 individus sont analysés par test.

Les tests insecticides

Ils sont réalisés, sauf précision dans le texte, de fin octobre à début janvier lorsque la population adulte est en diapause reproductive, regroupée à un même stade de son cycle de développement. Les tests sont réalisés par application topique de 0,5 μl par psylle, à l'aide d'une microseringue. Quatre répétitions de 10 individus sont effectuées par test, chaque test étant répété 3 à 5 fois. Les adultes traités sont disposés dans des tubes en verre (H=7 cm, D=1 cm), contenant un rectangle de papier filtre. Trois formulations commerciales sont utilisées (les formulations commerciales diluées dans une solution alcoolisée à 40 % sont préférées aux produits techniques, qui nécessitent généralement une dissolution dans l'acétone, toxique pour les adultes de psylles). Elles sont choisies dans

3 familles d'insecticides, organo-phosphorés (azymphos-méthyle), pyréthrinoides (deltaméthrine) et carbamates (méthomyl), qui ont été ou sont encore utilisées pour la protection des vergers de poiriers. Un inhibiteur des estérases, le *s,s,s*-tributylphosphorotrithioate (DEF) est utilisé à la dose sublétales de 100 mg/l, par application topique de 0,5 µl/psylle, 4 h avant le traitement avec l'insecticide.

Le contrôle de la mortalité a lieu 24 h après le traitement. Sont considérés comme morts les adultes qui n'ont plus la capacité de marcher. La mortalité est analysée en unités log-probit à l'aide d'un logiciel [12]. L'effet synergisant du DEF est mesuré par le rapport (SR), supérieur à l'unité, entre la DL50 en l'absence de DEF et la DL50 avec DEF ; un effet antagoniste se traduit par un rapport inférieur à l'unité.

Résultats

Variabilité géographique

Dans le *Tableau I* sont indiqués, pour chaque population, les pourcentages d'individus qui présentent les estérases A ou B. On note également qu'un pourcentage d'individus, variable selon les populations, soit ne présente aucune des deux estérases, soit présente simultanément les deux. Dans la région d'Avignon, les individus présentent uniquement l'estérase A ; au contraire, c'est l'estérase B qui est la seule représentée à Rennes. A Orléans et Angers, on observe une très forte majorité d'individus avec l'estérase B, avec cependant un faible pourcentage de A. Aucune des populations analysées n'est exempte simultanément des deux estérases. Leur distribution dans les différentes localités semble indiquer des axes de dispersion. L'un nord/sud, à partir des localités du Nord-Ouest, figuré par les populations de Rennes à Carcassonne ; l'autre est/ouest,

Tableau I

Pourcentages d'adultes de *C. pyri* avec l'estérase A (lents), l'estérase B (rapides) ou nuls, dans différentes populations

Populations	n	Pourcentage d'adultes avec estérase			
		A	B	Nuls	A et B ⁽¹⁾
Rennes	24	0	75,0	25,0	/
Angers	196	6,6	87,2	10,7	4,6
Orléans	24	12,5	100	0	12,5
Brive	48	25,0	18,8	54,2	/
Bordeaux	54	37,0	35,2	44,4	16,7
Carcassonne	72	51,4	0	48,6	/
Moissac	42	64,3	2,4	35,7	2,4
Colmar	39	59,0	51,3	12,8	23,1
Beaune	23	91,3	0	8,7	/
Valence	48	93,8	0	6,2	/
Avignon	174	96,0	0	4,0	/

⁽¹⁾ Pourcentage d'individus avec estérases A et B.

moins marqué (il manque des points de prélèvements), mais cependant vraisemblable, à partir des localités du Sud-Est, entre Avignon et Bordeaux.

Si l'on considère les populations d'Avignon et de Carcassonne, prélevées en décembre 1993, l'activité estérasique, exprimée en µmoles de α-naphthyl acétate hydrolysé par min par µg de protéines, est respectivement de $0,266 \pm 0,003$ et $0,131 \pm 0,004$; elle correspond avec la différence de pourcentages d'individus présentant l'estérase A.

Activité enzymatique entre générations

Dans le *Tableau II* est indiquée l'activité moyenne des estérases, en fonction des dates de prélèvements en 1993-1994, dans la population d'Avignon. L'activité est maximale en octobre-novembre, au début de la période de diapause reproductive, elle décroît par la suite avec un minimum en mai, suivi d'une remontée des valeurs dès le mois de juin. Ces résultats sont étayés par l'analyse par individu (*Fig. 3*) qui montre d'une part la différence d'activité entre dates de prélèvement, d'autre part la variabilité intrapopulation, notamment pour le prélèvement de juin. Des résultats similaires sont observés en 1993 où le prélèvement de mai présente, comme pour juin 1992, un fort étalement des densités optiques. On remarque que, parallèlement, la quantité de protéines varie à l'inverse de l'activité des estérases, avec un minimum en octobre et un maximum en mai. Notons que la fluctuation saisonnière de l'activité des estérases est observée au

Tableau II

Protéines totales (PT) et activité estérasique, observées sur des lots d'adultes prélevés à différentes dates en 1993-1994, dans la région d'Avignon*

Date du prélèvement	Protéines ⁽¹⁾	Estérases ⁽²⁾
12/5	$79,6 \pm 7,2$ cd	$0,103 \pm 0,003$ a
9/6	$60,1 \pm 2,2$ b	$0,192 \pm 0,007$ bc
3/7	$63,7 \pm 3,7$ b	$0,187 \pm 0,005$ b
10/8	$57,8 \pm 4,4$ b	$0,211 \pm 0,007$ bcd
21/9	$51,9 \pm 1,2$ b	$0,280 \pm 0,006$ f
26/10	$39,7 \pm 7,0$ a	$0,440 \pm 0,007$ h
23/11	$74,2 \pm 8,7$ bcd	$0,325 \pm 0,004$ g
22/12	$68,7 \pm 5,3$ bc	$0,260 \pm 0,004$ e
4/1	$68,3 \pm 4,8$ bc	$0,201 \pm 0,004$ bc
24/1	$79,3 \pm 8,5$ cd	$0,178 \pm 0,006$ b
16/2	$75,9 \pm 9,3$ cd	$0,192 \pm 0,003$ bc
9/3	$70,7 \pm 3,2$ bc	$0,215 \pm 0,003$ bcd

⁽¹⁾ en µg/psylle. ⁽²⁾ en µmoles/min de α-naphthyl acétate hydrolysé/µg de protéines.

* Les moyennes suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5 %.

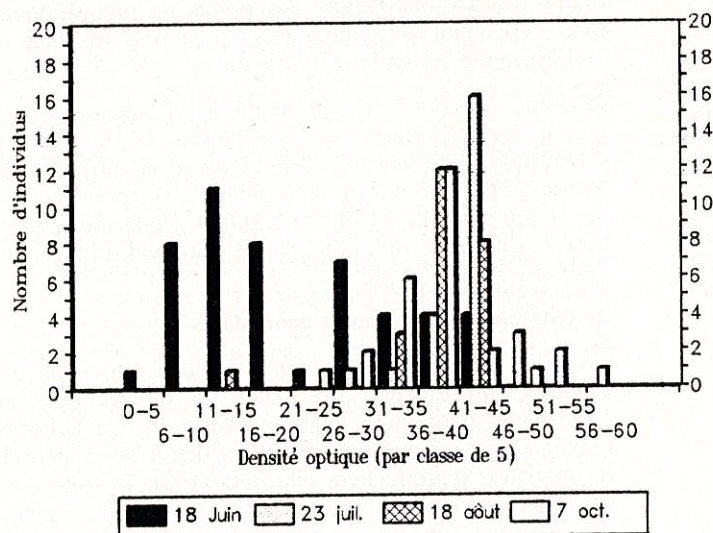


Figure 3. *Activité des estérases par individu, exprimée en densité optique, observée à différentes périodes de l'année dans la région d'Avignon en 1992.*

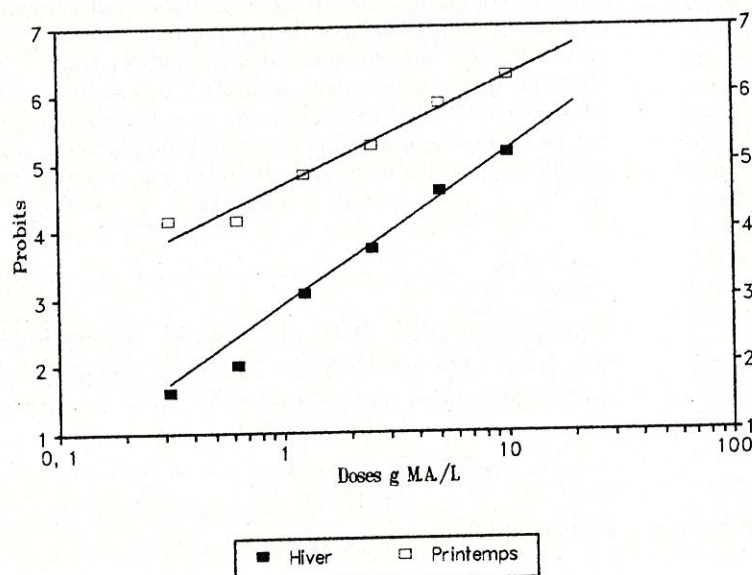


Figure 4. *Droites de régression en log-probit, entre individus prélevés en hiver et au printemps dans la région d'Avignon, traités à différentes doses avec l'azymphos-méthyle.*

niveau des données brutes, avant qu'elle ne soit corrigée par la quantité de protéines.

Résistance aux insecticides

Les résultats des tests insecticides réalisés sur les populations d'Avignon et d'Angers sont représentés dans le *Tableau III*. Pour l'azymphos-méthyle, la DL50 de la population d'Avignon est 7,12 fois plus élevée que celle d'Angers, 3,81 pour la deltaméthrine et sensiblement identique (0,85) pour le méthomyl.

En présence d'un inhibiteur des estérases (DEF), la DL50 de la population d'Avignon traitée avec l'azymphos-méthyle décroît de 8,33 à 1,83 g M.A./l (SR=4,55) et de 1,17 à 0,35 (SR=3,34) pour la population d'Angers. Pour la

deltaméthrine et le méthomyl, les résultats sont similaires mais avec des taux plus faibles.

La population de Carcassonne, traitée avec l'azymphos-méthyle, présente une DL50 (0,98 g/L; limites de confiance 0,60/1,43) plus faible que celle d'Avignon, en relation avec la différence de pourcentages d'individus avec l'estérase A. Par ailleurs, la fréquence des individus de la population de Carcassonne, présentant l'estérase A, s'accroît de 51,4 à 70,8 % lorsque les adultes sont traités avec la dose DL25 d'azymphos-méthyle.

La *Figure 4* montre la sensibilité à l'azymphos-méthyle, plus élevée pour les adultes de printemps (DL50 : 1,59 g/L; intervalle de confiance 1,89/1,35) que pour ceux d'hiver, prélevés pendant la période de diapause reproductive (DL : 8,33 g/L; limites de confiance 9,71/7,15).

Discussion

Si la dispersion des adultes de *C. pyri* a été étudiée au travers de la dynamique des populations [13], aucune analyse des flux géniques entre zones géographiques n'a été réalisée. Si l'on fait l'hypothèse d'une origine unique probable, pour chacune des estérases, les résultats obtenus montrent l'existence d'un flux génique entre populations éloignées, sans toutefois que son importance puisse être dissociée de l'effet de sélection. Ce sont vraisemblablement les adultes hivernants qui présentent la phase de plus grande mobilité, aidés en cela par la possibilité de s'alimenter sur d'autres végétaux ligneux. On ne peut cependant pas exclure l'existence de populations ne possédant aucune des estérases A et B.

Pour la population d'Avignon, on observe que l'activité estérasique au plus bas en mai, pendant la 1^{re} génération qui se développe sur des rameaux fructifères, est à son maximum fin octobre, en début de la diapause reproductive. La quantité de protéines totales varie inversement; elle est à son maximum de janvier à mai et décroît par la suite jusqu'à fin octobre. Cette variabilité saisonnière est étayée par l'analyse individuelle de l'activité estérasique où apparaît une plus grande hétérogénéité de la population d'Avignon au printemps qu'à l'automne. Parallèlement, la DL50 pour l'azymphos-méthyle est plus élevée pour les adultes hivernants en diapause que pour ceux du printemps. Cette différence entre les formes d'hiver et d'été a déjà été signalée, aussi bien au niveau des morphes [14] qu'au niveau de la sensibilité aux insecticides pour *Cacopsylla pyricola* (Foerster) en Amérique du Nord [6], pour *C. pyri* en France [15]. Ces auteurs soulignent le rôle probable, à l'origine du polymorphisme saisonnier, des interactions de facteurs tels que la photopériode, la température et l'alimentation. Les changements saisonniers, observés au niveau des quantités d'estérases et de protéines, indiquent,

soit des changements physiologiques, soit des variations des fréquences des gènes d'estérases. Sur *C. pyricola* les formes d'hiver contiennent 4 à 5 fois plus de protéines que celles d'été [6]. La quantité de protéines s'accroît durant l'hiver, pendant la période qui précède la dispersion des populations [13], mais d'autres études sont encore nécessaires avant de corréler les migrations avec un état physiologique particulier. Il est toutefois remarquable que l'activité des estérases s'accroît pendant la période où les cultures sont régulièrement traitées, ce qui ne permet pas d'exclure le rôle éventuel d'une pression de sélection.

La corrélation entre la présence d'une forte activité estérasique et le taux de résistance est toujours difficile à démontrer. Cette étude fait cependant apparaître des données qui étayent cette hypothèse :

– la DL50 est 8 fois plus élevée dans la population d'Avignon que dans la population d'Angers ;

– les taux de synergie du DEF, observés dans ces deux populations (3,3 à 4,5 pour l'azymphos-méthyle), peuvent être considérés comme relativement faibles [2]. La différence entre les rapports des DL50 avec et sans inhibiteur est également faible : 4,55 pour Avignon et 5,23 pour Angers pour le traitement à l'azymphos-méthyle. Cependant, il est vraisemblable qu'une différence plus importante serait obtenue entre Avignon et une population qui ne présenterait aucune des deux estérases, ou une souche d'élevage sélectionnée. Pour le même insecticide, sur *C. pyricola*, le taux de synergie varie de 1 à 5 [6] ;

– dans la population de Carcassonne, on observe une mortalité sélective des adultes qui ne présentent pas l'estérase A. D'autre part, la DL50 et l'activité estérasique entre les populations d'Avignon et de Carcassonne varie en fonction du pourcentage d'individus avec l'estérase A.

Tableau III

DL50 et intervalles de confiance à 95 % de la droite de régression en log-probit, observées avec 3 insecticides et un synergiste (DEF), sur les adultes hivernants prélevés dans deux populations

Insecticides	Avignon		Angers		RR
	DL50 (limites)	SR	DL50 (limites)	SR	
Azymphos-méthyle (g M.A./l)					
	8,33 (7,15-9,71)	/	1,17 (0,42-3,25)	/	7,12
+ DEF	1,83 (1,45-2,30)	4,55	0,35 (0,04-2,74)	3,34	5,23
Deltaméthrine (mg M.A./l)					
	0,61 (0,51-0,74)	/	0,16 (0,12-0,22)	/	3,81
+ DEF	0,22 (0,14-0,33)	2,77	0,09 (0,07-0,13)	1,78	2,44
Méthomyl (mg M.A./l)					
	4,40 (3,86-5,02)	/	5,18 (3,23-9,15)	/	0,85
+ DEF	1,17 (0,92-1,46)	3,76	2,06 (0,79-4,28)	2,51	0,57

SR = DL50 sans inhibiteur/DL50 avec inhibiteur.

RR = DL50 Avignon/DL50 Angers.

La différence de DL50 entre les populations d'hiver et de printemps, en relation avec une diminution de l'activité des estérases, peut être aussi considérée comme un élément de réponse. L'augmentation de l'activité générale des estérases chez *C. pyricola* [6] a été associée à une résistance à l'azymphos-méthyle et au fenvalérate. En France en 1992, les 2 zones à forte activité estérasique sont détectées dans 2 localités géographiques éloignées ; de ce fait, l'hypothèse d'une introduction accidentelle, comme cela a été signalé par exemple pour *Culex pipiens* L. [16], semble peu probable. La différence de DL50, entre les 2 populations, est encore relativement faible et d'autres

mécanismes de résistance sont susceptibles d'intervenir. Pour cette même espèce, 30 générations de sélection avec le monocrotophos induisent une moindre sensibilité à l'acétylcholinestérase (70 fois) et une faible augmentation des oxydases (5 fois), mais aucune différence au niveau des estérases [17]. Dans de nombreux pays européens, le psylle du poirier est un important ravageur de cette culture. L'analyse génétique et l'étude de la valeur sélective de chacune des estérases devraient apporter de nouveaux éléments sur les potentialités de dispersion des gènes et permettre une meilleure gestion de la lutte contre ce ravageur. ▼

Remerciements : les auteurs remercient M. M. Raymond pour les commentaires sur le manuscrit, M. J. Lemoine pour ses conseils pour la production de la plante hôte, Mme L. Boudinhon pour sa participation technique et les personnes du Service de la Protection des Végétaux et des organisations professionnelles qui ont collaboré au prélèvement des populations.

ABRIDGED VERSION

The migrating capabilities of the pear Psylla (*Cacopsylla pyri*) are often put forward to explain its populations dynamics. Frequency gradients within populations (Table I) of two esterases A and B (Fig. 1), shown by starch gel electrophoresis, establish the existence of genetic flow between populations. Moreover, a seasonal variability of esterases activities coincide with the beginning of reproductive diapause, with a peak at the end of October and a minimal value in May, when the first generation develops on fruit-bearing buds. It is also in May that esterases activity show a greater individual heterogeneity (Fig. 2). The opposite fluctuation of proteins amounts might imply its relationship with adults dispersion after reproductive diapause.

The mechanism of detoxication increased by non specific esterases can be observed in many species of Arthropods. The correlation between the presence of high esterase activity and the resistance rate is difficult to establish. Nevertheless the results brought out from populations of Avignon and Angers support this hypothesis :

– LD50 is 8 times higher in the Avignon population where esterase A only is represented, than in the Angers population

where most of individuals exhibit esterase B (Table III). This difference is correlated with a greater esterase activity in the Avignon population ;

– the synergistic action of an esterase inhibitor (DEF) can be observed within both populations ;

– the allelic frequency of individuals bearing esterase A in the Carcassonne population increases after a low-dosage treatment with azimphos-methyl ;

– the difference of LD50 between winter and spring populations (Fig. 3) is related to a decrease of esterase activity in spring (Table II, Fig. 2).

A parallel has been drawn for *Cacopsylla pyricola* between the general activity of esterases and its resistance to azymphos-methyl and fenvalerate [14]. As soon as 1992, the two esterases were detected in France within two distant geographic areas. The differences in LD50 found between the two populations are still relatively weak, and other mechanisms might participate in these differences of resistance [17]. The genetic analysis and the study of the selective value of each esterase will enable a better forecasting of genic flows and management of control methods. ▲

RÉFÉRENCES

- Georghiou G. P. 1986. The magnitude of the resistance problem, In : *Pesticide resistance : strategies and tactics for management*. National Academy Press, Washington, CD, 14-43.
- Scott J. G. 1990. Investigating mechanisms of insecticide resistance : methods, strategies, and pitfalls. In : *Pesticide resistance in arthropods*, Roush R. T., Tabashnik B. E. (eds.). Chapman and Hall, New York 39-57.
- Devonshire A. L., Field L. M. 1991. Gene amplification and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* 36: 1-23.
- Mouchès C., Magnin M., Bergé J. B., de Silvestri M., Beyssat V., Pasteur N., Georghiou G. P. 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphates-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2113.
- Follet P. A., Croft B. A., Westgard P. H. 1985. Regional resistance to insecticides in *Psylla pyricola* from pear orchards in Oregon. *Can. Ent.* 117:

565-73.

- Van de Baan H. U., Croft B. A. 1991. Resistance to insecticides in winter- and summer-forms of Pear Psylla, *Psylla pyricola*. *Pestic. Sci.* 32: 225-33.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Lavoisier, Paris, 217 p.
- Unruh T. R. 1990. Genetic structure among 18 west coast pear populations : implication for the evolution of resistance. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 36: 37-43.
- van Asperen K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol.* 8: 401-16.
- Bradford R. A. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Pasteur N., Georghiou G. P. 1989. Improved filter paper test for detecting and quantifying increased esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera : Culicidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 347-53.

12. Raymond M. 1985. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM, série Ent. méd. et Parasitol.* 23: 117-21.
13. Rieux R., Lyoussoufi E., Armand E., Faivre D'Arcier F. 1992. Dynamique des populations hivernales et posthivernales du Psylle du poirier *Psylla pyri* L. (Homoptera : Psyllidae). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica.* 27: 545-9.
14. Rieux R., Faivre D'Arcier F. 1990. Polymorphisme saisonnier des populations naturelles des adultes de *Psylla pyri* L. (Hom., Psyllidae). *J. Appl. Ent.* 109: 120-35.
15. Jore C., Nguyen T. X., Berrada S. 1990. Tests au laboratoire d'un acaricide, l'amitrazé sur *Psylla pyri* L. (Homoptera : Psyllidae). *Bull. OILB/SROP* 13.
16. Rivet Y., Marquine M., Raymond M. 1993. French mosquito population invaded by A2-B2 esterases causing insecticide resistance. *Biol. J. Linnean Soc.* 49: 249-55.
17. Berrada S., Fournier D., Cuany A., Nguyen T. X. 1994. Identification of resistance mechanisms in a selected laboratory strain of *Cacopsylla pyri* (Homoptera : Psyllidae) : altered acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Pest. Biochem. Physiol.* 48: 41-7.