

**NATURE ET TAUX DE L'HORMONE DE MUE CHEZ
Thaumetopoea pityocampa (LEPIDOPTERA) :
CORRELATIONS AVEC LE CYCLE CUTICULAIRE**

**ARIBI Nadia SOLTANI Nourredine
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMAL
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE
UNIVERSITE DE ANNABA 23000 - EL-HADJAR - B.P. 12**

RESUME

Un dosage qualitatif et quantitatif des ecdystéroïdes a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance et radioimmunologie chez les larves de *Thaumetopoea pityocampa* Schiff (Lepidoptera, Thaumetopoeidae). Il a été mis en évidence la présence de deux principales hormones, l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone. De plus, l'évolution des taux hormonaux au cours du stade larvaire montre la présence d'un seul pic d'ecdystéroïdes. Les corrélations hormonales avec les événements cuticulaires ont été également recherchées.

1. INTRODUCTION

Thaumetopoea pitycampa (Lepidoptera, Notodontidae) appelée communément Processionnaire du Pin représente une menace importante pour les forêts de Pins en Algérie.

La Physiologie de l'insecte constitue actuelle un élément essentiel dans le développement d'insecticides plus ou moins sélectifs, en vue d'assurer un contrôle raisonné des déprédateurs.

Quelques aspects physiologiques ont déjà été abordés notamment, les protéines hémolymphatiques (LAMY, 1972) et cuticulaire (LAMY et al., 1986) et le métabolisme des stéroles (DENNEULIN, 1976).

En Algérie, l'étude de *T. pityocampa* a porté sur la biologie, les moyens de lutte (KADIK et HAMMOUDI, 1976) et les dégâts causés dans les régions de Médea (BRAHAMI, 1976), Djelfa (ABERKANE, 1977 ; BENHADJ, 1986) et Batna (BERTELLA, 1981).

Le présent travail a pour objectif de préciser, d'une part, la nature et les taux de l'hormone de mue dans l'hémolymphe des larves de la processionnaire du Pin, et, d'autre part, d'établir d'éventuelles corrélations avec le cycle cuticulaire.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. *Elevage en laboratoire*

Les chenilles de *T. pityocampa* sont récoltées dans la forêt de ZAROURIA (Wilaya de Souk-Ahras) puis déposées dans des jarres en verre d'une hauteur de 27 cm et d'un diamètre de 7 cm. Les jarres sont fermées à l'aide d'un tulle retenu par un élastique et placées dans des conditions ambiantes du laboratoire. Les larves sont régulièrement nourries avec des aiguilles fraîches de Pin.

Cet élevage est rigoureusement surveillé, les larves ayant subi une mue sont retirées au fur et à mesure et mises dans de nouvelles jarres pour permettre la datation des animaux. Celle-ci est exprimée en jours après l'exuviation larvaire.

2.2. *Extraction et dosages des ecdystéroïdes*

Trois microlitres d'hémolymphe sont prélevés sur des chenilles L4 à des âges précis. Les échantillons d'hémolymphe sont conservés dans 0,5 ml de méthanol absolu à - 20 C jusqu'à l'extraction.

Après sonication et centrifugation, le surnageant est évaporé sous-vide et l'extrait sec obtenu est dissout dans 0,4 ml de tampon citrate (0,1 M ; pH 6,2) et dosé en duplicat par radioimmuno-dosage (R.I.A.) selon DE REGGI et al., (1975).

La nature des ecdystéroïdes est déterminée en combinant la chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.) et le R.I.A. L'extraction et la purification sont faites selon la technique de LAFONT et al., (1982).

L'extrait est analysé par un appareil H.P.L.C. waters. Une colonne type Spherisorb ODS2 phase inverse a été utilisée avec un débit de 0,8 ml/mn de méthanol à 49 % dans l'eau pendant 20 mn, puis purgée dans du méthanol pur pendant 10 mn avant le retour aux conditions initiales. La pression est d'environ 2700 Psi.

Les fractions collectées sont ensuite évaporées, et, les extraits secs sont repris dans du tampon citrate par le R.I.A. Le comptage de la radioactivité dans chaque chambre de dialyse, permet de déterminer la quantité d'hormones biologiques existantes dans chaque échantillon d'hémolymphe, par référence, à une courbe d'étalonnage. Les anticorps utilisés ont 2,5 fois plus d'affinité pour l'ecdysone que pour la 20-0h - ecdysone.

2.3. Techniques histologiques

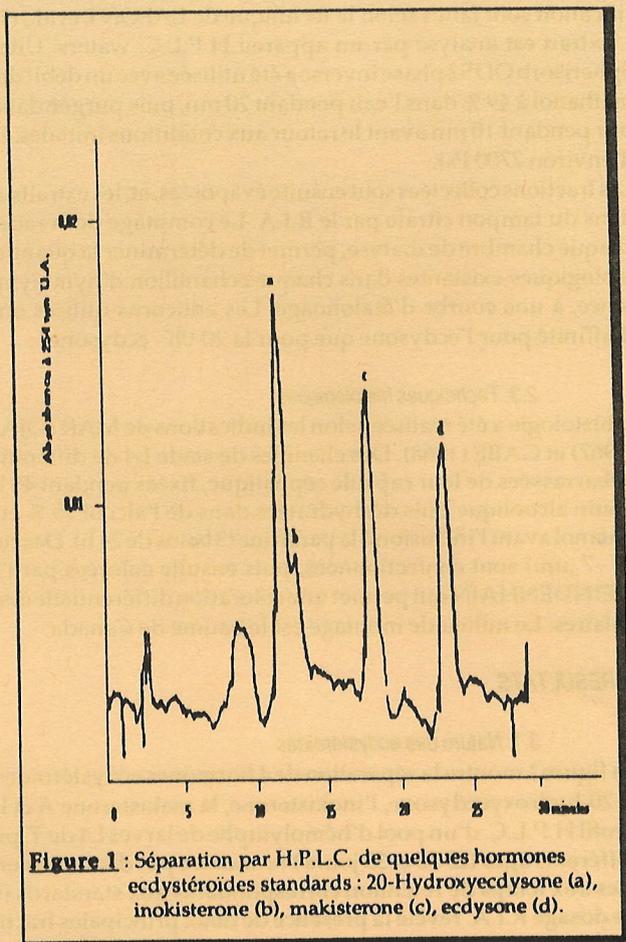
L'histologie a été réalisée selon les indications de MARTOJA et MARTOJA (1967) et GABE (1968). Des chenilles de stade L4 de différents âges ont été débarrassées de leur capsule céphalique, fixées pendant 48 heures dans le bouin alcoolique puis déshydratées dans de l'alcool 95 % et mises dans le butanol avant l'inclusion à la paraffine (3 bains de 24 h). Des coupes sagittale (5 - 7 ,um) sont confectionnées, puis ensuite colorées par l'azocarmin de HEINDENHAIN qui permet une coloration différentielle des couches cuticulaires. Le milieu de montage est le baume de Canada.

3. RESULTATS

3.1. Nature des ecdystéroïdes

La figure 1 montre la séparation de 4 hormones ecdystéroïdes de référence, la 20-hydroxyecdysone, l'inokisterone, la makisterone A et l'ecdysone. Le profil H.P.L.C. d'un pool d'hémolymphe de larves L4 de *T. pityocampa*, de différents âges (25 30 et 35 jours) ne montre pas distinctement d'éventuels pics aux temps de rétention correspondants aux standards (fig. 2).

Le dosage R.I.A. révèle la présence de deux principales fractions immuno-réactives, très proches des temps de rétention de la 20-hydroxyecdysone (12-13 mn) et de l'ecdysone (23-25 mn). La correction des taux d'ecdystéroïdes, selon leur courbe de référence respective et suivant leur affinité aux anticorps, donne la composition suivante 37,7 % pour la 20-hydroxyecdysone et 39-1 % pour l'ecdysone (fig. 3).



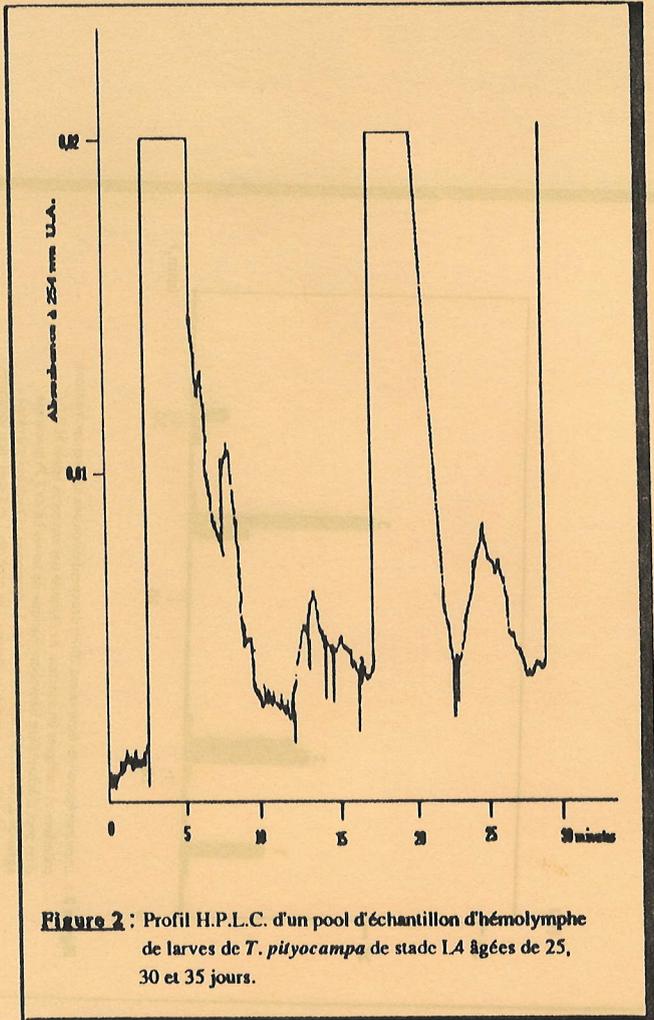


Figure 2 : Profil H.P.L.C. d'un pool d'échantillon d'hémolymphe de larves de *T. pityocampa* de stade L4 âgées de 25, 30 et 35 jours.



Figure 3 : Immunoréponse en équivalent 20-Hydroxyecdysone des différentes fractions collectées et corrigées en fonction de l'affinité des anticorps après H.P.L.C. d'un pool d'échantillon hémolymphatique de larves L4 de *T. Pygocampa* âgées de 25, 30 et 35 jours. Le produit 2 correspond à l'hydroxyecdysone. Le produit 3 correspond à l'ecdysone. Les produits 1 et 4 sont non identifiés.

3.2. Evolution des taux d'ecdystéroïdes

Les taux d'ecdystéroïdes déterminés par R.I.A. dans l'hémolymphe des larves de *T. pityocampa* de stade L4, sont exprimés en ng d'équivalents 20-hydroxyecdysone par ml d'hémolymphe.

Les valeurs d'ecdystéroïdes enregistrées, en début de stade L4 qui dure 45 jours dans les conditions expérimentales sont de l'ordre de 85 ng/ml puis diminuent significativement entre 10 et 15 jours. On observe ensuite, une élévation significative des taux, aussi bien à 20 jours qu'à 25 jours, où est enregistrée une valeur maximale de 700 ng/ml. Après 25 jours, les valeurs diminuent d'une façon significative jusqu'à atteindre 5 ng/ml à 40 jours (Fig. 4).

3.3. Cycle cuticulaire

L'évolution de l'épaisseur de la cuticule totale au cours du stade larvaire L4 a été étudiée. A l'exuviation larvaire L4, l'épaisseur de la cuticule totale est de 7 , μ m, puis atteint une valeur maximum d'environ 21 , μ m à 20 jours, période qui coïncide avec l'apolyse. On observe ensuite une diminution de l'épaisseur de la cuticule totale correspondant à la digestion des couches cuticulaires profondes, et ce, jusqu'à atteindre une épaisseur de 12 , μ m peu avant l'exuviation larvaire L5. La synthèse de la cuticule préexuviale larvaire L5 colorée en rouge par l'azan débute après l'apolyse et présente à la veille de l'exuviation L5 une épaisseur de 7 , μ m environ (Fig. 5).

3.4. Corrélation des taux d'ecdystéroïdes avec le cycle cuticulaire

Les taux d'ecdystéroïdes montre un seul pic à 25 jours qui coïncide avec l'apolyse et le début de la synthèse cuticulaire préexuviale. Après 25 jours, il apparait une baisse dans les taux d'ecdystéroïdes, cette période correspond à la suite de la synthèse de la nouvelle cuticule. Le dépôt de cette dernière se poursuit sous des taux d'ecdystéroïdes relativement faibles.

L'apolyse intervient avec la montée des taux d'ecdystéroïdes tandis que l'initiation et la synthèse cuticulaire avec le pic hormonal.

Taux (10^2 ng/ml)

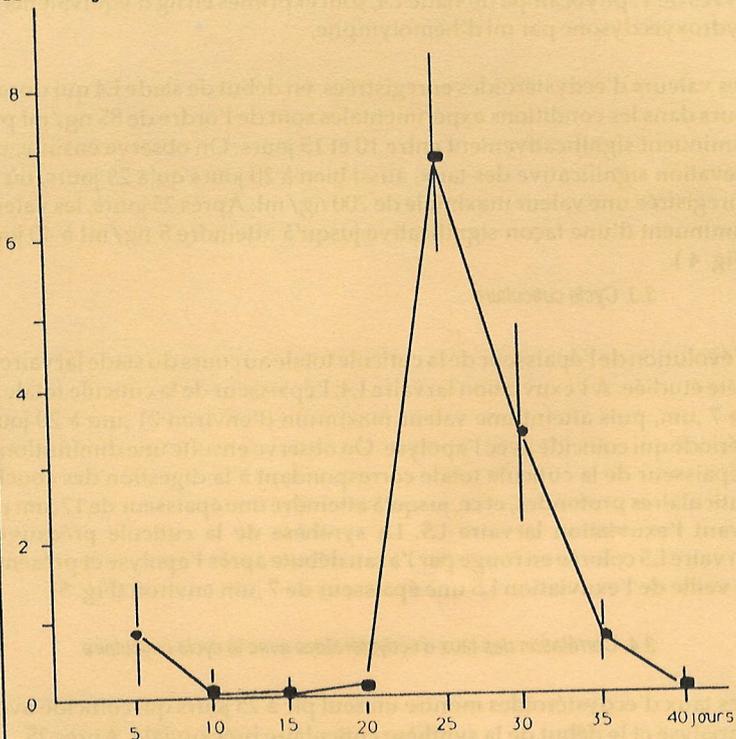
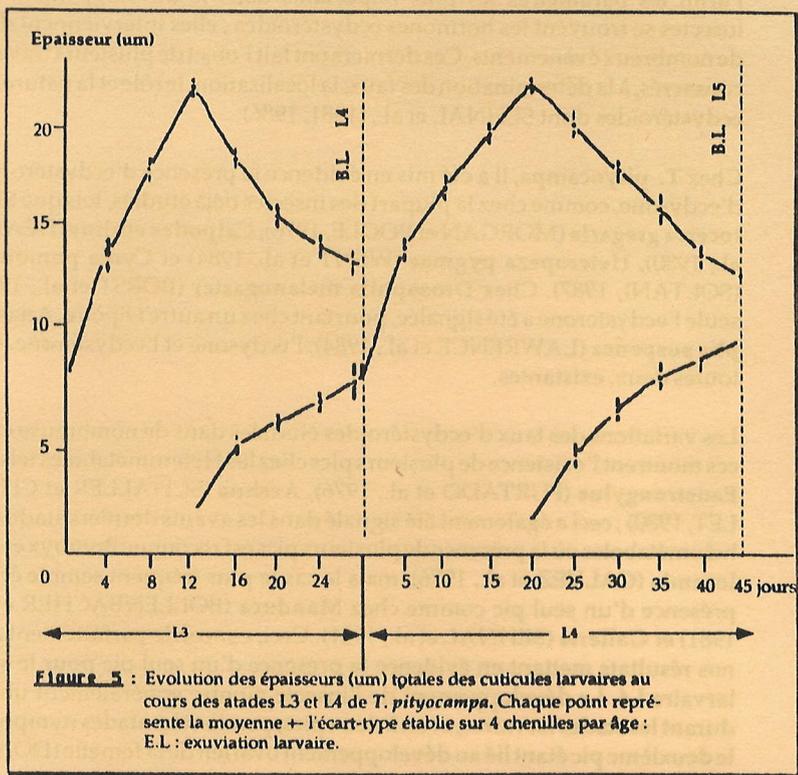


Figure 41 Taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques (ng/ml) au cours du stade larvaire LA de *T. pityocampa*. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type établie sur 4 chenilles par âge.



5. DISCUSSION

Parmi les paramètres les plus importants dans le développement des insectes se trouvent les hormones ecdystéroïdes ; elles interviennent dans de nombreux évènements. Ces derniers ont fait l'objet de plusieurs travaux, consacrés, à la détermination des taux, la localisation, le rôle et la nature des ecdystéroïdes dont SEHNAL et al., (1981, 1986).

Chez *T. pityocampa*, il a été mis en évidence la présence d'ecdystérone et d'ecdysone, comme chez la plupart des insectes déjà étudiés, tels que *Shistocerca gregaria* (MORGAN et POOLE, 1976), *Calpodes ethlius* (DEAN et al., 1980), *Heteropeza pygmae* (WENT et al., 1984) et *Cydia pomonella* (SOLTANI, 1987). Chez *Drosophila melanogaster* (BORST et al., 1974), seule l'ecdystérone a été signalée, pourtant chez un autre Diptère, *Anastrepha suspensa* (LAWRENCE et al., 1984), l'ecdysone et l'ecdystérone, sont toutes deux, existantes.

Les variations des taux d'ecdystéroïdes étudiées dans de nombreuses espèces montrent l'existence de plusieurs pics chez les Heterométaboles tels que *Panstrongylus* (FURTADO et al., 1976), *Aeshna* (SCHALLER et CHARLET, 1980) ; ceci a également été signalé dans les avants derniers stades des holométaboles où la présence de plusieurs pics est reconnue *Bombyx* et *Philosamia* (CALVEZ et al., 1976), mais le cas le plus fréquent semble être la présence d'un seul pic comme chez *Manduca* (BOLLENBACHER et al., 1981) et *Galleria* (SEHNAL et al., 1981). Ceci, concorde parfaitement avec nos résultats mettant en évidence la présence d'un seul pic pour le stade larvaire L4. Le développement de l'insecte montre généralement un pic, durant les stades larvaires, et un à deux pics, pendant les stades nymphaux, le deuxième pic étant lié au développement ovarien de la femelle (DOANE, 1973).

Le cycle cuticulaire de *T. pityocampa* rappelle celui des autres insectes tels que *Pieris* (MAUCHAMP, 1980), *Tenebrio* (DELBECQUE et al., 1978) et *Cydia* (SOLTANI, 1987).

La corrélation entre les taux d'ecdystéroïdes et l'apolyse est plus délicate ; l'apolyse se produit en général tout au début de la montée des taux hormonaux et elle est complétée à des taux élevés comme chez *Manduca* (SEDLAK et GILBERT, 1979) et *Calpodes* (DEAN et al., 1980). Ceci se retrouve également chez *T. pityocampa*.

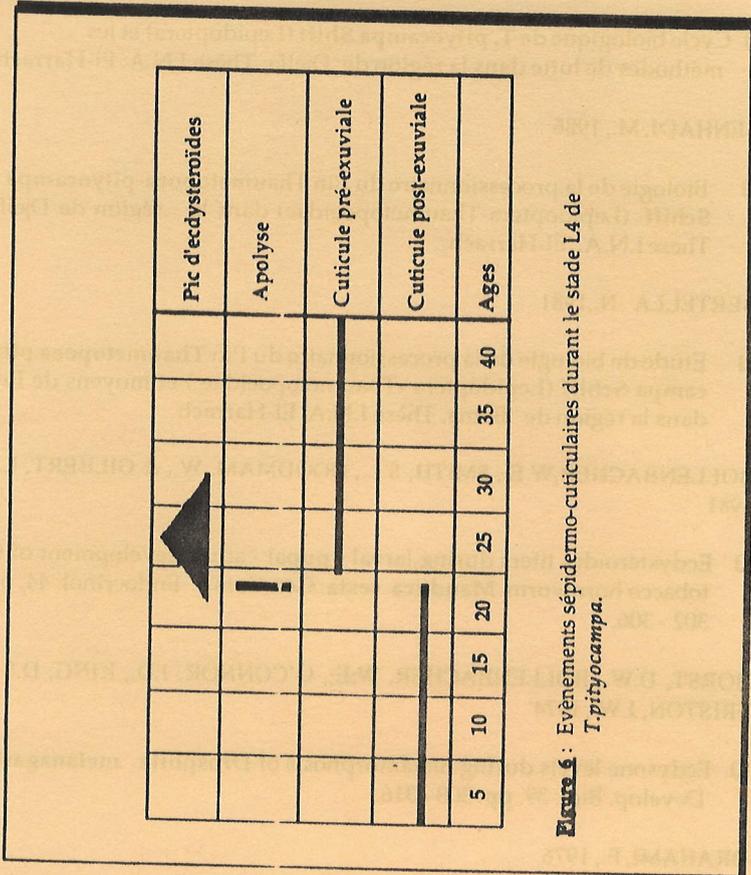


Figure 6 : Evènements sépidermo-cuticulaires durant le stade L4 de *T. pityocampa*.

BIBLIOGRAPHIE

ABERKANE, M., 1977

- Cycle biologique de *T. pityocampa* Schiff (Lepidoptera) et les méthodes de lutte dans la région de Djelfa. Thèse I.N.A. El-Harrach.

BENHADJ, M., 1986

- Biologie de la processionnaire du Pin *Thaumetopoea-pityocampa* Schiff (Lepidoptera-Thaumetopoeidae) dans la région de Djelfa. Thèse I.N.A. El-Harrach.

BERTELLA N., 1981

- Etude de biologie de la processionnaire du Pin *Thaumetopoea pityocampa* Schiff (Lepidoptera -Thaumetopoeidae) et moyens de lutte dans la région de Batna. Thèse I.N.A. El-Harrach.

BOLLENBACHER, W.E., SMITH, S.L., GOODMAM, W., & GILBERT, L.I., 1981

- Ecdystéroïdes titers during larval - pupal - adult development of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Gen.Comp. Endocrinol. 44, pp. 302 - 306.

BORST, D.W., BOLLENBACHER, W;E., O'CONNOR, J.D., KING, D.S. & FRISTON, J.W., 1974

- Ecdysone levels during métamorphosis of *Drosophila melanogaster*, Develop. Biol. 39, pp. 308 - 316.

BRAHAMI, F., 1976

- Contribution à l'étude biologique et à la destruction de la processionnaire du pin dans la région de Médéa. Thèse I.N.A. Alger.

CALVEZ, B., HIRN, M. & DE REGGI, M., 1976

- Ecdysone changes in the haemolymph of two silkworms, (*Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*) during larval and pupal development. F E B S Letters 71 - pp. 57 - 61.

DEAN, R.L. BOLLENBACHER W.E., LOCKE, M., SMITH, S.L., & GILBERT, L.I., 1980

- Haemolymph ecdysteroids levels and cellular events in the intermoult/moult séquence of *Calpodès ethlius*. *J. Insect Physiol.* 26 pp. 267 - 280.

DELBECQUE, J.P., HIRN, M., DELACHAMBRE, J. & DE REGGI, M., 1978

- Cuticular cycle and molting hormone levels during the métamorphosis of *Tenebrio molitor* L. (*Insecta Coleoptera*). *Devel. Biol.* 64, pp. 11 - 30.

DENNEULIN, J.C., 1976

- Les Sterols de la processionnaire du pin. Quelques aspects de leur métabolismes. Effet d'un insecticide de synthèse. Thèse 3 Cycle, Bordeaux.

DE REGGI, M.L., HIRN, M.H. & DELAAGE, M.A., 1975

- Radioimmunoassay of ecdysone. An application to *Drosophila* Larvae and pupae, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 66 : 1307 - 1315.
DOANE, W.W., 197

- Rôle of hormones in insect developpement. In *Developmental Systems : Insects*. (S.J. Counce and C.H. Waddington, edo). Vol. 2, pp. 291 - 497, Academic Press, London and New-York.

FURTADO, A., PORCHEROND P., & DRAY, F., 1976

- Evolution du taux des ecdysones au cours des deux dernières intermue de *Panstrongylus megistrus* (*Heteroptera - Reduviidae*). *C.R. Acad. Sci. Paris* 283 (D) pp. 1077 - 1080.

GABE, M., 1968

- Techniques histologiques. Editions Masson & Cie, Paris VI.

HIRN, M., HETRU, C., LAGUEUX, M., & HOFFMANN, J.A., 1979

- Prothoracid gland activity and blood titres of ecdysone and ecdysterone during the last larval instar of *Locusta migratoria* L. *J. Insect Physiol.* 25, pp. 255 - 261.

KADIK, B. et HAMOUDI, A., 1976

- La processionnaire du pin. Biologie et Moyens de lutte. Thèse I.N.A. - El-Harrach.

LAFONT, R., PENNETIER, J.L., ANDRIANJAFINTIMO, M., CLARET, J., MODE, J.F., & BLAIS, C. 1982

- Sample processing for high performance liquide chromatography of ecdysteroids. *J. chromatogr.* 236, 137-149.

LAMY, M., 1972

- Les protéines de l'hémolymphe de la processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa* Schiff (Lepidoptera). Variations des chromoprotéines au cours du cycle biologique annuel. *Bull. Soc. Zool. F.T.* 97 n 3.

LAMY, M., PASRUREAUD, M.H., NOVAK, F., DUCOMBS, G., VINCENDEAU, P., MALEVILLE, J. & TEXIER, L., 1986

- Thaumetopoein: An urticating Protein from the hairs and integument of the pine processionary caterpillars (*Thaumetopoea pityocampa*) Schiff, Lepidoptera, Thaumetopoeidae. *Toxicon*, vol. 24 n 4 pp. 347-356 Pergamon Press, Great Britain.

LAWRENCE, P.O., HAGEDORN, H.H., & WHEELLOCK, G., 1984

- Ecdysteroids levels and integument changes in post-embryonic Stages of *Anastrepha suspensa* J. *insect Physiol.* vol 30, n 9, pp. 713 - 719.

MARTOJA, R. ET MARTOJA, M., 1967

- Initiation aux techniques de l'histologie animale. Editions Masson et Cie, Paris VI.

MAUCHAMP, M., 1980

- Aspects ultrastructuraux biochimiques et endocrines de la différenciation des formations épidermiques chez *Pieris brassicae*, Publications E.N.S., 16, Paris.

SCHALLER, F. & CHARLET, M., 1980

- Neuroendocrine control and rate of ecdysone biosynthesis in larvae of a Paleopteran insect: *Aeshna cyanea* Müller. In Progress in Ecdysone Research, J.A. HOFFMANN, Ed. Elsevier/North-Holland, pp. 99 - 110.

SEDLAK, B.J. & GILBERT, L.I., 1979,

- Corrélation between épidermal cell structure and endogenous hormone titers during the fifth larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Tissu et Cell*, 11, pp. 643- 653

SEHNAL, F, MAROY, P. & MALA, J. , 1981.

- Régulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in *Lepidoptérous Larvae and pupae*. *J. Insect physiol.* 27, pp. 535- 544.

SEHNAL , F. , DELBECQUE , J.P. , MAROY , P. , & MALA , J. 1986

- Ecdysteroid titers during larval life and métamorphosis of *Galleria melonella* *Insect. Biochem.* Vol 16,n 1, pp. 157-162.

SOLTANI , N. , DELBERCQUE , J.P. SOLTANI ,

- Effet d'un régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur le développement et la reproduction de deux insectes: *Tenebrio molitor* et *Cydia pomonella* L. (*Lepidoptères*).
Thèse d'Etat. Lab. Zoologie - Université de Dijon- France.