

DOSAGE QUANTITATIF ET QUALITATIF DES ECDYSTEROÏDES CHEZ LES CHRYSALIDES MALES ET FEMELLES DE *Cydia pomonella* (Lepidoptera, Tortricidae).

Par S O L T A N I N.

Département de Biologie Animale
Université de Annaba

1. I N T R O D U C T I O N

Il est généralement admis que les ecdystéroïdes jouent un rôle important dans le développement (GILBERT et KING, 1973, MORGAN et POOLE, 1977) et la reproduction des insectes (HAGEDORN et al, 1975; LAGUEUX et al, 1977; BOLLENBACHER et al, 1978; BOROUSKY et VAN HANDEL, 1979).

Les glandes prothoraciques sont considérées comme la principale source de ces hormones (CHINO et al., 1974; KING et al, 1974; BOLLENBACHER et al., 1975). Cependant des études réalisées sur des extraits d'adultes (HANAOKA et OHNISHI, 1974; KING et MARKS, 1974; HAGEDORN et al., 1975), les oeufs et les ovaires (KAPLANIS et al., 1973, 1975; 1976; MIZUNO et OHNISHI, 1975; LEGAY et al., 1976), les abdomens isolés (GERSCH et STUZEBECHER, 1971; NAKANISHI et al., 1972; STUDINGER et WILLIG, 1975; DELBALCQUE et al., 1978), les oenocytes (ROMER, 1973), ont mis en évidence la présence d'ecdystéroïdes suggérant que des tissus autres que les glandes prothoraciques sont capables de synthétiser cette hormone.

Le présent travail a pour but de déterminer l'évolution quantitative et qualitative des ecdystéroïdes chez les chrysalides mâles et femelles de *Cydia* (= *Laspeyresia*) *pomella* L., important ravageur des Pomacées (Pommes, Poires, coings) dans la région de Annaba.

2. MATERIEL ET METHODES

Méthode d'élevage: les recherches ont été réalisées sur *C. pomonella* L. récolté sous forme de chenilles diapausantes dans un verger de cognassier (*Cydonia oblonga* L.) situé à Ben M'hidi (15 km à l'Est de Annaba). Les chenilles sont réparties par sexe et par lot de 20 dans des bœchers comportant du carton ondulé appliqué contre la paroi interne. Chaque chenille est posée soigneusement entre la paroi interne du bœcher et le carton ondulé pour pouvoir observer l'exuviation nymphale et dater ainsi les chrysalides (en jours après l'exuviation nymphale). Les bœchers sont ensuite fermés par une toile et placés dans une étuve réglée à 25°C avec une humidité relative voisine de 85 %.

2.2. Extraction et dosage des ecdystéroïdes

Les chrysalides sont broyées individuellement dans 0,5 ml de méthanol puis centrifugées (1500g, 10 mn). Le culot est repris 2 fois et centrifugé dans 0,5 ml de méthanol et les surnageants sont mélangés et évaporés sous jet d'azote à 60°C.

Après évaporation, l'extrait sec est dissous dans du tampon citrate (0,1M, PH 6,2) et dosé en duplicat selon la méthode de De REGGI et al, (1975).

La nature des ecdysteroïdes est déterminée en combinant la chromatographe liquide à haute performance (HPLC) et le dosage radioimmunologique (RIA). Les divers extraits des chrysalides femelles de 3 jours et de 7 jours sont mélangés séparément dans du méthanol et purifiés selon la technique de LAFONT et al, (1982) à travers une colonne C 18 Sep Pak (WATERS). La phase 70% méthanol dans l'eau est évaporée analysée dans un chromatographe liquide à haute performance équipé d'une pompe M 6000 A, un détecteur UV 440 (254 nm), un injecteur automatique WISP 710 B et d'un calculateur M 740 une colonne Merck RP 8 (longueur 25cm, 4mm, taille particules 5 µm) a été utilisée avec un mélange méthanol-eau (50/50) comme solvant et un débit de 1 ml/min. La pression est

de 7×10^6 Pa et la température ambiante est de l'ordre de 25°C . Les fractions de 1 ml sont collectées dans un Redirac LKB. Les fractions sont évaporées et les extraits secs sont repris dans du tampon citrate pour le RIA.

3. RESULTATS

3.1. Evolution des taux d'ecdystéroïdes

Dans nos conditions d'élevage, la durée de développement nymphal est de $10,13 \pm 1,35$ jours (m \pm s). Le poids moyen des chrysalides est de $41,97 \pm 4,95$ mg chez les mâles contre $52,02 \pm 6,6$ mg chez les femelles. Les variations des taux d'ecdystéroïdes déterminés par RIA chez les chrysalides mâles et femelles sont représentées dans la figure 1.

A l'exuviation les taux enregistrés sont de l'ordre de 75 pg/mg de poids frais d'animal. Chez les mâles les taux augmentent très rapidement après 2 jours pour atteindre un maximum de 2 213 pg/mg à 3 jours, les taux diminuent par la suite et à l'exuviation adulte, on enregistre un taux de base d'environ 50 pg/mg., chez les femelles par contre, on observe 2 pics, l'un à 3 jours avec un taux de $2\,754 \pm 559$ pg/mg l'autre à 7 jours avec un taux de $1\,817 \pm 256$ pg/mg. A l'exuviation, les chrysalides femelles présentent un taux de base élevé que chez les chrysalides mâles.

3.2. Nature des ecdystéroïdes

La détermination qualitative des ecdysaroides a été réalisée en combinant HPLC et RIA. Les pools des extraits de chrysalides femelles âgées de 3 jours (pic 1) et 7 jours (pic 2) sont, après purification analysés par HPLC, les fractions collectées après HPLC sont dosées par RIA. La figure 2 montre la séparation

de diverses hormones ecdystéroïdes standards dans nos conditions expérimentales.

L'analyse HPLC des pools d'extraits de chrysalides femelles (3 jours et 7 jours) met en évidence un composé qui a le même temps de rétention que la 20 hydroxyecdysone (Figure 3 et 4).

Le dosage RIA des fractions collectées révèle la présence de 2 principales fractions immunoréactives correspondant à la 20-hydroxyecdysone et à l'ecdysone chez les chrysalides âgées de 3 jours et une seule fraction immunoréactive correspondant à la 20-hydroxyecdysone chez les chrysalides âgées de 7 jours (Figure 5).

Le premier pic est composé de 20-hydroxyecdysone (90 % réponse totale au RIA) et d'ecdysone (10 %) comme le montre la figure 5. Le deuxième pic, détecté à 7 jours renferme uniquement la 20-hydroxyecdysone.

4. DISCUSSION

Beaucoup de travaux ont été consacrés ces dernières années à la détermination des taux, la localisation et le rôle des pics et aux sites de production des ecdystéroïdes chez les différents stades de développement des insectes. Selon les espèces, un ou deux pics d'ecdystéroïdes ont été détectés durant le développement nymphal: *Sarcophaga* (OHTAKI et TAKAHASHI, 1972), *Pieris* (LAFONT et al, 1974), *Leptinotarsa* (HSIAO et al, 1976), *Heliothis* (HOLMAN et MEOLA, 1978), *Tenebrio* (DELBECQUE et al, 1978) et *Xyleborus* (RAO et al, 1981), présentent un seul pic tandis que *Bombyx* (HANAOKA et OHNISHI, 1974) et *Galleria* (BOLLENBACHER et al, 1978) en ont 2 pics. Nos résultats sur *C. pomonella* L. mettent en évidence 1 pic chez les chrysalides mâles et 2 pics chez les chrysalides femelles. Ce type de dimorphisme sexuel a été également

observé chez *Galleria* (BOLLENBACHER et al., 1978) et *Bombyx* (HANAOKA et OHNISHI, 1974).

Il a été démontré chez *Aedes* (HAGEDORN et al, 1975), *Locusta* (LAGUEUX et al, 1977) et *Galleria* (BOLLENBACHER et al., 1978) que les ovaires produisent des ecdystéroïdes. Le deuxième pic détecté chez les chrysalides femelles de *C. pomonella* serait en rapport avec l'ovogénèse. Le premier pic observé à 3 jours serait responsable de l'apolyse et de l'initiation de la cuticule adulte comme suggéré par BOLLENBACHER et al, (1978) chez *Galleria*.

Sept hormones ecdystéroïdes ont été isolées et identifiées chez les insectes (SVOBODA et al, 1978; KAPLANIS et al, 1979), les résultats du dosage par HPLC et RIA révèlent que la 20-hydroxyecdysone et dans une moindre mesure l'ecdysone sont les principales hormones existantes chez les chrysalides de *C. pomonella* L.

Le premier pic (3 jours) est composé de 20-hydroxyecdysone (90 %) et d'ecdysone (10 %). Le deuxième pic (7 jours), moins élevé que le premier est composé de 20-hydroxyecdysone uniquement. Cette prédominance de la 20-hydroxyecdysone a été également observée chez d'autres espèces: *Manduca* (BOLLENBACHER et al, 1975), *Schistocerca* (MORGAN et POOLE, 1976), *Locusta* (HIRN et al., 1979), ou *Calpodes* (DEAN et al., 1980). Chez *Drosophila*, BORT et al., (1974) ont observé seulement la présence de 20-hydroxyecdysone.

B I B L I O G R A P H I E

- BOLLENBACHER W.E. et al., 1975 - Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*.
 Develop Biol. 44 : 46 - 53.

- BOLLENBACHER W.E. et al., 1978 - Changes in ecdysone content during the post-embryonic development of wax moth *Galleria mellonella*. The role of the ovary.
G'en. Comp. Endocrinol 34 : 169 - 179.
- BOROVSKY, D. and VAN HANDEL E.V., 1979 - Does ovarian ecdysone stimulate mosquitoes to synthesize vitellugenin.
J. Insect. Physiol. 25 : 861 - 865.
- CHINO H. et al., 1974 - Biosynthesis of ecdysone by prothoracic glands
In vitro Science 183 : 529 - 530.
- BELBECQUE J.P.; DELACHAMBRE J.; HIRN M. and De REGGI M., (1978 -
Abdominal production of ecdysterone and pupal adult development in *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera).
Gen. Comp. Endocrinol. 35 : 436 - 444.
- De REGGI M; HIRN M; and DELAAGE M.A., 1975 - Radioimmunoassay of ecdysone. An application to *Drosophila* larvae and pupal.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 66 : 1 307 - 1 315.
- GERSCH M. and STURZEBECKER J., 1971 - Über eine synthese von ecdyson-3H and ecdystoron-3H an cholesterin-3H in geschnürten abdomine von *Mamestra brassicae*-Raupen.
Experientia 27 : 1 475 - 1 476.
- GILBERT L.I. and KING D.S., 1973 - Physiology of growth and development: Endocrine aspects. In "The Physiology of Insecta" (M. Rockstein ed.) 2nd ed., Academic Rocksteur and London, Vol. 1 : 249 - 370.
- HEGEDORN H.H., O'CONNOR J.D.; FUCHS M.S.; SAGE B.; SCHLAEGER D.A. and BOHM M.K., 1975 - The ovary as a source of ecdysone in an adult mosquito.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72 : 3 255 - 3 259.

- HANAOKA K. and OHNISHI E., 1974 - Changes in ecdysone titer during pupal-adult development in the Silk-Worm. *Bombyx mori*.
J. Insect. Physiol. 20 : 2 375 - 2 384.
- HSIAO T.H.; HSIA C.; and De WILDE L. , 1976 - Molting hormone titer changes and their significance during development of the colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*.
J. Insect Physiol. 22 : 1 252 - 1 261.
- HOLMAN G.M. and MEOLA R.W., 1978 - A high performance liquid chromatography method for the purification and analysis of insect ecdysone titers during pupal-adult development of *Meliothis zae*.
Insect Biochem. 8 : 275 - 278.
- KAPLANIS J.N. ; ROBBINS W.E.; THOMPSON M.J. and DUTHY S.R., 1975 - 26-Hydroxyecdysone: new insect molting hormone from the egg of the tobacco hornworm.
Science 180 : 307 - 308.
- KAPLANIS J.N.; DUTHY S.R.; ROBBINS W.E.; THOMPSON M.J.; LINDQUIST E.; HORN, D.H.S. and GALBRAITH M.N., 1975 - Mysterone A: A 28 carbon hexahydroxy molting hormone from the embryo of the milkweed bug.
Science 190 : 681 - 682.
- KING D.S. and MARKS E.P., 1974 - The secretion and metabolism of ecdysone by cockroach (*Leucophaea maderae*) tissues in vitro.
Life science 15 : 147 - 154.
- KING D.S.; BOLLENBACHER W.E.; BORST W.E.; VEDECKIS W.V.; OCONNOR J.D.; ITTYCHERIAH P.I. and GILBERT I.I. , 1974 - The secretion of ecdysone by the prothoracic glands of *Manduca sexta* in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 : 793 - 796.

- LAGUEUX M.; HIRN M. and HOFFMANN J.A., 1977 - Ecdysones during ovarian development in *Locusta migratoria*.
J. Insect. Physiol. 23 : 109 - 119.
- LAFONT R.; DELBECQUE J.P.; De HYS L.; MAUCHAMP B. et PENNETIER J.L.,
1974 - Etude du taux de B. ecdysone dans l'hémolymphe
de *Pieris brassicae* L. (*Lepidoptera*) au cours du stade
nympheal.
C.R. Acad. Sc. Paris t. 279 Série D : 1 911 - 1 914.
- LAFONT R.; SOMME-MARTIN G.; MAUCHAMP B.; MAUME F. et BELBECQUE J.P.,
1980 - Analysis of ecdysteroids by HPLC and coupled gas
liquid chromatography mass spectrometry in "Progress
in Ecdysone Research".
- LEGAY J.M.; CALVEZ B.; HIRN M. and De REGGI M., 1976 - Ecdysone and
oocyte morphogenesis in *Bombyx mori*.
Nature 226 : 489 - 490.
- MIZUNO T. and OHNISHI E., 1975 - Conjugated ecdysone in the egg
silkworm, *Bombyx mori*.
Development Growth Di. 17 : 219 - 225.
- MORGAN E.D. and POOLE C.D., 1977 - Chemical control of insect moulting.
Comp. Biochem. Physiol. 57B : 99 - 109.
- NAKANISHI K.; MORIYAMA M.; OKANCHI F.; FUJIOKA S. and KORREDA M.,
1972 - Biosynthesis of ecdysone and ecdysone from
cholesterol outside the prothoracic gland in *Bombyx
mori*.
Science 176 : 51 - 52.
- OHTAKI T. and TAKAHASHI M., 1972 - Induction and termination of pupal
diapause in relation to the change of ecdysone titer in
the fleshy fly, *Sarcophaga peregrina*.
Jap. J. Med. Sci. Biol. 25 : 369 - 376.

ROMER F., 1973 - Moulting hormone content in prothoracic gland and oenocytes of *Tenebrio molitor* within a moulting cycle.

Experientia 29 : 1 417 - 1 418.

RAO K.D.R.; NORRIS D.M. and CHU H.M., 1981 - Ecdysteroids during pupal development of female *Xyleborus ferrugineus* Ent. exp. appl; 30 : 151 - 156.

STUDINGER G. and WILLIG A., 1975 - Biosynthesis of ecdysone in isolated abdomens of larve of *Musca domestica* J. Insect Physiol. 21 : 1 791 - 1 798.

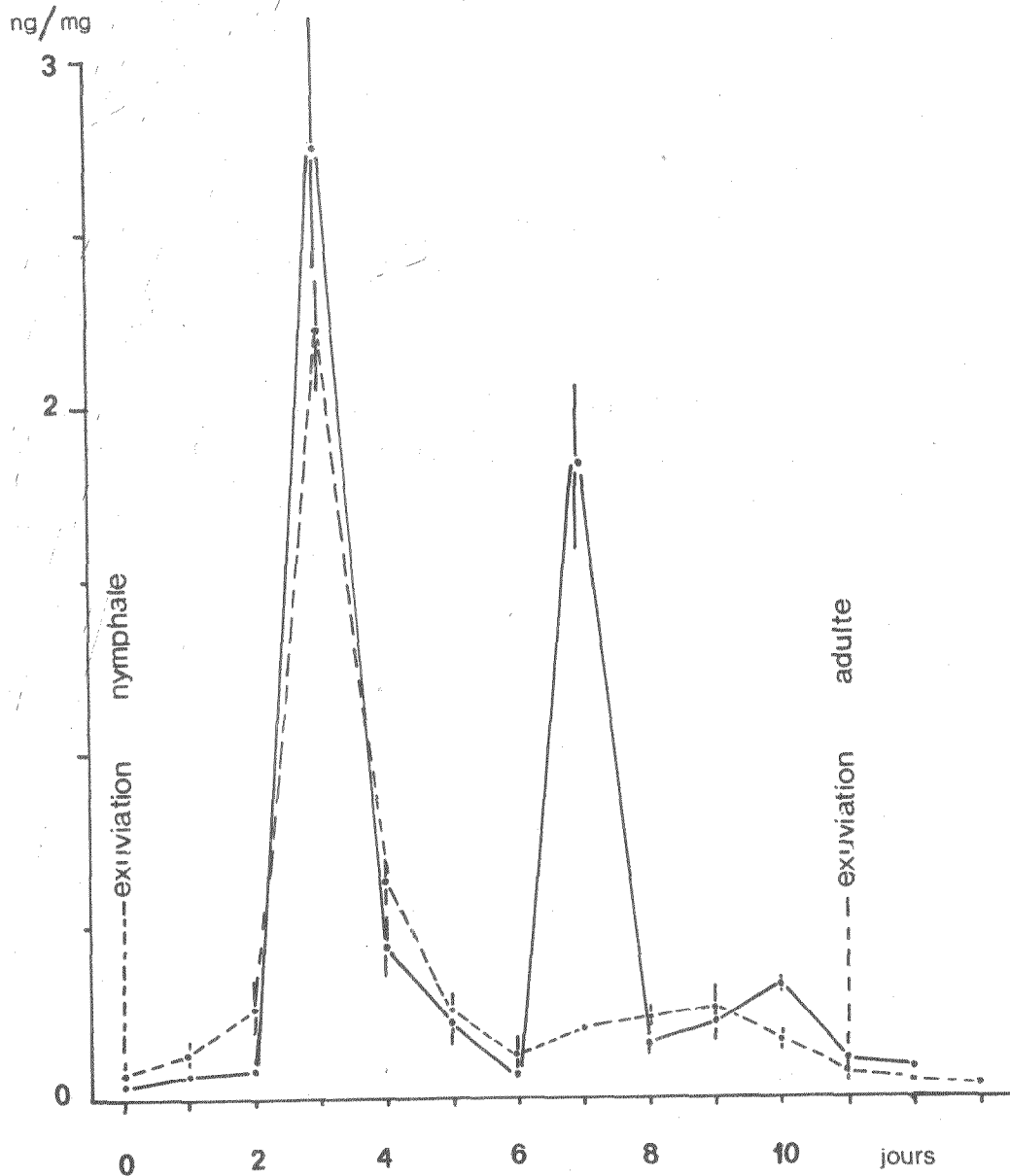


Figure 1. Evolution des taux d'ecdystéroïdes exprimés en ng d'équivalent 20-hydroxyecdysone par mg de poids du corps durant le développement nymphal chez les chrysalides femelles (—) et les chrysalides mâles (---). Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type établie sur 3-5 échantillons, chaque échantillon est analysé en duplicat.

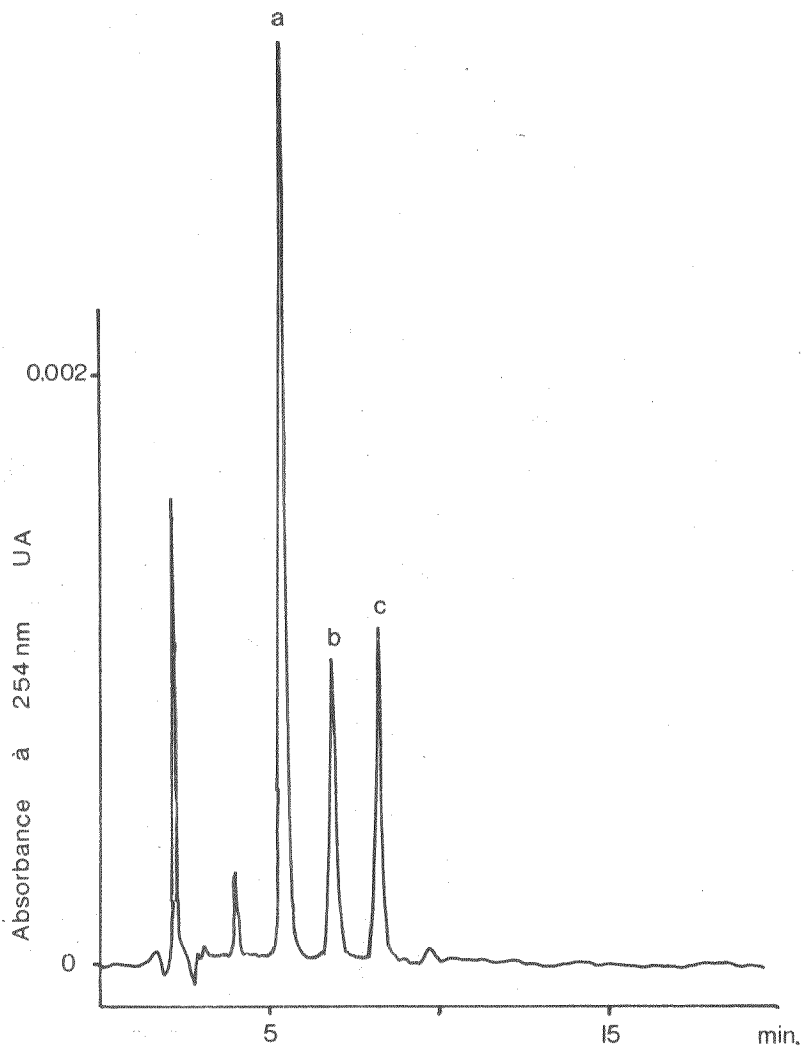


Figure 2. Séparation de diverses hormones standards: 20-hydroxyecdysone (a), Makistérone (b) et Ecdysone (c) dans une colonne RP-18 (solvant: méthanol-eau 50/50 et débit : 1 ml/mn).

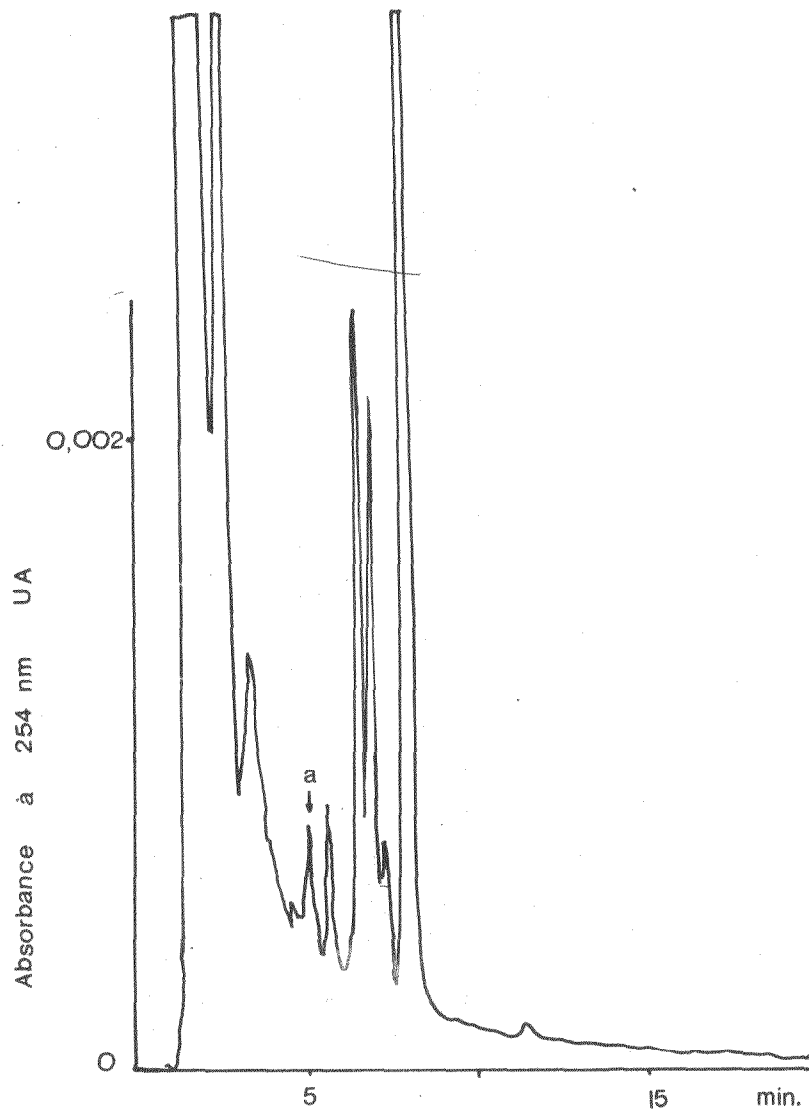


Figure 3. Analyse par HPLC d'un pool de chrysalides femelles âgées de 3 jours. Le pic (a) présente le même temps de rétention (5,19 mn) que la 20-hydroxyecdysone.

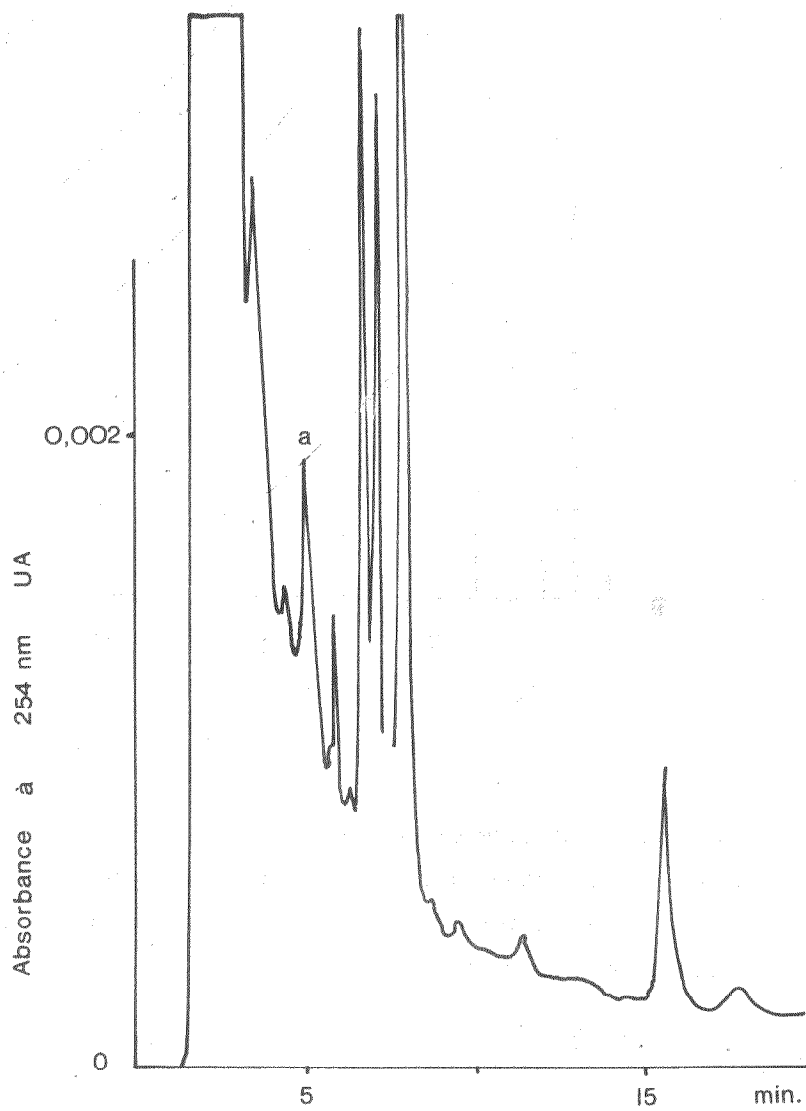


Figure 4. Analyse par HPLC d'un pool de chrysalides femelles âgées de 7 jours. Le pic (a) représente la 20-hydroxyecdysone.

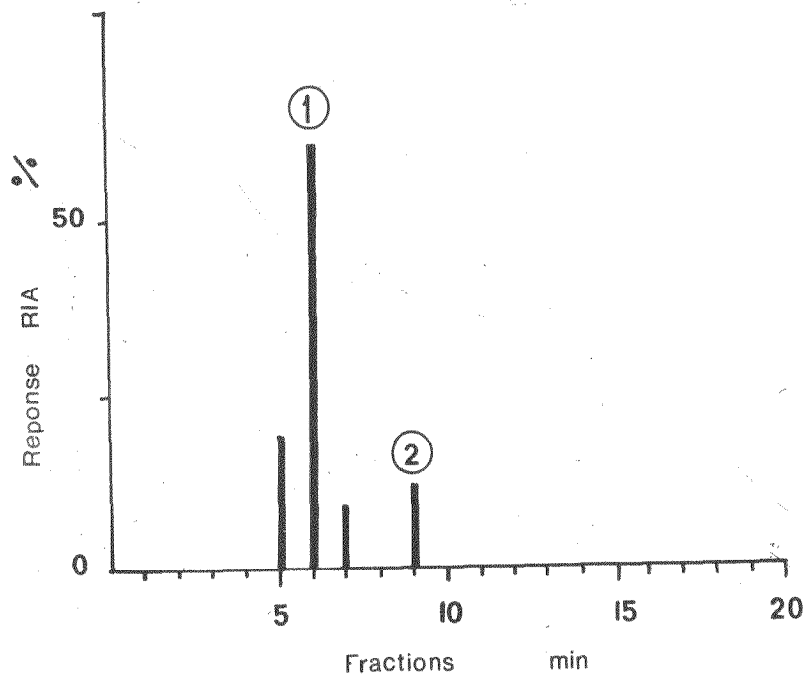


Figure 5. Immunoréponse des fractions collectées après HPLC d'extraits de chrysalides femelles âgées de 3 jours. Le produit 1 correspond à la 20-hydroxyecdysone et le produit 2 à l'ecdysone.