

**INTERFERENCE DU DIFLUBENZURON AVEC L'OVOGENESE ET
LES TAUX D'HORMONES DE MUE CHEZ CYDIA POMONELLA L.
(Lep., Tortricidae)**

par N. SOLTANI

Nadia SOLTANI

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMALE

UNIVERSITE DE ANNABA

Résumé

Il est généralement admis que le diflubenzuron, insecticide dérivé de la diphenylbenzoylurée, perturbe la sécrétion cuticulaire en inhibant la synthèse de la chitine. Des travaux récents ont signalé que cet insecticide, administré aux femelles, réduit leur fécondité et l'éclosion des oeufs. Le but de cette étude est d'obtenir plus d'informations sur les effets du diflubenzuron sur la reproduction chez un insecte lepidoptère Cydia pomonella après une application topique d'une dose sub-létale de 0,5 ug de matière active par animal , réalisée à la veille de l'exuviation nymphale.

Les résultats de l'étude microscopique, histologique et biochimique et les observations macroscopiques montrent un allongement de la durée du développement nymphal, une diminution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et de la taille de l'ovocyte basal au cours de la métamorphose.

La détermination des taux d'hormone de mue dans les extraits totaux de chrysalides femelles par dosage radioimmunologique révèle que le second pic, spécifique aux femelles et probablement en rapport avec l'ovogénèse, est complètement inhibé après traitement au diflubenzuron. D'autre part, la taille de l'ovocyte basal, la teneur en protéines des ovaires ainsi que le nombre d'ovocytes par ovaire, déterminés à l'émergence des papillons, sont significativement réduits par le diflubenzuron comparativement aux lots témoins.

Selon nos résultats, la réduction de la fécondité et de l'éclosion des oeufs observée chez plusieurs espèces serait probablement due à une interférence du diflubenzuron avec le processus de vitellogénèse via le contrôle hormonal et ou les précurseurs vitellogéniques hémolymphatiques.

1/- INTRODUCTION

Il a été déjà rapporté chez de nombreuses espèces que le diflubenzuron (DFB), insecticide dérivé de la diphenylbenzoylurée, réduit la fécondité et le pourcentage d'éclosion des oeufs après traitement des femelles adultes (1-7). L'effet sur la fécondité résulte d'un traitement des femelles soit par contact soit par ingestion (8-9). Le DFB n'affecte pas la spermatogénèse, la fécondation ou l'ovoposition chez Lymantria dispar (10) et Pectinophora gossypiella (11). Par contre, chez les femelles d'Oxya japonica, le DFB administré par ingestion, retarde la maturation des ovocytes (4). La plupart de ces recherches ont été réalisées après traitement des adultes. Le mécanisme d'action du DFB sur la fécondité n'a pas été encore élucidé. C'est pourquoi, l'objectif de cette étude est d'obtenir plus d'informations

sur l'action du DFB sur la reproduction chez un insecte lépidoptère Cydia pomonella traité par application topique à la veille de l'exuviation nymphale.

2.-MATERIEL ET METHODES

2.1.- Insectes et traitement

Des chenilles du dernier stade de C.pomonella sont récoltées dans un verger de Cognassier à Annaba. Les chenilles femelles sont élevées individuellement à 25°C et 60% d'humidité relative. L'expérimentation a été réalisée sur trois séries d'animaux : la première série a été traitée avec le DFB, la seconde avec le solvant (acétone) et enfin la troisième n'a pas été traitée du tout (témoins). Le DFB a été fourni par Philips Duphar B.V. (Hollande). Une application topique de 0,5 ug de DFB en solution dans 3 ul d'acétone a été faite sur la région dorso-abdominale de larves femelles du dernier stade, 1-2 jours avant l'exuviation nymphale.

2.2.- Histologie

Les techniques histologiques ont été effectuées selon les indications de Martoja et Martoja (12). Des chrysalides de différents âges sont prélevées et fixées, après incision, dans du Bouin alcoolique. Des coupes de 5 à 7 um d'épaisseur sont colorées à l'azan. L'épaisseur de l'épithélium folliculaire et la taille (longueur et largeur) de l'ovocyte basal sont mesurées sur 3-4 chrysalides différentes pour chaque âge de la vie nymphale.

2.3.- Observations in toto

Des papillons femelles sont prélevés , immédiatement après leur émergence, des séries témoin et traitée et disséqués dans du liquide de Ringer légèrement coloré avec du bleu de méthylène. Le nombre d'ovocyte et la taille de l'ovocyte basal sont déterminés pour chaque ovaire.

2.4.- Dosage des protéines

Les ovaires sont prélevés de chaque papillon immédiatement après leur émergence. L'extraction des protéines de chaque paire d'ovaire est réalisée selon la technique décrite par le Bras et Echaubard (13) et les taux de protéines sont déterminés selon la méthode de Bradford (14) en utilisant l'albumine de sérum de bovin comme standard. Les absorbances sont lues dans un spectrophotomètre Beckman DU-6 à une longueur d'onde de 595 nm.

2.5.- Dosage des ecdystéroïdes

Les taux d'ecdystéroïdes dans les extraits de corps entier de chrysalides femelles des séries traitée et témoin sont analysés selon la technique de De Reggi et al. (15). Chaque chrysalide datée est homogénéisée dans 0,5 ml de méthanol absolu et centrifugée à 10.000 g pendant 4 min. Le surnageant est évaporé à 60°C sous jet d'azote et l'extrait sec est repris par du tampon citrate (0,1 M, pH 6,2). Les dosages sont menés sur au moins 3 échantillons (3-7) par âge, chaque échantillon étant dosé en duplicat. Les résultats sont exprimés en ng d'équivalent 20-hydroxyecdysone par mg de poids corporel.

3.- RESULTATS

Des essais préliminaires ont montré qu'une application topique d'une dose de 0,5 ug de DFB à la veille de la chrysalidation provoquait une inhibition de l'exuviation adulte chez 25% des animaux traités.

Le DFB retarde significativement l'exuviation adulte puisque la durée du développement nymphal est de $9,85 \pm 0,81$ jours ($m \pm s$) chez les témoins contre $12,30 \pm 0,60$ jours chez les animaux traités au DFB. Il n'y a pas de différence significative ($p \gg 0,05$) au niveau de la durée du développement nymphal entre les animaux témoins et les animaux traités à l'acétone seul ($10,50 \pm 0,57$ jours).

C. pomonella présente quatre ovarioles polytrophiques par ovaire. Chez les chrysalides témoins, la taille de l'ovocyte basal augmente jusqu'au huitième jour de la vie nymphale pour atteindre un maximum qui reste constant jusqu'à l'émergence des papillons (Fig. 1). La longueur et la largeur maximum de l'ovocyte basal sont respectivement $1278,00 \pm 10,20$ um et $490,00 \pm 7,82$ um ; l'épaisseur de l'épithélium folliculaire de l'ovocyte basal augmente durant la première semaine de la vie nymphale atteignant une valeur maximum de $84,00 \pm 1,04$ um puis décroît par la suite (Fig. 2).

Le DFB affecte rapidement cette évolution puisque une diminution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et de la taille de l'ovocyte basal est enregistrée dès l'exuviation nymphale. Le développement des ovocytes est réduit et retardé. Les valeurs maximum enregistrées dès le neuvième jour sont respectivement $822,04 \pm 43,18$ um pour la

longueur, de $234,75 \pm 13,62$ um pour la largeur tandis que l'épaisseur de l'épithélium folliculaire atteint un maximum de $43,50 \pm 6,18$ um le neuvième jour de la vie nymphale. D'autre part, la taille de l'ovocyte basal et le nombre d'ovocytes par ovaire relevés à l'émergence des papillons sont significativement réduits (Tableaux 1,2). En effet, le nombre d'ovocytes par ovaire est de 156 ± 10 chez la série témoin et seulement 114 ± 8 chez les insectes traités au DFB. La longueur et la largeur de l'ovocyte basal sont respectivement $1261,25 \pm 13,09$ um et $444,60 \pm 19,30$ um chez le lot témoin contre $804,81 \pm 26,28$ um et $250,80 \pm 18,90$ um chez le lot traité. L'acétone n'a pas d'effet significatif ($p \gg 0,05$) sur la taille de l'ovocyte basal et le nombre d'ovocytes par ovaire comparativement aux animaux témoins.

L'analyse quantitative des protéines dans les ovaires, prélevés à l'émergence des papillons, révèle que le DFB réduit significativement ($p < 0,05$) les taux de protéines. En effet, les valeurs obtenues sont respectivement $43,49 \pm 14,96$ ug de protéines par ovaire chez les animaux témoins contre $14,15 \pm 5,43$ ug/ovaire chez la série traitée (10 femelles par série).

Le dosage radioimmunologique des ecdystéroïdes durant la métamorphose a été réalisé chez les animaux témoins et les animaux traités. Chez les animaux témoins la variation des taux des ecdystéroïdes dans les extraits de corps entier de chrysalides femelles présente deux pics : le premier au jour 3 et le second au jour 6 après l'exuviation nymphale (Fig.3). Cette évolution est perturbée par le DFB puisque seulement le premier pic est observé chez les animaux traités ; cet unique

pic a lieu à 3 jours et sa valeur (3695,01 \pm ng/mg) est comparable à celle du premier pic de la série témoin (3665,43 \pm 744,95 ng/mg). Le second pic est complètement inhibé par le DFB.

4.- DISCUSSION

Le DFB perturbe le processus de mue chez C. pomonella et retarde l'exuviation adulte confirmant des travaux antérieurs sur d'autres espèces (16-21). D'autre part, ce produit présente une activité ovicide après traitement des femelles et affecte également la reproduction.

L'activité ovicide est obtenue soit par traitement direct des oeufs soit par traitement des femelles ; elle est due à des perturbations de la sécrétion cuticulaire chez l'embryon (8). L'effet du DFB sur la fécondité n'est pas unanime. Une diminution de la fécondité après traitement des femelles a été observée chez Epilachna varivestis (1), Eurydema oleraceum (2), Dacus oleae (3), Ceratitis capitata (22), et O. japonica (4). Cependant, chez Iribolium castaneum (23), Anthonomus grandis (24), Culex tarsalis (25), Stomoxys calcitrans et Musca domestica (6) et P. gossypiella (11), le DFB n'affecte pas la fécondité.

Comme chez les autres espèces de Lépidoptères (10), l'ovogénèse chez C.pomonella se déroule durant la métamorphose. En effet, chez les animaux témoins, l'ovocyte basal atteint son épaisseur maximum 7 jours après l'exuviation nymphale. Ceci coïncide avec le début de résorption de l'épithélium folliculaire et avec le second pic d'ecdystéroïdes détecté chez les chrysalides femelles. Comme chez Bombyx (26) et Galleria (27), Cydia présente 2 pics d'ecdystéroïdes durant le développement

nympho-adulte. Nos résultats montrent que le DFB perturbe la croissance et le développement des ovocytes chez Cydia. L'étude histologique révèle une diminution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et de la taille de l'ovocyte basal après traitement au DFB comparativement aux témoins. De plus, le dosage radioimmunologique des ecdystéroïdes montre que le second pic est complètement inhibé par le DFB.

Chez les adultes femelles d'O. japonica traités au DFB, LIM et LEE (4) observent un retard dans le développement des ovocytes et une augmentation de la résorption des ovocytes entraînant une diminution de la fécondité et de l'éclosion des oeufs ; cependant, il n'y a pas de différence significative au niveau du nombre d'ovariole et de la longueur de l'ovocyte basal entre les séries témoin et traitée. Il a été également rapporté que le jeûne augmente le pourcentage de développement des ovocytes et diminue le poids sec des ovaires ainsi que leurs contenus en lipides, protéines et sucres chez O. japonica (28). Une étude sur A. grandis suggère que la diminution de la fécondité après traitement au DFB serait due à une inhibition de la synthèse d'ADN (29).

Dans le cas de C. pomonella, la croissance et le développement sont réduits et retardés. D'autre part, le nombre d'ovocyte par ovaire relevé à l'émergence des papillons est réduit par le DFB. Des résultats préliminaires sur l'évaluation quantitative des protéines dans les ovaires révèlent une diminution des taux de protéines après traitement au DFB. HIGHMAN et al. (30) ont observé chez Schistocerca gregaria une inhibition du dépôt du vitellus par le jeûne. La diminution des taux de protéines dans les ovaires peut avoir plusieurs causes telles une chute

des taux de protéines hémolympatiques et/ou une interférence avec les hormones contrôlant la vitellogénèse.

Il est généralement admis que les taux des métabolites hémolympatiques (sucres, protéines, lipides) et d'hormones sont corrélés avec le développement ovarien. Les effets du DFB sur les taux d'hormones de mue chez C. pomonella et sur les taux de sucres et protéines hémolympatiques chez les nymphes de Tenebrio molitor (données non publiées) confirment cette hypothèse .

Ainsi, nos résultats révèlent que le DFB affecte la reproduction chez C. pomonella. L'insecticide perturbe la croissance et le développement des ovocytes. La diminution de la fécondité et du pourcentage d'éclosion des oeufs observée chez plusieurs espèces, serait due en partie à une interférence de l'insecticide avec le processus de l'ovogénèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. H. HOLST .- die fertilitätsbeeinflussend Wirkung des neuen insectizids. PDD 60-40 Bei Epilachna varivestis Muls. (Col. Coccinellidae) und Leptinotarsa decemlineata Say. (Col. Chrysomelidae). Z. Pflkrankh. pflschutz 81,1 (1975).
2. Z.K. LEUCHNER .- Wirkung des neuen Insectizids PDD 60-40 auf larven und Imagines der kohlwanze Eurydema oleracerum L. (Heteroptera, Pentatomidae) .
Z. Pflkrankh. Pflschutz . 81, 8 (1974).

- 3.E. FYTIZAS .- L'action du TH 60-40 sur la métamorphose de Dacus oleae Gmel. (Diptera, Trypetidae).
Z. angew. Ent. 81, 440 (1976).
- 4.S.J. LIM and S.S. LEE.- Toxicity of diflubenzuron to the grasshopper Oxya japonica : effects on reproduction.
Ent. Exp. appl. 31, 154 (1982).
- 5.K.R.S. ASCHER and N.E. NEMMY.- The ovicidal effect of PH 60-40 (1-(4-chlorophenyl)-3(2,6-difluorbenzoles)) in Spodoptera littoralis Bois.
Phytoparasitica 2, 131 (1974).
- 6.J.E. WRIGHT and G.E. SPATES.- Reproductive inhibition activity of the insect growth regulator TH 60-40 against the stable fly and the house fly : effects on hatchability.
J.Econ.Ent. 69, 365 (1976).
- 7.L.A. LACEY and S. MULLA.- Larvicidal and ovicidal activity of dimilin against Simulium vitatum.
J.Econ.Ent. 70, 369 (1977).
- 8.A.C. GROSSCURT .- Diflubenzuron : some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and an evaluation of its practical possibilities.
Pestic. Sci. 9, 373-386 (1978).
- 9.C. SANTIAGO-ALVAREZ .-, and M.J. SARASUA.- - Reponse de Ceratitis capitata Wied (Diptera, Trypetidae) au diflubenzuron. In proceedings of the CEC/IOBC, International Symposium Athens, Greece, 16-19 november , 1982.
- 10.H.S. SALAMA., Z.A. MOTOGALY and U. SKATULLA.- On the mode of action of Dimilin as a moulting inhibitor in some lepidopterous insects. Z. ang. Ent. 80, 396 (1976).
- 11.H.M. FLINT and R.L. SMITH.- Laboratory evaluations of TH 60-40 againsts the pink bollworm.
J.Econ.Ent. 70, 51 (1977).
- 12.R. MARTOJA and M. MARTOJA.- Techniques d'histologie animale. Masson et Cie , Ed., Paris, 1967.

13. LE BRAS and M. ECHAUBARD.- Variations quantitatives des protéines dans les tissus de la mouche domestique (Musca domestica L.) au cours de la vie imaginaire après intoxication par l'Hempa.
Bull. Soc. Zool. France (102 (1), 95 (1977)).
14. M.M. BRADFORD .- A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding
Anal. Biochem. 72, 248 (1976).
15. M. DE REGGI ., M.HIRN and M.A. DELAAGE.- Radioimmunoassay of ecdysone. An application to Drosophila larvae and pupae. Biochem. Biophys. Commun. 66, 1307 (1975).
16. R. MULDER and M.J. GIJWIJT.- The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition . Pestic. Sci. 4, 737 (1973).
17. E. HUNTER and J.F.V. VINCENT.- The effects of a novel insecticide on insect cuticle. Experientia 30, 1432 (1974).
18. N. SOLTANI .- Effects of ingested diflubenzuron on the longevity and the peritrophic membrane of mealworms (Tenebrio molitor L.). Pestic. Sci. 15, 221 (1984).
19. N. SOLTANI ., J.P. DELBECQUE and J. DELACHAMBRE.- Pénétration and insecticidal activity of diflubenzuron in Tenebrio molitor pupae. Pestic. Sci. 14, 615 (1983).
20. N. SOLTANI, M.T. BESSON and J. DELACHAMBRE.- Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of Tenebrio molitor L. (Col., Tenebrionidae) growth and development , cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis. Pestic. Biochem. Physiol. 21, 256 (1984).
21. N. SOLTANI., J.P. DELBECQUE., J. DELACHAMBRE and B. MAUCHAMP.- Inhibition of ecdysteroid increase by diflubenzuron in Tenebrio molitor pupae and compensation of diflubenzuron effect on cuticle secretion by 20-hydroxyecdysone. Intern. J. Invert. Reprod. Develop. 7, 323 (1984).

22. R. ARAMBOURG., R. PROLAVARIO and C. DOLBEAU.- Premières observations sur l'action du diflubenzuron (PH 60-40) sur la fécondité, la longévité et la viabilité des oeufs de Ceratitis capitata (Dip., Trypetidae). Rev. Zool. Agric. Patholog. Veg. 76 (4) 118 (1977).
23. S.W. CARTER .- Laboratory evaluation of three novel insecticides inhibiting cuticle formation against some susceptible and resistant stored products beetles. J. Stored.
24. R.F. MOORE and H.M. TAFT.- Boll Weevils : chemosterilization of both sexes with bisulfan plus Thompson-Hayward TH 60-40. J. Econ. Ent. 68,96 (1976).
25. J.R. ARIAS and M.S. MULLA.- Postemergence effects of two insect growth regulators on the mosquito Culex tarsalis (Diptera, Culicidae). J. Med. Ent. 12, 317 (1977).
26. K. HANAOKA and E. OHNISHI.- Changes in ecdysone titer during pupal-adult development in the silk-worm Bombyx mori J. Insect. Physiol. 20, 2375 (1974).
27. W.E. BOLLENBACHER., H. ZVENKO. A.K., KUMARAN and L.I. GILBERT.- Changes in ecdysone content during postembryonic development of the wax moth, Galleria mellonella : the rôle of the ovary. Gen. Comp. Endocrinol. 34, 169 (1978).
28. S.J. LIM and S.S. LEE .- The effect of starvation on hemolymph metabolites, fat body and ovarian development in Oxya japonica (Acrididae : Orthoptera). J. Insect. Physiol. 27, 93 (1981).
29. N. MITLIN ., G. WIYGUL and J.HAYNES .- Inhibition of DNA synthesis in Boll Weevils (Anthonomus grandis) sterilized by Dimilin. Pest. Biochem. Physiol. 7, 559 (1977).
30. K.C. HIGHNAM., L. HILL and W. MORDUE .- The endocrine system and oocyte growth in schistocerca in relation to starvation and frontal gangliorectomy. J. Insect Physiol. 12, 977 (1966).

Tableau 1.- Nombre d'ovocyte par ovaire déterminé à l'exuviation adulte chez les séries témoin et traitée.

Traitement	NOMBRE d'ovocyte/ovaire	
	Moyenne (\pm s)	Min.-Max
Témoin (n=38)	156,45 \pm 9,76	135-168
Acétone(n=13)	140,15 \pm 6,33	133-147
DFB (n=15)	113,66 \pm 7,89	105-121

Tableau 2.- Taille de l'ovocyte basal déterminée à l'exuviation adulte chez les séries témoin et traitée

Traitement	LONGUEUR/largeur (um)	
	Moyenne (\pm s)	Min.- Max
Témoin (n=24)	1262,25 \pm 13,09	1246 - 1278
	444,50 \pm 19,30	399 - 490
Acétone(n=23)	1267,18 \pm 28,06	1214 - 1309
	418,13 \pm 17,90	375 - 459
DFB (n=28)	804,81 \pm 26,28	759 - 845
	250,80 \pm 18,90	217 - 282

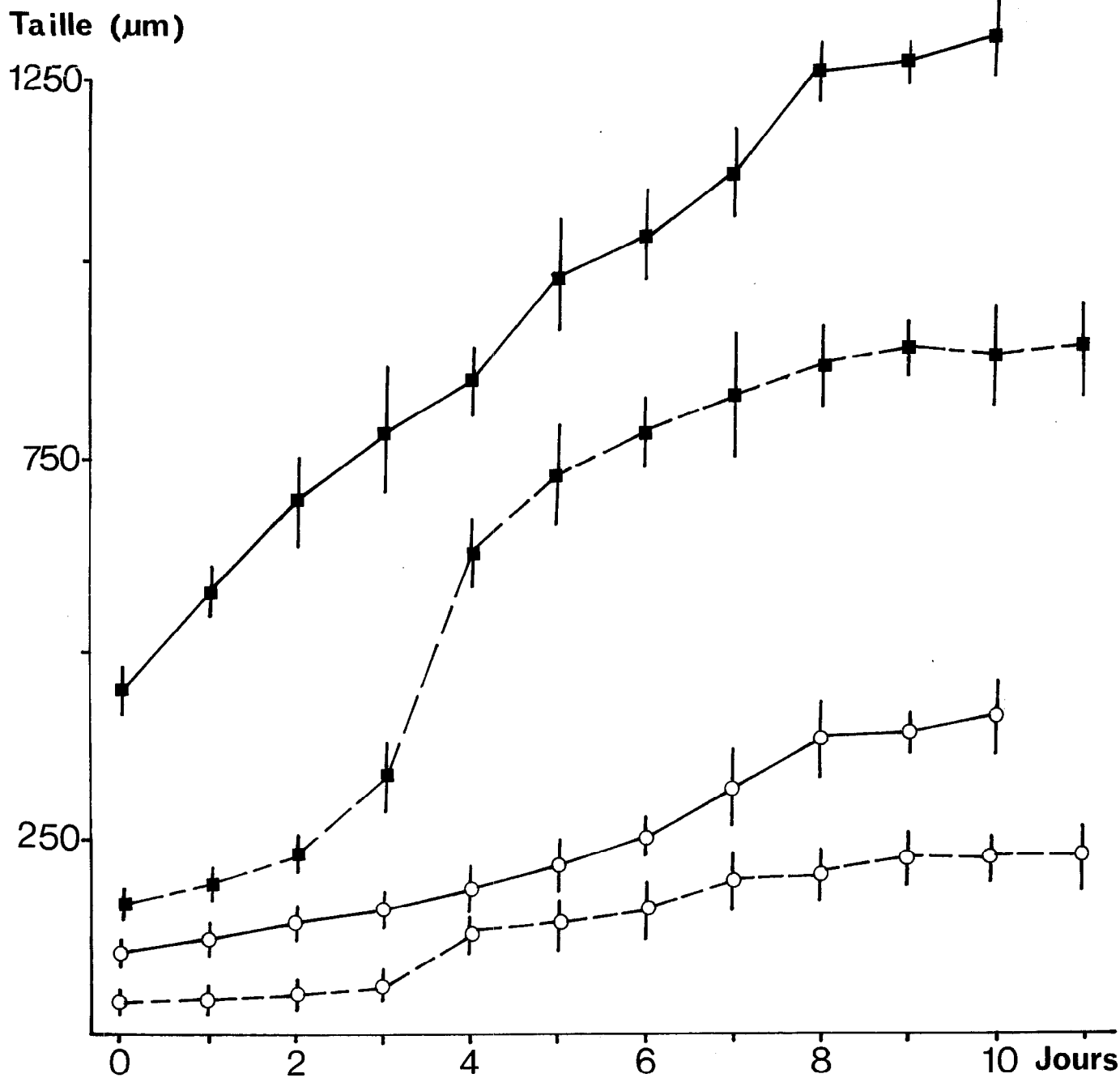


Figure 1. Evolution de la taille de l'ovocyte basal durant la métamorphose de *Cydia pomonella* chez les chrysalides témoins (■-longueur, ○-largeur) et les chrysalides traitées au diflubenzuron (■-longueur, ○-largeur). Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type établie sur un effectif de 4-5 chrysalides par âge.

Epaisseur (μm)

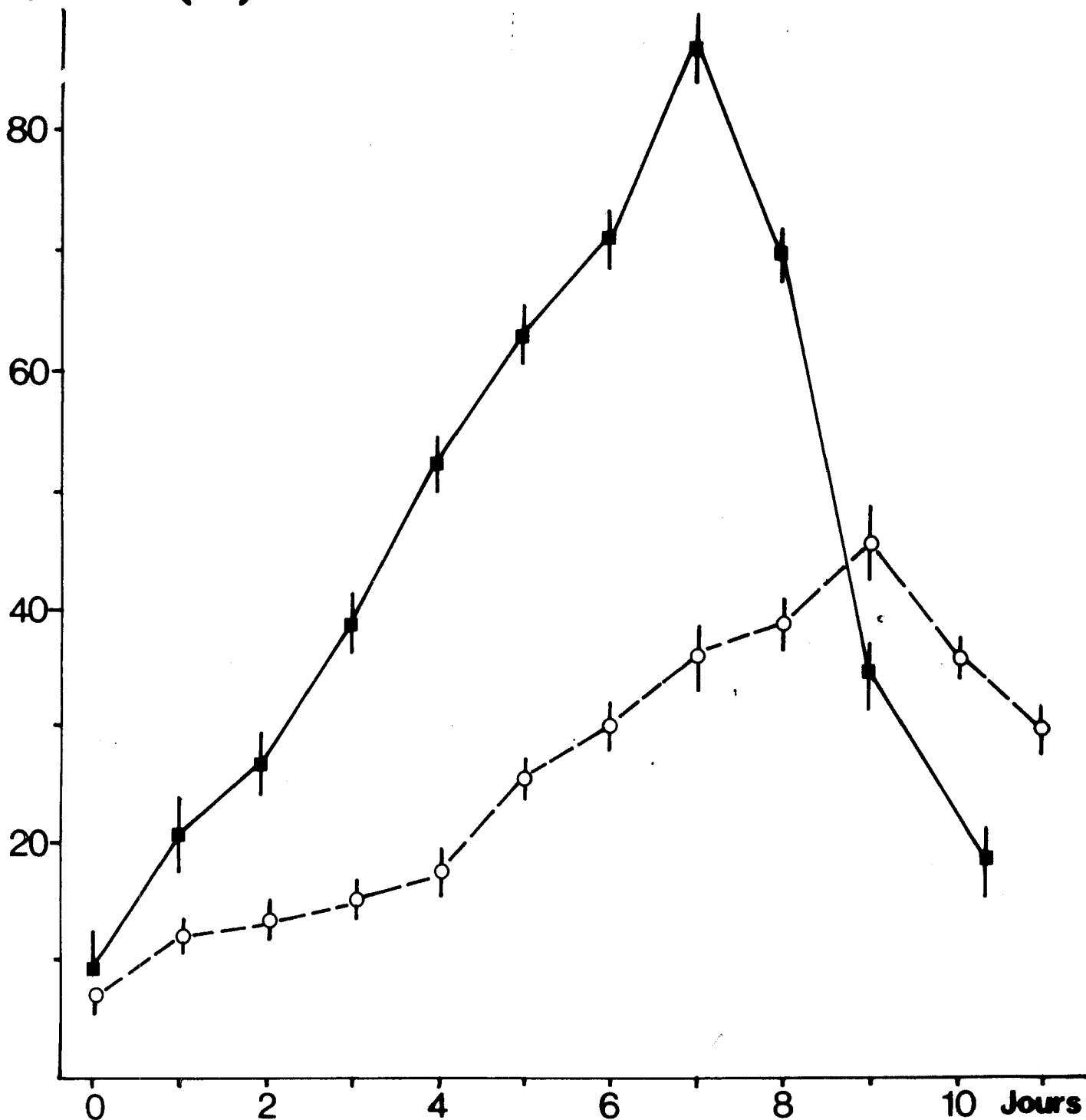


Figure 2. Evolution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire de l'ovocyte basal durant la métamorphose de *Cydia pomonella* chez les chrysalides témoins (■) et les chrysalides traitées au diflubenzuron (○). Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type établie sur 4-5 chrysalides par âge.

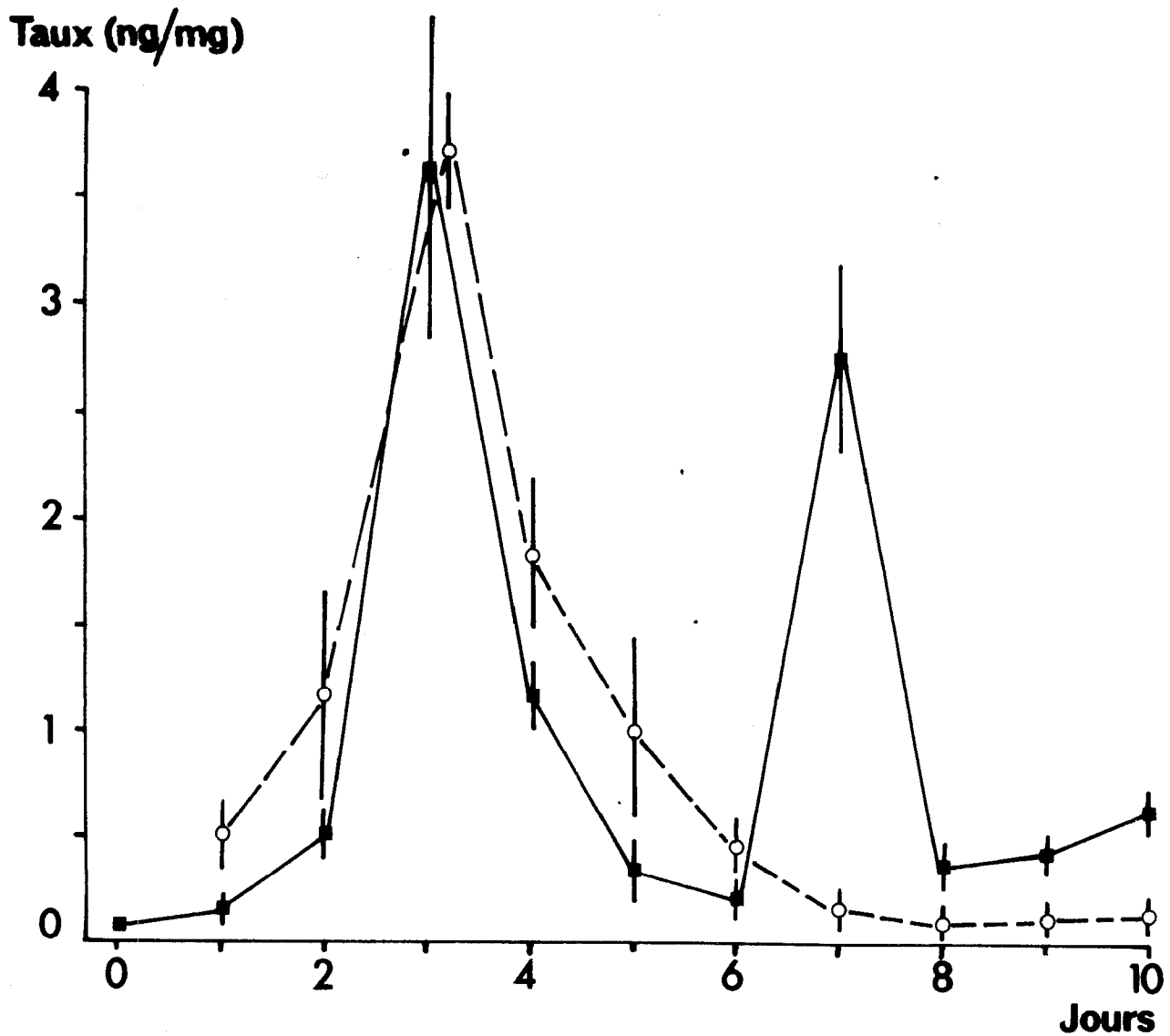


Figure 3. Evolution des taux d'ecdystéroïdes dans les extraits de corps entier de chrysalides femelles témoins (■) et traitées au diflubenzuron (○) au cours de la métamorphose. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type établie sur 2-7 échantillons par âge, chaque échantillon étant dosé en duplicat.