

## **Chapitre 1**

### **L'écologie chimique des relations plantes – insectes**

#### ***Introduction***

Les relations entre les espèces entomologiques et les plantes hôtes sont conditionnées par différents caractères physiques des végétaux tels que la taille, la forme, la présence de cires épicuticulaires et de trichomes, le stade phénologique et la couleur de la plante (Mangold, 1978; Berenbaum, 1995) mais aussi par des facteurs chimiques tels que la présence de métabolites secondaires (Vet et Dicke, 1992; Harborne 1993). Ces substances chimiques ne participent pas aux processus physiologiques primaires mais jouent un rôle primordial dans les interactions interspécifiques (Berenbaum, 1995). Le rôle de ces molécules chez des organismes n'appartenant pas à la même espèce est directement lié à la nature particulière de ces substances et à leur distribution limitée. En effet, si la plupart des organismes utilisent efficacement les métabolites primaires pour assurer les fonctions vitales, les mécanismes plus spécifiques (de production et d'accumulation) impliquant les molécules secondaires font souvent défaut. La présence de ces dernières dans des taxa particuliers implique des synthèses particulières, des processus de transport et de stockage dans des organites cellulaires bien spécialisés non communément répandus. Un système d'activation ou de libération des substances secondaires est aussi généralement présent chez les plantes qui produisent ces molécules lorsque le végétal subit des dégâts comme des attaques par des ravageurs phytophages (Berenbaum, 1995). De nombreuses classes de toxines ont notamment été recensées

au sein des espèces végétales (Harborne, 1993). La majorité des plantes ont la capacité de se défendre face à l'attaque des phytophages qui leur sont inféodés. Certaines toxines sont dangereuses pour tous les animaux, phytophages ou non, d'autres ont des organismes cibles bien spécifiques. La réponse de l'animal varie donc considérablement en fonction de l'espèce considérée. Certains insectes peuvent s'adapter à différentes classes de métabolites secondaires, ils peuvent également s'en servir comme précurseurs de phéromones ou de substance de défense. Douze classes de toxines produites par les plantes peuvent être utilisées par les ravageurs phytophages et être stockées pour se protéger de leurs prédateurs naturels (Tableau 1; Harborne, 1993).

Tableau 1 : Classes de métabolites secondaires retrouvés dans divers organismes (Harborne 1993)

<b>Classes de substances secondaires</b>	<b>Exemples de molécules</b>	<b>Organismes hôtes</b>
Aflatoxines	Aflatoxine B1	<i>Aspergillus flavus</i>
Alcaloïdes	Senecionine	<i>Senecio jacobaea</i>
Furanocoumarines	Xanthotoxine	<i>Pastinaca sativa</i>
Glucosinolates	Sinigrine	<i>Brassica sp</i>
Glycosides cyanogéniques	Linamarine	<i>Lotus corniculatus</i>
Iridoïdes	Aucubine	<i>Aucuba japonica</i>
Isoflavonoïdes	Roténone	<i>Derris elliptica</i>
Lectines	Phytohaemagglutinine	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Polyacétylènes	Oenanthetoxine	<i>Oenanthe crocata</i>
Quinones	Hypéricine	<i>Hypericum perforatum</i>
Saponines	Acide médicagénique	<i>Medicago sativa</i>
Sesquiterpène lactones	Hymenovine	<i>Hymenoxys odorata</i>

Le sélection des plantes hôtes par les insectes, tant phytophages que leurs prédateurs et leurs parasites, doit être considéré dans un contexte évolutif global (Dicke, 2000). L'équilibre observé aujourd'hui résulte notamment de l'interaction plantes - insectes qui est dynamique. A chaque instant, la plante ou l'insecte peut acquérir un nouvel avantage. Les deux types de protagonistes, le ravageur et le végétal, s'adaptent de manière différente aux conditions changeantes. D'autres pressions environnementales (comme le microclimat) peuvent aussi avoir un effet dans ces interactions en influençant les cycles de développement et de croissance tant des ravageurs que des plantes hôtes (Schoonhoven, 1981). La plante, source de nourriture pour les insectes, a évolué en limitant sa destruction par les phytophages. Le moyen de défense le plus significatif est la présence de composés chimiques dans la plante. La réduction des attaques d'insectes peut être due à une diminution de la valeur nutritive ou à la présence de toxines, de substances répulsives ou d'un goût déplaisant dans les tissus de la plante (Vet et Dicke, 1992 ; Harborne, 1993). Les insectes ont évolué face à ces systèmes de défense chimique végétale. Etant des organismes très spécialisés, l'entomofaune a une large gamme de réponses disponibles. Les insectes peuvent s'adapter biochimiquement en développant des mécanismes de détoxification qui leur permettent de neutraliser la toxicité de certaines substances (Yu, 1984 ; Yu et Hsu, 1993). Des adaptations anatomiques peuvent également être initiée pour assimiler de nouvelles nourritures végétales. Les ravageurs peuvent développer de nouvelles habitudes alimentaires (Dethier, 1982; Monge et Cortesero, 1996), s'adapter à un nouveau goût (Harborne, 1993). Une co-évolution s'est opérée entre les insectes et

les plantes auxquelles ils sont inféodés. La plupart des insectes se sont plus ou moins spécialisés à certaines espèces d'une famille botanique. Si des généralistes, aussi appelés des polyphages, se sont aussi développés, la grande majorité des insectes phytophages sont oligophages et se nourrissent d'un nombre limité d'espèces appartenant à un ou plusieurs genre(s) ou famille(s) de plantes. Enfin, des monophages s'alimentent au dépens d'une seule espèce botanique et sont de loin les plus sélectifs, guidés par la présence de substances allélochimiques dans la plante.

### **Définition des sémiachimiques**

Il est utile de définir les termes employés pour caractériser les substances chimiques émises par la plante ou les insectes afin de distinguer les rôles respectifs de ces composés secondaires. Le terme « sémiachimique » caractérise de manière générale les substances chimiques, médiateurs des interactions entre organismes (Law et Regnier, 1971). Ces stimuli sont groupés en deux catégories distinctes : les phéromones et les substances allélochimiques selon que les interactions sont respectivement intra- ou interspécifiques (Figure 1). Les substances allélochimiques (Whittaker, 1970) sont classées en plusieurs catégories : les allomones, les kairomones, les synomones. Les allomones sont des substances produites ou acquises par un organisme et qui induisent chez l'espèce réceptrice une réponse comportementale ou physiologique favorable à l'organisme émetteur et non à l'individu récepteur (Brown, 1968).

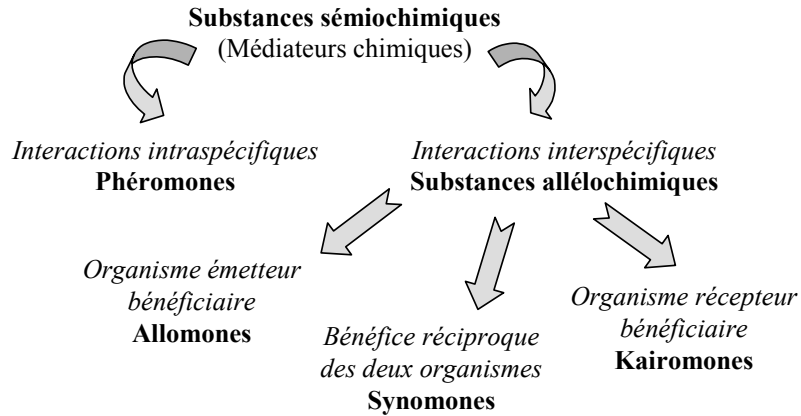


Figure 1 : Schéma représentant les différentes catégories de médiateurs chimiques

Au contraire, les kairomones sont bénéfiques au récepteur du stimulus et non à l'émetteur. Lorsque le bénéfice du médiateur chimique n'est pas précisément déterminé, comme c'est le cas dans les interactions hôte – parasite ou prédateur – proie, le terme allélochimique est généralement préféré. Certaines substances stimulent la nutrition ou l'oviposition d'un nombre limité d'espèces de phytophages sur une plante et fonctionnent également comme répulsif de nombreuses autres espèces ravageurs de cette plante. Lorsque cette substance joue le rôle de stimulant, c'est une kairomone alors qu'elle est une allomone lorsqu'elle est répulsive.

Le terme « synomone » est quant à lui utilisé lorsque le médiateur chimique est responsable d'interactions mutuelles (Nordlund et Lewis, 1976). L'effet favorable de cette substance se traduit chez l'émetteur et le récepteur. C'est notamment le cas dans les relations symbiotiques.

## ***Implications des substances sémiochimiques dans l'interaction plantes – insectes***

Différentes théories ont été formulées depuis plus de 40 ans afin d'expliquer la production de métabolites secondaires par les plantes comme moyen de défense chimique contre les attaques des ravageurs phytophages (Berenbaum, 1995). Parmi les diverses théories proposées, aucune n'est rejetée, elles coexistent en se basant sur certaines évidences observées dans divers cas étudiés séparément. Le fait que plusieurs théories soient régulièrement envisagées conjointement pour expliquer les interactions plantes – insectes est dû au fait qu'elles ne sont pas mutuellement exclusives les unes des autres et que certains éléments de chaque théorie peuvent être combinés. Il faut aussi noter que la présence de ces défenses chimiques sont rares chez les organismes des niveaux trophiques supérieurs de la chaîne alimentaire. En effet, la production de molécules secondaires n'est pas nécessaire chez les organismes qui présentent moins de risques à être consommés par d'autres. Au contraire, les organismes qui se déplacent peu ou lentement et qui ne peuvent éviter les attaques potentielles de leurs ennemis naturels, présentent des moyens de substances chimiques (Berenbaum, 1995). La plupart des plantes qui contiennent des substances secondaires sont fixées au sol et occupent le premier niveau dans les chaînes trophiques. Cependant, la production de substances sémiochimiques est coûteuse en énergie et toute activité de la plante répond à une situation de dilemme entre la croissance ou la défense contre les ravageurs phytophages (Herms et Mattson, 1992).

Fraenkel (1959) a été l'un des premiers à suggérer que des métabolites secondaires soient directement impliqués dans les comportements des insectes phytophages lors de la recherche de la plante hôte. Ehrlich et Raven (1964) ont ensuite proposé la théorie de la co-évolution biochimique, dans laquelle la synthèse de substances secondaires chez la plante hôte est spécifiquement liée à l'utilisation de ce végétal par les insectes phytophages. La production et l'accumulation de toxines sont suivies par une réponse physiologique de l'insecte (détoxication, stockage ou excrétion) qui lui permet de se nourrir au dépend de la plante produisant les molécules toxiques. Comme peu d'espèces d'insectes ont développé cette adaptation, un état d'équilibre se réalise entre les infestations de phytophages et les dégâts occasionnés à la plante. L'adaptation d'autres ravageurs à ces premières toxines végétales engendre une réponse de la plante : la synthèse d'un autre type de métabolites secondaires. Une autre génération d'insectes s'adapte à cette double protection de la plante. Cette théorie de co-évolution est basée sur les connaissances du comportement de nutrition des insectes phytophages : la majorité d'entre eux sont monophages ou oligophages.

L'impact de la pression de sélection exercée par les insectes phytophages sur la production de métabolites secondaires varie cependant suivant la théorie énoncée. Coley et al. (1985) ont suggéré que les ressources disponibles et le taux de croissance de la plante déterminent la composition et la quantité de métabolites secondaires

produites. L'implication des organismes phytophages est considérée comme secondaire.

La disponibilité du carbone et des autres nutriments pour la plante a également été envisagée comme facteur déterminant de la production de substances de défense (Bryant et al., 1983). En effet, les variations de teneurs en éléments nutritifs disponibles pour la plante, en fonction de l'habitat (nature du sol, climat), peuvent modifier la production des composés hydrates de carbone. Ces derniers, entrant dans la composition des métabolites secondaires de la plante, influencent la diversité et la quantité des substances de défense du végétal (Reichardt et al., 1991). D'autres théories se basent sur le critère de la structure chimique et l'origine de biosynthèse des métabolites secondaires de la plante hôte. Les composés à base carbonée (Bryant et al., 1983 ; Reichardt et al., 1991) sont considérés comme un groupe relativement homogène, excepté le fait qu'ils comprennent des molécules issues de différentes biosynthèses et présentant d'importantes variations d'activité envers les insectes. Les tissus végétaux à haute teneur en hydrates de carbone présentent des disponibilités en carbone plus élevées, ce qui permet la synthèse accrue par la plante de métabolites secondaires à base de carbone (Reichardt et al., 1991). Un autre groupe de substances secondaires est constitué des composés à base azotée. Cependant, la classification en fonction de cette base carbonée ou azotée ne prend pas en considération le fait que certaines substances secondaires à base azotée peuvent inclure un nombre d'atomes de carbone supérieur à celui de certaines molécules à base carbonée de petites tailles. De plus, les composés à base carbonée



peuvent nécessiter, lors de leur synthèse et de leur stockage, l'intervention d'un nombre plus élevé d'enzymes, de nature azotée, que les composés à base azotée.

Une autre théorie se focalise sur la facilité de métabolisation et de réutilisation des substances secondaires par la plante qui produit ces molécules défensives. Coley et al. (1985) différencient d'une part les métabolites de défense mobiles et immobiles dans l'organisme et d'autre part les substances accumulées en grande ou petite quantité (Feeny, 1976). La présence d'importantes concentrations d'une substance secondaire n'implique pas forcément une défense plus efficace. La présence de plusieurs molécules de natures chimiques différentes (même en faibles quantités) issues de plusieurs biosynthèses s'avère être un moyen de défense plus efficace que la surproduction d'un seul métabolite (Berenbaum, 1985).

Quelle que soit l'hypothèse avancée, le métabolisme qui génère et maintient cette diversité biochimique de plusieurs centaines de métabolites secondaires reste une énigme même si la production de nouvelles molécules peut notamment survenir suite à des accidents génétiques tels que des mutations ou des recombinaisons. Une partie de la variabilité chimique des plantes est considérée comme étant la conséquence des pressions de sélections antérieures (Jones et Firn, 1991; Firn et Jones, 1995).

Si la défense chimique confère un bénéfice et présente un coût énergétique pour l'organisme qui la présente, l'importance de cette

dépense d'énergie est source de conflit d'interprétation. Les hypothèses de disponibilité des ressources (Bryant et al., 1983; Coley et al., 1985) tient principalement en compte les coûts matériels de production alors que les théories basées sur la pression de sélection des ravageurs phytophages (Feeny, 1976 ; Rhoades et Cates, 1976 ; Rhoades, 1979 ; McKey, 1979) se focalisent sur le bénéfice accru pour l'organisme producteur du métabolite secondaire. Si un rapport doit être envisagé, il s'agit simplement de celui du bénéfice sur le coût de production. Le bénéfice engendré par une substance secondaire, en terme de valeur adaptative accrue (fitness) en présence de ravageurs phytophages, est à mettre en relation avec les coûts en terme de diminution de fitness dû à la production, le transport, le stockage et l'utilisation des métabolites secondaires. Il est cependant difficile de quantifier ces coûts. Chez les plantes, la valeur adaptative est souvent obtenue en mesurant le taux de croissance (Herms et Mattson, 1992 ; Fagerstrom, 1989) plutôt que la détermination du succès reproductif. La quantification des coûts et des bénéfices liés à la production de substances secondaires par les plantes doit être envisagée dans un contexte évolutif faisant intervenir les interactions plantes – insectes (Berenbaum 1995 ; Dicke, 2000).

### ***Les interactions multitrophiques***

Toute communauté est basée sur au moins trois niveaux trophiques. C'est pourquoi l'étude des interactions plantes - insectes doit intégrer le 3<sup>ème</sup> niveau trophique, les prédateurs et parasites entomophages qui participent à la défense de la plante (Price *et al.*, 1981). Chaque espèce

végétale qui développe un moyen de défense chimique présente une entomofaune associée qui s'est adaptée et spécialisée (Harborne, 1993). Les insectes phytophages qui se sont adaptés à la présence de métabolites secondaires ne subissent pas de toxicité et dans la plupart des cas, ont développé la capacité d'utiliser ces molécules végétales pour leur propre avantage (Lamb, 1989). Ces insectes spécialistes utilisent les molécules secondaires comme kairomones pour localiser la plante hôte et s'alimenter, et comme allomones comme défense envers les parasites et les prédateurs entomophages (Vet et Dicke, 1992). Ces derniers ont également développé la capacité d'utiliser ces substances informatives comme synomones, au détriment des insectes phytophages et au bénéfice de la plante hôte. Les molécules secondaires qui constituaient dans un premier temps des agents de défense de la plante, ont évolué et rempli des rôles écologiques très divers dans les chaînes alimentaires, entre plusieurs niveaux trophiques (Barbosa et Letourneau, 1988).

Les représentants du 3<sup>ème</sup> niveau trophique, les insectes entomophages, sont également influencés de plusieurs manières par le 1<sup>er</sup> niveau, la plante hôte. Tout d'abord, l'insecte entomophage qui se déplace sur la plante rencontre divers caractères morphologiques (poils, trichomes) qui peuvent influencer le succès de recherche et l'efficacité de contrôle des agents phytophages. Les trichomes glandulaires secrètent des substances gluantes qui peuvent empêcher le déplacement (Obrycki et Tauber, 1984) ou produire des molécules répulsives ou toxiques (Obricki, 1986) envers les auxiliaires. Des différences de la microstructure des cires foliaires et la composition

chimique de ces cires influencent certaines espèces entomophages comme les coccinelles (Eigenbrode et al., 1996 ; Eigenbrode et Espelie, 1995). Aussi, certains insectes phytophages peuvent massivement développer des profils lipidiques similaires à ceux du feuillage végétal, assurant une protection en leurrant les parasitoïdes et les prédateurs (Espelie et al., 1991).

Afin de mieux visualiser la complexité des relations entre la plante et l'entomofaune associée, un modèle tritrophique constitué de plantes hôtes, d'insectes phytophages aphidiens et d'un prédateur aphidiphage est présenté à la Figure 2.

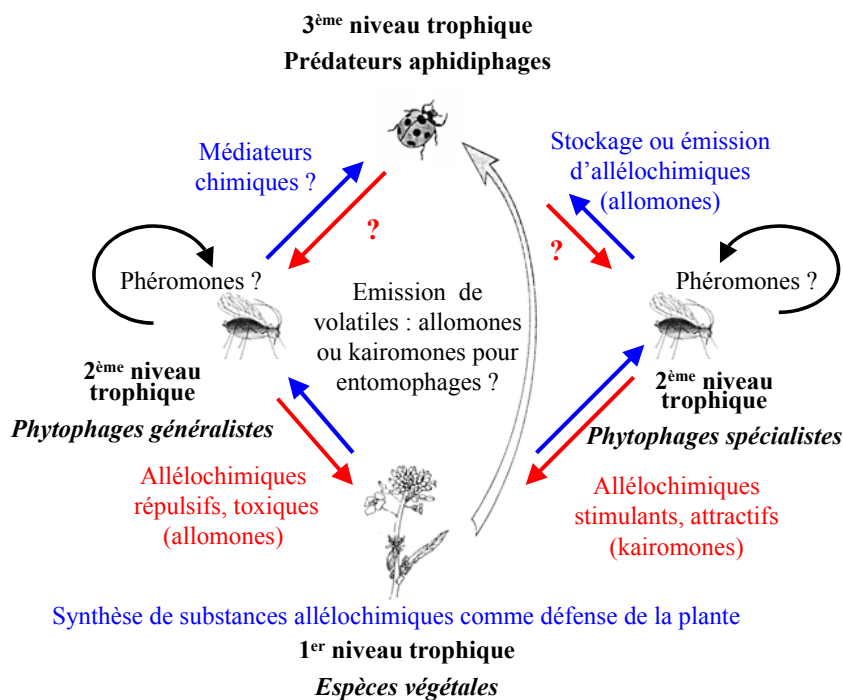


Figure 2 : Présentation des relations plantes – insectes et interventions des molécules informatives en tant que médiateurs chimiques

L'émission de substances sémiochimiques peut influencer les mécanismes de recherche de nourriture (Vet et Dicke, 1992). Le système olfactif des insectes entomophages réagit à certaines molécules volatiles émises par la plante pour localiser la proie ou l'hôte. L'origine de ces substances peut être diverse : le ravageur phytophage seul, la plante indemne de ravageurs (Rapusas et al., 1996) ou la combinaison de ces deux derniers (Vinson, 1976; Nordlund et al., 1981; Elzen et al., 1985 et 1986; Udayagiri et Jones, 1992). En effet, les blessures réalisées par les ravageurs augmentent généralement l'émission des substances volatiles attractives pour les insectes entomophages (Vet et Dicke, 1992). D'autres molécules informatives, les synomones, sont spécifiquement émises lors des attaques des insectes phytophages (Whitman, 1986). Ces synomones peuvent être relâchées par la plante entière et non uniquement à partir de la section végétale attaquée. Cette émission accrue de molécules informatives augmente la probabilité que l'auxiliaire localise la plante infestée de proies. Néanmoins, de nombreuses sources de variation des stimuli peuvent contribuer à des changements de réponses olfactives des représentants du 3<sup>ème</sup> niveau trophique (Lewis et Tumlinson, 1988 ; Vet et Dicke, 1992). Par exemple, l'apprentissage des odeurs peut influencer le degré de réponse des auxiliaires (Vet et al., 1990). Cet apprentissage associé à une réponse accrue avec des expositions répétées aux substances volatiles est souvent énoncé comme mécanisme de reconnaissance plus performant des substances sémiochimiques (Vinson et al., 1977 ; Lewis et Takasu, 1990).

Néanmoins, si une plante émet en continu des substances volatiles pour attirer les auxiliaires, ces derniers vont parfois rencontrer des plantes exemptes de proies (Dicke et Sabelis, 1989 ;Papaj et al., 1994). La réponse comportementale des insectes entomophages est inutile en terme d'efficacité de recherche de nourriture. L'utilisation de plantes qui émettent des substances informatives pour les prédateurs et les parasites indépendamment de toute présence de proies ou d'hôtes potentiels peut représenter un désavantage. En effet, les auxiliaires peuvent répondre aux stimuli chimiques à plusieurs reprises sans trouver de proies ou d'hôtes. Les insectes entomophages quittent alors le site de recherche investigué et la sensibilité de ceux-ci vis-à-vis des stimuli sera réduite (Dicke, 2000). C'est pourquoi les plantes qui n'émettent des substances volatiles (des synomones spécifiques des ravageurs phytophages) que lorsque la cible « phytophage » attaque la plante émettrice sont nettement plus intéressantes que les plantes qui informent continuellement les auxiliaires entomophages (Dicke et Sabelis, 1989).

Si les substances volatiles émises par la plante indemne ou infestée par des insectes phytophages influencent le comportement des insectes entomophages, la présence de substances sémiochimiques en solution dans la plante affecte également la qualité des proies (Aliabadi et Whitman, 2001). Comme les insectes phytophages s'alimentent des plantes, les auxiliaires qui consomment ces ravageurs utilisent indirectement la source alimentaire végétale. Si la plante hôte influence la biologie des ravageurs phytophages, elle peut également influencer la taille, la mortalité, la durée de développement et la

densité des prédateurs entomophages (Hodek et Honek, 1996). De plus, de nombreux insectes entomophages se nourrissent directement de plantes ou de produits dérivés végétaux comme le pollen et le nectar (Rigdway et Jones, 1968 ; Naranjo et Stimac, 1985 ; Salas-Aguilar et eEhler, 1977). Sur les 163 familles d'insectes prédateurs et parasites investiguées par Hagen (1987), 25% sont uniquement carnivores. Dans les 75% restant, des espèces peuvent consommer des substances végétales au moins à l'un de leurs stades de développement. Environ 25% des « omnivores » présentent une polyphagie à tous les stades de développement, environ 50% se nourrissent de matières végétales à un ou l'autre de ces stades (Taylor et Foster, 1996). La consommation de produits végétaux permet aux auxiliaires entomophages de survivre durant des périodes de pénuries de proies et contribuent à la composition d'un régime alimentaire équilibré (Coll, 1996). A titre d'exemples, nous pouvons citer les coccinelles prédatrices (Hodek et Honek, 1996), les anthocorides (Kiman et Yeargan, 1985).

### **Application à la lutte biologique**

Les insectes phytophages représentent des ravageurs redoutables pour les productions végétales. Le moyen de lutte le plus répandu est sans aucun doute l'utilisation de produits chimiques de synthèse. De nombreuses espèces d'insectes sont devenues résistantes aux insecticides (près de 2000 cas de résistances ont été reportés dans 504 espèces; Georghiou, 1991). Le développement de moyens de lutte alternatif a dès lors été amplifié, comme la lutte biologique qui est un

élément clé du concept de gestion intégrée des ravageurs (IPM en anglais). Les connaissances de base de l'écologie et de la biologie des insectes entomophages sont le fondement de la réussite de l'utilisation de ces auxiliaires (Poppy, 1997). Comme illustré précédemment, les effets multitrophiques plantes – insectes impliquent des interactions complexes. Les plantes hôtes peuvent influencer les auxiliaires entomophages soit directement en émettant des substances chimiques qui modifient le comportement, soit indirectement en affectant leurs proies. L'impact des substances sémiologiques peut être antagoniste à celui observé sur les ravageurs phytophages. Le contrôle biologique de ces derniers par les insectes entomophages est alors difficile à prévoir (Vinson, 1981, Bottrell et al., 1998).

Si les programmes de sélection de variétés végétales incorporent la mise au point de plantes résistantes à certains ravageurs, cette sélection ne tient généralement pas compte de l'effet des caractères sélectionnés sur les auxiliaires entomophages. L'introduction d'une variété cultivée possédant une résistance à certaines espèces de ravageurs phytophages basée sur la présence d'une substance allélochimique peut également réduire l'efficacité des auxiliaires (van Emden, 1995). De plus, l'influence de cette sélection variétale dépend également de la spécificité de la relation plante – insecte. Pour une culture qui constitue un habitat majeur de l'espèce entomologique considérée, tant phytophage qu'entomophage, les conséquences, en terme de valeur adaptative (fitness en anglais), des caractéristiques de la variété végétale sélectionnée (par exemple la production accrue de pollen, de synomones induites par les ravageurs) sont importantes.



Dans un habitat mineur, les effets à long terme des caractéristiques sélectionnées chez la plante hôte sont moins importants (Bottrell et al., 1998).

La biotechnologie augmente les opportunités de développer des plantes qui favorisent et attirent les auxiliaires. En effet, la problématique de la perte de certains caractères agronomiques intéressants lors de la sélection végétale conventionnelle est réduite. Il est possible de transférer un gène codant pour la production d'une substance attractive dans une plante tout en conservant les autres caractères. Il apparaît cependant difficile de prédire comment combiner la résistance d'une plante face à des ravageurs et la réaction des auxiliaires entomophages face à ce caractère de résistance sans comprendre l'évolution entre la plante, les ravageurs et les auxiliaires. Seule la compréhension de ces relations multitrophiques peut permettre l'amélioration à long terme des programmes de lutte biologique contre les ravageurs des cultures (Bottrell et al., 1998).

### ***Effets des substances allélochimiques***

Le rôle des composés secondaires chez les plantes est longtemps demeuré obscur. Ces substances ont initialement été considérées comme les résidus du métabolisme primaire, ne présentant aucune utilité pour la plante. L'examen de la distribution, de la structure chimique et des modes d'action des substances secondaires chez divers groupes de végétaux a permis de réaliser une classification chémo-systématique des espèces végétales. Des phyla entier

présentent soit une absence soit une présence de groupes spécifiques de substances chimiques défensives (Berenbaum, 1995). Certains insectes phytophages ont cependant été capables d'utiliser ces substances, ou leurs produits de dégradation, pour localiser leurs sources alimentaires, les plantes hôtes (Nielsen *et al.*, 1979). Les molécules secondaires végétales peuvent également influencer le développement et la reproduction des insectes qui se nourrissent des plantes hôtes qui produisent les métabolites secondaires (Erickson et Feeny, 1974). Différentes illustrations sont présentées ci-dessous.

### **Attractifs**

De nombreux signaux physiques (sons émis, mouvements de la proie, chaleur; Mangold, 1978) ou chimiques (odeurs) des insectes ou des plantes interviennent dans la localisation des sources alimentaires par les insectes. Lorsque les substances chimiques de la plante attirent les auxiliaires entomophages, l'émission de ces substances est considérée comme faisant partie du système de défense végétal contre les phytophages. Par exemple, les plantes de manioc attaquées par la cochenille *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero en présence ou non de ravageurs sont la source principale de composés volatils présentant un caractère attractif pour l'endoparasitoïde *Apoanagyrus lopezi* De Santis (Souissi *et al.*, 1998).

Néanmoins, certaines substances émises par la plante ne sont pas bénéfiques pour le végétal, du moins dans un premier temps. A titre d'exemple, les composés volatils émis par les Brassicaceae attirent la plupart des insectes qui infestent cette famille botanique (Blau *et al.*,

1978). Lorsque les tissus végétaux des Brassicaceae sont endommagés, notamment lors des attaques de phytophages, des produits volatils de dégradation des glucosinolates (principalement les isothiocyanates) sont relâchés suite à l'action de la myrosinase, enzyme présent dans la plante mais stocké séparément des glucosinolates (Heaney et Fenwick, 1995). Dans un premier temps, la plante est victime de sa production de molécules informatives. Ensuite, ces dernières vont attirer des auxiliaires entomophages. Par exemple, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera, Braconidae), parasite de pucerons, répond positivement aux substances volatiles émises par des plantes de choux infestées par des pucerons (*Diuraphis noxia* Mordvilko et *Brevicoryne brassicae* L) (Reed *et al.*, 1995). Finalement, les substances volatiles émises par la plante participent à la défense des espèces de Brassicaceae.

### **Répulsifs**

Pour réduire l'alimentation des insectes phytophages, la plante ne doit pas nécessairement produire une substance hautement toxique pour l'insecte. En effet, les substances répulsives sont généralement détectées par les ravageurs phytophages avant même la prise de nourriture (Feeny, 1976). Un des cas le plus étudié est celui des isothiocyanates de Brassicaceae. Blau *et al.* (1978) démontrèrent le caractère répulsif de l'allylisothiocyanate pour les Lépidoptères généralistes et pour les insectes non inféodés aux Brassicaceae. La présence de molécules secondaires répulsives ne signifie pas nécessairement une inhibition complète de la nutrition du ravageur (Schoonhoven et Derksen-Koppers, 1976).

Le puceron *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) se nourrit préférentiellement de plantes de maïs saines lorsque des plantes non endommagées ou des plantes infestées de pucerons lui sont présentées. L'effet répulsif vis-à-vis de *R. maidis* des substances volatiles émises par les plantes attaquées peut s'expliquer de différentes manières. La production des composés volatiles par la plante peut permettre soit d'informer les autres ravageurs de la présence de concurrents phytophages soit d'attirer les ennemis naturels des pucerons. Une molécule volatile, le (E)- $\beta$ -farnésène, est produite à la fois par la plante et par le puceron et agit comme substance d'alarme chez les pucerons (Bernasconi *et al.*, 1998). L'effet de cette substance volatile vis-à-vis des coccinelles aphidiphages reste variable suivant l'espèce considérée. En effet, le (E)- $\beta$ -farnésène attire les adultes d'*Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville et d'*Harmonia axyridis* Pallas mais n'influence pas le comportement de *Coccinella septempunctata* L. (Zhu *et al.*, 1999).

### **Stimulants de ponte**

Le comportement de ponte des insectes dépend de la présence de médiateurs chimiques dans leur habitat. Des extraits végétaux d'Amaranthe ont été testés et augmentent significativement le parasitisme des oeufs d'*Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera, Noctuidae) par *Trichogramma sp* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) dans différentes cultures telles que celles de tomates, de soja ou de coton (Altieri *et al.*, 1981). La localisation d'une source de nourriture pour la descendance est le facteur clé du déclenchement de la ponte.

Les femelles d'*Episyrphus balteatus* DeGeer (Diptera, Syrphidae) ne déposent leurs œufs qu'à proximité de colonies de pucerons. Les femelles de syrphes sont guidées par des substances chimiques émises par les pucerons et par leur miellat (Bargen *et al.*, 1998).

Le stimulus positif que représente la présence de glucosinolate telle que la sinigrine lors de la ponte de plusieurs espèces de Lépidoptères phytophages inféodées aux crucifères a été largement démontré par Dethier (1972). *Pieris brassicae* L. utilise ainsi le glucosinolate comme stimulant d'oviposition. Les papillons pondent sur des papiers filtres uniquement lorsque ceux-ci sont préalablement trempés dans une solution de sinigrine. Des résultats similaires ont été observés chez *Pieris rapae* L par Traynier et Truscott (1991) à partir de solutions de l'ordre de  $10^{-6}$  M de glucobrassicine.

### **Stimulants de nutrition**

Si certaines substances allélochimiques d'origine végétale sont toxiques ou répulsives pour de nombreux insectes, d'autres molécules secondaires de la plante sont indispensables à la nutrition des ravageurs. Par exemple, sept espèces de Lépidoptères inféodées aux Rosaceae répondent spécifiquement au sorbitol lorsqu'il est diffusé dans leur environnement (Kogan, 1976 ; Stadler, 1976). De même, la dépendance du Coléoptère (Chrysomelidae) *Chrysolina brunsvicensis* (Gravenhorst) face à l'hypéricine contenue dans plusieurs espèces du genre *Hypericum* (Hypericaceae) a été démontrée par Rees (1969). Chez les ravageurs du genre *Phyllotreta* (Coleoptera, Chrysomelidae), le kaempferol et les quercitine 3-xylosylgalactosides augmentent

l'alimentation des insectes (Nielsen *et al.*, 1979) et des effets comparables ont également été observés chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae).

Le puceron du chou (*Brevicoryne brassicae* L.) se nourrit de plantes hôtes contenant des glucosinolates qui induisent leur nutrition (Nault et Stayer, 1972). *B. brassicae* peut néanmoins être élevé sur d'autres plantes que des Brassicaceae si elles ont subi des injections préalables de sinigrine. Les pucerons quittent le support végétal lorsque les stimulants essentiels à leur nutrition sont absents (Hopkins *et al.*, 1998). Notons que les jeunes organes de la plante, sites de synthèse les plus actifs au niveau des substances secondaires, sont les cibles privilégiées de l'attaque de cette espèce phytophage spécialiste.

### **Antiappétents**

En réponse à des obstacles physiologiques tels que la présence de substances allélochimiques, les insectes phytophages possèdent des récepteurs spécifiques à ces substances secondaires et sont capables de rejeter la plante en tant que source alimentaire. Néanmoins, la présence d'antiappétents ne signifie pas nécessairement une inhibition complète de la nutrition du ravageur. A de faibles ou moyennes concentrations (de l'ordre de 0,01 M), des substances allélochimiques peuvent être tolérées. *Myzus persicae* Sultzer (Hemiptera, Aphididae) se développe sur un milieu artificiel contenant des allomones (alcaloïdes, glucosinolates) même s'il préfère une alimentation indemne de ces substances (Schoonhoven et Derksen-Koppers, 1976). La production de tannins par la plante vise également à réduire la

valeur nutritionnelle de la plante; ce qui diminue le comportement de nutrition de nombreuses espèces d'insectes (Feeny, 1976).

### **Effet toxique**

Sous l'effet de la pression de la sélection naturelle, les plantes ont développé la capacité de synthétiser et d'accumuler des toxines pouvant être classées en plus de 12 groupes distincts (Tableau 1) tels que les aflatoxines, les alcaloïdes, les furanocoumarines, les glycosides, les terpènes... (Harborne, 1993). La présence de ces toxines constitue un système de défense efficace vis-à-vis des organismes phytophages. Cette toxicité est cependant relative. En effet, elle dépend non seulement de la nature de la toxine elle-même, de la dose ingérée mais également de l'espèce animale considérée (Vinson, 1981). Par exemple, l'ajout de 0,1% de sinigrine (glucosinolate, composé secondaire de Brassicaceae) dans la diète de larves de *Papilio polyxenes* F. (Lepidoptera, Papilionidae) provoque 100 % de mortalité (Erickson et Feeny, 1974). Par contre, les insectes phytophages inféodés aux Brassicaceae ont évolué de manière à réduire l'effet toxique de ces composés et sont capables de se développer sur des plantes hôtes qui les produisent (Lamb, 1989).

D'autres exemples peuvent être cités. C'est ainsi que certaines espèces de pucerons sont capables d'infester des plantes hôtes contenant une ou plusieurs substances toxiques. *Aphis sambuci* L. est inféodé au sureau (*Sambucus nigra* L.) contenant un composé glycoside, la sambunigrine. *Macrosiphum aconitum* Passerini se nourrit au dépend de plusieurs espèces du genre *Aconitum* (contenant l'aconitine), *Aphis*

*nerii* L. infeste le laurier rose (contenant de l'oleadrine et de la neriine, deux cardenolides glycosides; Malcolm, 1990), *Macrosiphum albifrons* Essig et *Aphis jacobaeae* Schrank se nourrissent respectivement du lupin (*Lupinus mutabilis* contenant des alcaloïdes quinolizidines) et des séneçons (*Senecio* sp., contenant des alcaloïdes pyrolizidines). Ces espèces de pucerons sont toxiques lorsqu'elles constituent les proies des insectes entomophages comme les coccinelles aphidiphages (Hodek et Honek, 1996).

Des études récentes ont démontré que les insectes phytophages généralistes sont sujets à une prédation plus importante que les ravageurs spécialistes. Cette constatation semble liée à la présence et à l'utilisation de substances secondaires de plante hôte. La séquestration de glucoside iridoïde issu du plantain (*Plantago lanceolata* L.) chez la chenille de *Junonia coenia* Hübner (Lepidoptera, Nymphalidae) réduit les taux de prédation de ce dernier. Le choix de la plante hôte sur laquelle se développe le Lépidoptère aux stades larvaires conditionne la survie de deux niveaux trophiques représentés par l'espèce phytophage et son prédateur (Camara, 1997).



## **Chapitre 2**

### **Les systèmes de détoxification chez les insectes**

#### ***Introduction***

D'évidentes interactions ont été observées entre la présence de substances allélochimiques de plante et l'induction de l'activité des enzymes intervenant dans la métabolisation de substances xénobiotiques (XME) chez les insectes (Yu, 1984). L'induction de certains systèmes enzymatiques peut influencer les valeurs adaptatives (fitness) des populations non seulement des ravageurs phytophages mais aussi de la faune entomophage associée. De nouvelles capacités à faire face à des toxines naturelles peuvent être développées par l'augmentation de l'activité de ces enzymes ou par la production d'enzymes agissant spécifiquement sur les substances inductrices (comme les myrosinases). Un avantage sélectif des populations d'insectes installés sur certaines plantes hôtes pourrait dès lors être observé. De la même manière, les prédateurs naturels d'insectes phytophages sont en contact soit avec les molécules allélochimiques végétales ingérées par leurs proies, soit avec les substances volatiles émises par la plante lorsqu'ils recherchent ou consomment leurs proies. En effet, si les substances secondaires de plante démontrent un rôle informatif majeur sur les ravageurs phytophages (Lerin, 1980; Brattsten, 1988; Yu et Hsu, 1993), elles peuvent également influencer les performances biologiques et les mécanismes biochimiques des prédateurs. Différents mécanismes de détoxification contribuent à la métabolisation des substances xénobiotiques telles que les toxines d'origine végétale.

## ***Mécanismes généraux***

Pour faire face notamment à la présence de substances toxiques, les organismes, y compris les insectes, se sont adaptés et ont développé des systèmes enzymatiques qui leur permettent de détoxiquer les composés nocifs auxquels ils sont soumis. Ces systèmes enzymatiques de bio-transformation peuvent être regroupés en deux groupes (Vos et van Bladeren, 1990):

- les systèmes enzymatiques de la phase I, incluant des réactions de transformation telles que l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse. Ces réactions désactivent ou convertissent la molécule exogène en une molécule plus polaire qui peut ainsi être stockée ou éliminée de l'organisme;
- les systèmes enzymatiques de la phase II qui regroupent les réactions de conjugaison. Ces réactions combinent des molécules avec des métabolites exogènes hydrophiles afin de faciliter leur excrétion ou leur stockage.

### **Les systèmes enzymatiques de la phase I**

Les enzymes qui interviennent dans la détoxification des substances allélochimiques et des insecticides sont essentiellement les monooxygénases à cytochrome P-450 et les estérases.

#### ***Les monooxygénases à cytochrome P-450***

Ce complexe enzymatique, fixé sur le réticulum endoplasmique des cellules du tube digestif, des tubes de Malpighi et du corps gras, est constitué d'une chaîne d'électrons dont l'ultime accepteur est le cytochrome P-450. Les molécules sont oxydées par utilisation de

l'oxygène moléculaire d'une part, et d'un cofacteur (le NADPH) d'autre part. Outre leur rôle dans la métabolisation et la résistance aux insecticides (Tsukamoto et Casida, 1967), ces enzymes interviennent également dans le métabolisme des hormones juvéniles et dans la synthèse des phéromones (Terreire, 1978).

### ***Les estérases***

Les estérases sont localisées principalement dans le cytoplasme et sur le réticulum endoplasmique des cellules du tube digestif (Kapin et Ahmad, 1980), des tubes de Malpighi, du système reproducteur et du corps gras (Jones et Bancroft, 1986). De nombreuses fonctions leur sont attribuées: métabolisme des hormones (Hammock, 1985), de la digestion (Kapin et Ahmad, 1980), de la neurotransmission (Oppenoorth, 1985) et la métabolisation des pesticides.

### **Les systèmes enzymatiques de la phase II**

Les réactions de la phase II ont pour but de fixer à des molécules hydrosolubles les substances xénobiotiques modifiées lors de la phase I afin de les excréter ou de les stocker. Le poids moléculaire et le caractère hydrophile des molécules conjuguées vont être augmentés ce qui limitent leurs possibilités de diffusion. Les conjugués, après transport membranaire, peuvent alors être éliminés dans les faeces ou diverses sécrétions (comme le miellat chez les pucerons) ou directement dans l'eau dans le cas des organismes aquatiques. La distribution et le rôle de ces enzymes de la phase II ont fait l'objet de plusieurs synthèses (Yu et Hsu, 1993 ; Haubruge et Amichot, 1995).

Différents substrats interviennent dans les réactions de conjugaison (Jakoby et Habig, 1980):

- l'acide UDP glucuronique ( $C_{15}H_{22}N_2O_8P_2$ ), qui élimine les phénols, les alcools et les acides carboxyliques grâce aux UDP glucuronyle transférases;
- le sulfate dérivant de la cystéine qui est activé sous forme d'adénosine 3'phosphate 5'phosphosulfate;
- la N-acétylglucosamine qui peut être transférée grâce aux N-acétyl-transférases ;
- le glutathion ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine) (GSH) qui permet la détoxification de nombreux composés xénobiotiques, par l'intermédiaire d'enzymes principalement localisés dans le cytosol : les glutathion S-transférases.

### ***Les Glutathion S-transférases (GST)***

#### **Généralités**

Les glutathion S-transférases (GST; E.C. 2.5.1.18) sont des enzymes ubiquistes dont l'activité a été détectée chez de nombreux organismes tels que les micro-organismes (Dierickx et al., 1990), les champignons (Cohen et al., 1986), les plantes (Shimabukuro et al., 1971), les acariens (He et al., 1999), les insectes (Fournier et al., 1992), les vers (Dierickx, 1985), les vertébrés dont l'homme (Mannervik et al., 1985). Ces enzymes ont surtout été étudiés chez le rat, la souris et l'homme (Mannervik et Danielson, 1988). Le rôle des GST dans la détoxification de nombreuses substances cancéreuses est étudié en recherche médicale et plus particulièrement en cancérologie.

Avant de poursuivre, il semble utile de préciser certains termes enzymologiques. La structure d'un enzyme est considérée suivant quatre critères (Dixon et Webb, 1979) :

- la structure primaire qui représente la structure chimique de la chaîne polypeptidique, donné par la séquence en acides aminés ;
- la structure secondaire se réfère à la manière dont cette chaîne est repliée et enroulée sur elle-même;
- la structure détaillée en trois dimensions de l'enzyme correspond à la structure tertiaire ;
- si de nombreux enzymes de faibles poids moléculaires (10-50kDa) ne sont constitués que d'une seule chaîne peptidique, plusieurs chaînes polypeptidiques sont associées pour former une molécule de l'enzyme. Cette association constitue la structure quaternaire.

Un enzyme complet est donc généralement constitué de plusieurs sous-unités, identiques ou différentes. Les sous-unités sont appelées protomères et le produit de leur association oligomères. Les différentes chaînes polypeptidiques, correspondant aux sous-unités, ont le plus souvent une masse moléculaire comprise entre 25 et 60 kDa (Pelmont, 1993).

Les multiples possibilités de combinaisons des sous-unités constitutives des enzymes, comme c'est le cas pour les GST, peuvent engendrer de nombreuses formes également appelées isoenzymes. Ces isoenzymes constituent un groupe de protéines ayant des structures chimiques différentes mais des fonctions enzymatiques similaires. Le terme de "formes multiples d'un enzyme" doit être utilisé comme faisant référence à toutes les protéines qui catalysent la même réaction

et qui sont issues naturellement de la même espèce (Dixon et Webb, 1979).

En ce qui concerne les GST, ce sont des protéines dimériques constituées de 2 sous-unités identiques (homodimères) ou non (hétérodimères), de poids moléculaires compris entre 25 kDa et 35 kDa (Habig et al., 1974; Cochrane et al., 1987 ; Franciosa et Bergé, 1995). Une nomenclature proposée par Jakoby et al. (1984) est basée sur l'identification des deux sous-unités constituantes de l'enzyme, chacune étant caractérisée par un poids moléculaire et des propriétés physico-chimiques particulières. Une nouvelle synthèse similaire a été réalisée pour les GST humaines (Mannervik et al., 1992).

### **Les mécanismes de conjugaison des Glutathion S-transférases**

En 1930, Waelsch émet l'hypothèse que le glutathion (GSH) serait impliqué dans les processus de détoxication. Quelques années plus tard, une diminution de la teneur en GSH est observée dans plusieurs organes de lapin auxquels on a administré différentes substances comme le naphthalène ou le bromobenzène. Barnes et al. (1959) d'une part et, Bray et al. (1959) d'autre part décrivent la première étape de la synthèse des acides mercapturiques, conjugaison enzymatique du GSH à des xénobiotiques. Cette conjugaison fait intervenir une "glutathionase". Deux ans plus tard, Booth et al. (1961) purifient partiellement une enzyme de foie de rat qui catalyse la conjugaison du GSH avec des composés aromatiques. Cette conjugaison est décrite comme la première étape de la biosynthèse de l'acide mercapturique. Les GST font l'objet de très nombreuses recherches et sont considérées comme un système enzymatique quasi universel. Les

GST sont des enzymes non spécifiques et multi-fonctionnelles. Le premier rôle accordé aux GST est la capacité à détoxifier les composés xénobiotiques électrophiles en catalysant leur conjugaison avec le glutathion (GSH) (Boyland et Chasseaud, 1969; Chasseaud, 1979). Les conjugués au GSH acquièrent les propriétés nécessaires pour être soit excrétés, soit transformés par une suite de réactions enzymatiques en un conjugué du N- acétylcystéine, l'acide mercapturique, qui peut également être excrété.

La conjugaison avec le GSH constitue un important processus de détoxification des xénobiotiques; les conjugués au GSH formés sont généralement moins toxiques que la substance de départ (Boyland et Chasseaud, 1969). En dépit de ce rôle primaire de détoxification, plusieurs auteurs ont démontré que la conjugaison au GSH peut avoir des effets toxiques sur l'organisme (van Bladeren, 1988; van Bladeren et van Ommen, 1991). Ainsi, les conjugués toxiques peuvent être divisés en trois groupes, soit:

- le conjugué est plus réactif et plus toxique que le composé initial;
- le conjugué est métabolisé en plusieurs composés plus toxiques;
- la conjugaison est réversible; le conjugué constitue seulement une forme de stockage et de transport du composé initial comme c'est le cas avec l'allyle- et le benzyle-isothiocyanates.

### **Rôles des Glutathion S-transférases**

#### ***Dans le métabolisme des substances cancérigènes et des agents électrophiles***

En 1969, Boyland et Chasseaud suggèrent un rôle probable du GSH et de ses enzymes associés, les GST, dans la protection des constituants

cellulaires contre les agents électrophiles tels que de nombreuses substances cancérigènes et mutagènes. Cependant, le GSH et les GST constituent également un mécanisme de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses vu leur rôle dans le processus de détoxification cellulaire (Belpomme, 1991).

### ***Dans les mécanismes de résistance aux insecticides***

L'implication des GST dans la réduction de l'efficacité de certains insecticides a été démontrée chez de nombreuses espèces d'insectes telles que *Musca domestica* (Motoyama et Dauterman, 1975 ; Fournier et al., 1992), *Aedes aegypti* (Grant et al., 1991), *Heliothis virescens* ou *Spodoptera littoralis* (Bull et Whitten, 1972). Ce phénomène de résistance implique différentes modifications biochimiques chez les insectes. Des augmentations d'activité GST ont été détectées chez plusieurs souches d'insectes résistants (Oppenoorth et al., 1979; Pospischił et al., 1996). Les insectes résistants métabolisent plus efficacement les insecticides via la voie GSH dépendante et entraîne leur détoxification (Fukami, 1980).

Chez la mouche domestique, deux classes de GST, les GST1 et les GST2, chacune composée de plusieurs isoenzymes ont été identifiées. Chez une souche résistante aux insecticides, la haute activité GST est corrélée avec un haut niveau de GST1 (Fournier et al., 1992). De même, les travaux réalisés sur *Aedes aegypti* par Grant et al. (1991) confirment que la résistance peut être due à un ou plusieurs isoenzymes et que tous les isoenzymes ne sont pas associés à cette résistance.



### ***Dans le transport intracellulaire***

En 1971, Litwack et al. (1971) isolent une protéine intracellulaire localisée principalement dans les cellules de foie de divers mammifères. Cette protéine est constituée de deux sous-unités identiques de 23 kDa et est nommée ligandine. Cette dernière est capable de se lier de façon covalente à certains stéroïdes et substances cancérigènes ainsi qu'à leurs métabolites respectifs (Ketterer et Beale, 1971). Cette ligandine présente une activité GST vis-à-vis de certains substrats (Habig et al., 1974a). D'autres études ont confirmé ces observations (Mannervik et Danielson, 1988; Grant et al., 1991).

### ***Rôle dans la perception olfactive***

Vu l'importance des neurones sensoriels antennaires dans la réponse comportementale des insectes, le système olfactif présente des mécanismes de détoxification des molécules perçues afin de minimiser la toxicité et de réduire les phénomènes de saturation menant à l'inactivation par les odeurs en présence (Rogers et al., 1999)

Les antennes des Lépidoptères possèdent deux classes de sensilles olfactives : celles qui sont sensibles aux phéromones et celles qui perçoivent les odeurs générales de l'environnement telles que les substances volatiles émises par les plantes (Lee et Strausfeld, 1990). De fortes concentrations en enzymes dégradant les odeurs (Odorant-Degrading Enzymes, ODE) sont présentes dans le fluide entourant les dendrites sensorielles (Vogt et al., 1991 a,b). Les molécules odorantes sont finalement dégradées en permanence et inactivées par les ODE.

Parmi ces enzymes, des GST ont été détectées dans les épithélia sensoriels de mammifères (Lazard et al., 1991 ; Longo et al., 1991). L'utilisation d'une GST purifiée à partir d'antennes de *Manduca sexta* lors d'analyses d'expression de ces enzymes dans différents tissus d'adultes de *M. sexta* a permis de démontrer la présence spécifique de cette GST uniquement dans le système olfactif (Rogers et al., 1999).

### **Localisation et fonctions physiologiques chez les insectes**

Les premières études macroscopiques, au niveau des différents organes, afin de localiser l'activité GST dans les organes chez les insectes ont été réalisées par Cohen et al. (1964) chez le criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria*. Une activité élevée des GST a été observée dans les tubes de Malpighi, organe intervenant dans la métabolisation des substances xénobiotiques. La présence d'une forte activité GST a été localisée dans la graisse et les intestins des larves de *Lucilia cuprina* (Kotze et Rose, 1987), *Xylotrupes dichotomus* et *Bombyx mori* (Fukami et Shishido, 1966). Ces derniers auteurs confirment également cette localisation des GST chez *Periplaneta americana*, *Spodoptera litura* et *Chilo suppressalis*.

Les études précédentes ne présentent cependant aucune donnée sur la nature des GST, ni sur la distribution intra-cellulaire ou extra-cellulaire de ces enzymes. Des études immuno-histologiques ont ensuite été réalisées chez la mouche domestique, *Musca domestica*. Franciosa et Bergé (1995) ont démontré que les deux familles de GST (GST-1 et GST-2) présentes ont une répartition différente dans le corps de l'insecte. La GST-1 est localisée dans l'hémolymphe tandis que la

GST-2 est localisée dans les muscles indirects du vol du thorax et dans le système nerveux central.

La GST-1, localisée dans le cytoplasme des hémocytes, ne se retrouve pas dans le cerveau car les cellules gliales entourant ce dernier ne permettent pas le passage des hémocytes. Dans ce tissu, on retrouve l'autre GST : la GST -2. Celle-ci se retrouve également au niveau des muscles responsables des déformations thoraciques induisant les oscillations des ailes lors du vol. Dans ce tissu, la GST -2 pourrait être en relation avec la structure fibrillaire et la physiologie des muscles (Franciosa et Bergé, 1995).

### **Classification des Glutathion S-transférases**

Une première classification a été basée sur l'affinité des GST vis-à-vis du substrat. Deux groupes sont constitués : (1) les GSH S-aryltransférases qui conjuguent le GSH aux composés halogénés aliphatiques, comme le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (DCNB), (2) des GSH S-alkyltransférases qui conjuguent le GSH aux composés aromatiques. Ensuite, Chasseaud (1973) regroupe les GST en classes. Chaque espèce de protéine doit être identifiée par le nom de l'organisme d'où elle a été extraite. En tant que dimère, chaque sous-unité doit recevoir un numéro. Chaque GST est identifiée par le code donné à ses deux sous-unités constitutives (Jakoby et al., 1984).

En 1985, Mannervik et al. définissent une première nomenclature séparant les isoenzymes de GST en 3 classes (alpha, mu et pi) sur base d'une part, des propriétés immunologiques et biochimiques et d'autre part, des séquences en acides aminés. Ensuite, des isoenzymes de

l'homme et du rat qui ne répondent pas aux critères des classes définies précédemment sont isolées des autres catégories de GST (Meyer et al., 1991). Une quatrième classe (thêta) est alors créée par ces derniers auteurs. De plus, une cinquième classe (sigma) est définie sur base du séquençage en acides aminés des GST. Une GST est répertoriée dans une des classes si la séquence en acides aminés de cette dernière présente plus de 40% de similitude par rapport aux enzymes de la classe considérée (Hayes et Pulford, 1995).

Les isoenzymes peuvent également être différenciés par l'utilisation d'inhibiteurs (Jakoby, 1978; Dierickx, 1982 ab; Mannervik et Jansson, 1982; van Bladeren et van Ommen, 1991). Les isoenzymes de la classe  $\alpha$  exhibent une forte activité peroxydase et sont très actifs vis-à-vis de l'hydroperoxyde de cumène, les isoenzymes de la classe  $\pi$  sont très actifs vis-à-vis de l'acide éthacrynique tandis que le trans-stilbène oxyde est utilisé pour la classification des isoenzymes de la classe *mu* (Mannervik et Danielson, 1988). Finalement, les GST de mammifères ont été répertoriées en 8 classes cytosoliques (alpha, mu, pi, theta, sigma, zeta, kappa, omega) et une classe microsomiale (Morgenstern et al., 1982, 1984, 1985; Mannervik, 1985; Meyer et al., 1991; Pemble et al., 1996; Board et al., 1998, 2000).

Chez les insectes, les premiers travaux sur les GST remontent à la fin des années 70. Les GST ont été purifiées chez une trentaine d'espèces d'insectes appartenant à différents ordres (Lépidoptères, Diptères, Coléoptères, Dictyoptères, et Hyménoptères). Les relations entre les GST d'insectes qui ont été séquencées sont représentées à la Figure 3.

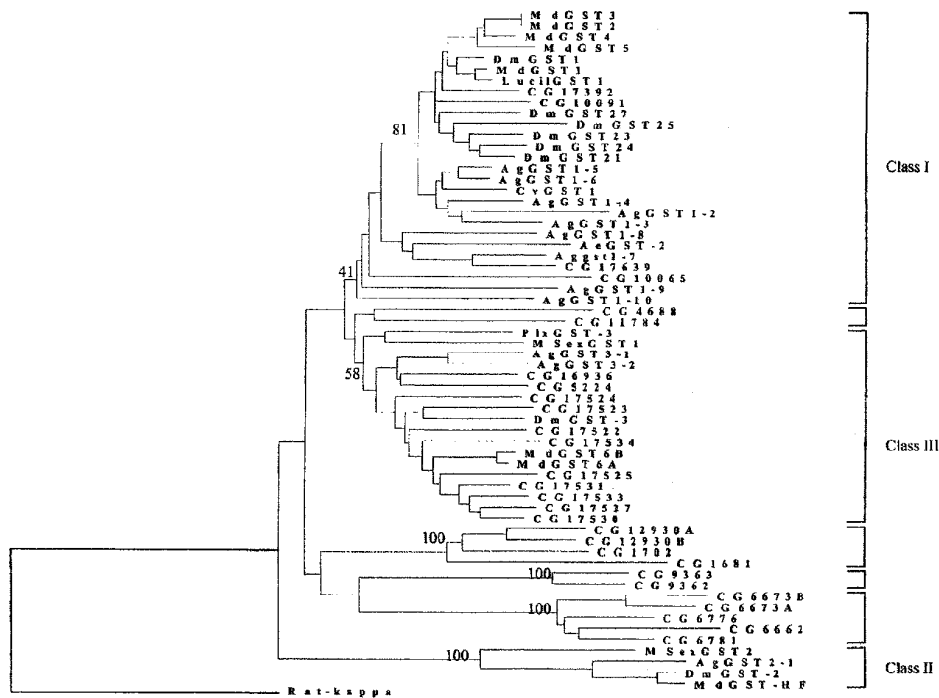


Figure 3 : Dendrogramme illustrant la relations entre les séquences de GST d'insectes (Ranson et al, 2001).

CG : *Drosophila*, Dm : *Drosophila megalonaster*, Md : *Musca domestica*,  
 Lucil : *Lucilia cuprina*, Ag : *Anopheles gambiae*, Cv : *Culicoides variipennis*, Ae : *Anopheles aegypti*, Plx : *Plutella xylostella*, Msex : *Manduca sexta*

En 1992, Buetler et Eaton ont synthétisé l'ensemble des résultats de séquençage en cDNA des GST et sont ainsi parvenus à mettre en évidence les analogies des GST des différentes classes. Ces auteurs ont illustré les relations entre les GST d'insectes et celles d'autres organismes (Figure 4). La banque de données « Genbank » contient 42 séquences de GST du genre *Drosophila* et 21 séquences d'autres insectes, principalement de Diptères telles que des espèces de *Musca* sp et *Anopheles* sp ou de Lépidoptères (Ranson et al., 2001).

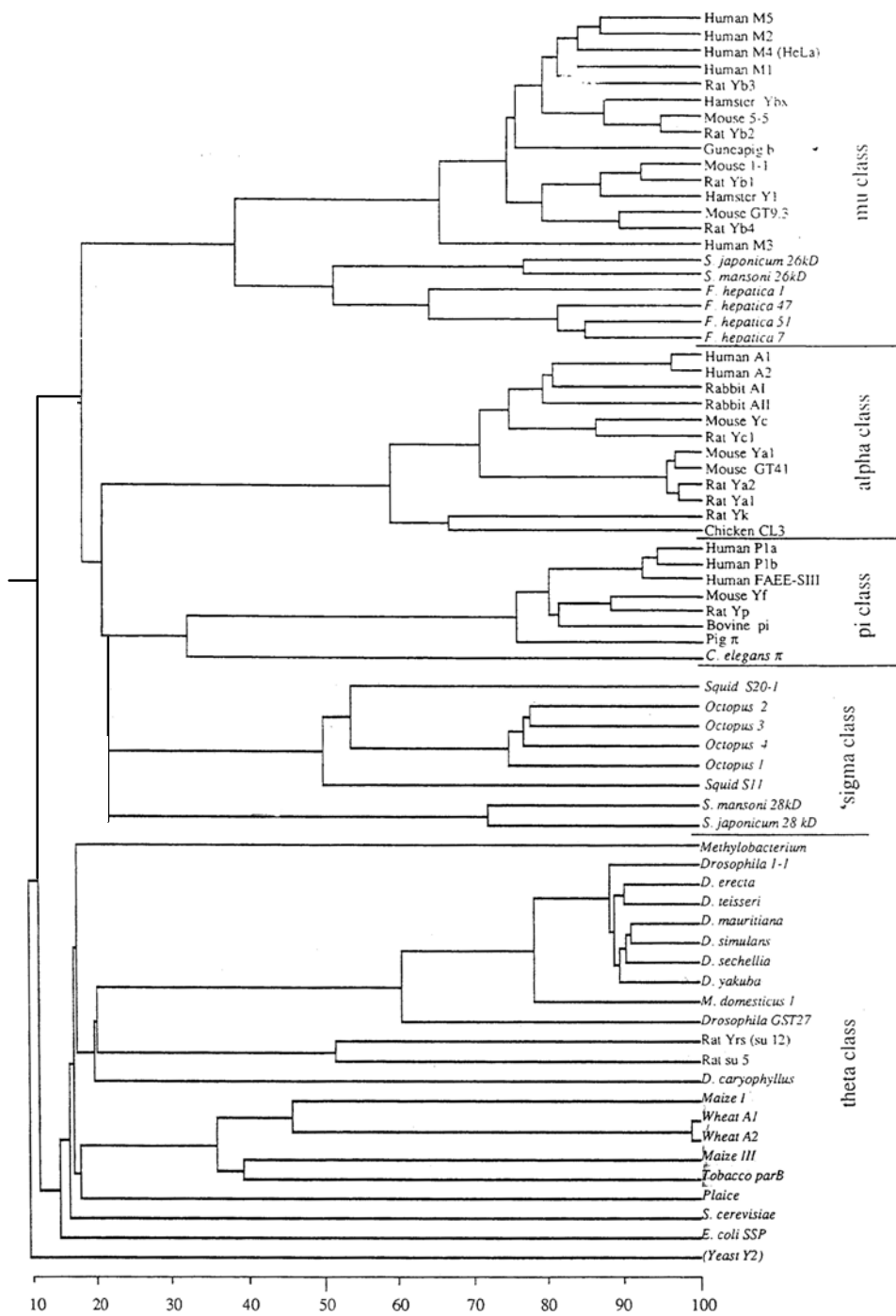


Figure 4: Classification des GST de divers organismes et relations phylogénétiques. Les GST d'insectes sont représentées dans la classe théta.

D'une manière générale et sur base de la comparaison des séquences en acides aminés, les GST d'insectes ont été classées comme appartenant à la classe thêta (Meyer et al., 1991). Fournier et al. (1992) décrivent quant à eux deux classes principales de GST (classes I et II). En 2001, Ranson et al. ont décrit une troisième classe chez les insectes.

Trois espèces de Diptères sont principalement étudiées : la mouche domestique (*Musca domestica*) (Franciosa et Bergé, 1995), la drosophile (*Drosophila melanogaster* ; Cochrane et al., 1987), et le moustique (*Anopheles* sp ; Prapanthara et al., 1993). Chez les Lépidoptères, de nombreuses espèces ont été étudiées : *Plutella xylostella*, *Helicoverpa zea* et *Spodoptera littoralis* (Chien et Dauterman, 1991), *Helicoverpa zea*, *Spodoptera littoralis*, *Heilothis virescens*, *Tichoplusia ni* (Yu 1989). Les seuls travaux approfondis sur les GST de Coléoptères ont été réalisés sur le vers de farine, *Tenebrio molitor* (Kostaropoulos et al. 1996).

Jusqu'à présent, aucune recherche approfondie n'a été menée sur des auxiliaires entomophages et sur des Homoptères tels que les pucerons.

### **Chapitre 3**

## **Généralités sur la famille des Brassicaceae**

### ***Position systématique et importance agronomique***

Les Brassicaceae présentent une importance économique non négligeable et sont cultivées à des fins diverses. Les productions de crucifères sont en expansion par rapport au début des années 1990. Plus de 60.10<sup>9</sup> de tonnes de choux et 35.10<sup>9</sup> de tonnes de graines de colza ont été produites dans le monde en 1997, ce qui correspond à des augmentations respectivement de près de 15 et 30% depuis 1991 (FAO, 1997). Les Brassicaceae constituent une part importante des ressources alimentaires pour l'homme et les animaux. En 1997, les choux représentaient 10.7% de la production maraîchère mondiale. Plus de 11% de la matière grasse d'origine végétale sont produits à partir de colza (FAO, 1995 et 1997). Ces plantes sont aussi cultivées comme condiment. En alimentation animale, elles sont essentiellement utilisées sous forme de tourteaux riches en protéines (9.8% proviennent de colza ; FAO, 1995).

La famille des Brassicaceae est constituée de 380 genres et près de 3000 espèces végétales, principalement distribuées en régions tempérées. Elle appartient au sous embranchement des Angiospermes, à la classe des Dicotylédones et à l'ordre des Capparales (De Langhe et al, 1978). Ces plantes herbacées sont principalement des annuelles présentant des feuilles alternes, sans stipules, et l'inflorescence est généralement un corymbe ou une grappe. Les fruits sont linéaires, oblong à sphérique et fournissent des caractères taxonomiques importants pour la détermination des tribus, des genres et des espèces



(Heywood, 1993). La famille botanique la plus proche est celle des Capparaceae qui présente des similarités chimiques. En effet, ces deux taxa contiennent de hautes teneurs en glucosinolates (Kjaer, 1976). Ces derniers ont aussi été détectés dans 9 autres familles de plantes (Gyrostemonaceae, Limnanthaceae, Resedaceae, Tropaeolaceae, plus rarement dans les Caricaceae et les Euphorbiaceae ; Fenwick *et al*, 1983).

### **Caractéristiques chimiques : les glucosinolates**

Les glucosinolates, anciennement appelés glucosides d'huile de moutarde, sont des  $\beta$ -thioglucosides ayant une très grande similitude de structure. Seul le radical aglycone de la molécule est très variable (Figure 5). Ces métabolites secondaires de plantes sont présents dans tous les organes de nombreuses espèces végétales, en particulier celles de la famille des Brassicaceae. Sous l'action d'une enzyme endogène, la myrosinase, les glucosinolates sont hydrolysés en composés qui confèrent l'odeur caractéristique «de choux».

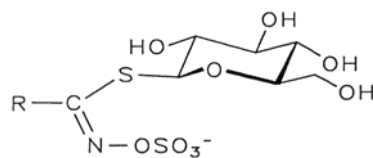


Figure 5 : Structure générale d'un glucosinolate (Kjaer, 1976).

Ingérés en faibles quantités, les glucosinolates et les isothiocyanates induisent une flaveur ou un goût piquant (moutarde) mais peuvent avoir un effet négatif sur la santé du consommateur ou sur la qualité des produits d'élevage. En alimentation animale, le tourteau de colza

est responsable de la diminution des performances zootechniques lorsqu'il est utilisé trop abondamment (Baudet *et al*, 1988). En particulier, les dérivés du 2-hydroxy-3-butenylglucosinolates (progoitrine) qui représentent plus de 80% de ce type de glucoside dans le colza et qui sont responsables de la production de goitrine (5-vinyl-1,3-oxazolidine-2-thione) induisent des goitres chez les animaux (Heaney et Fenwick, 1995). Dès lors, une sélection variétale de colza à faible teneur en glucosinolates a été réalisée. Actuellement, les variétés cultivées sont « 00 », c'est-à-dire à basse teneur en glucosinolates (inférieure à 20 $\mu$ mol/g de graines). Les techniques classiques de sélection ont permis de réduire de huit à dix fois le contenu en glucosinolates aliphatiques. Une réduction complémentaire et une élimination/modification « tissus spécifiques » pourraient aboutir à une amélioration significative de ces cultures. Elle pourrait être réalisée par génie génétique en régulant l'expression des enzymes de biosynthèse de ces composés. Toutefois, aucun gène responsable de la synthèse de glucosinolates n'a été mis en évidence jusqu'à présent.

### **Les glucosinolates dans la plante**

La sinigrine et la sinalbine sont les premiers composés qui ont été isolés au siècle dernier à partir respectivement de la moutarde noire (*Brassica nigra* L.) et de la moutarde blanche (*Sinapis alba* L.). La glucotropaéoline a ensuite été synthétisée par Ettliger et Lundeen (1957). Le développement de techniques d'analyses chromatographiques et spectroscopiques a permis d'identifier un nombre

important de glucosinolates : plus d'une centaine de composés sont connus (Fenwick *et al*, 1983). Tous possèdent la même structure et diffèrent uniquement par la nature de la chaîne latérale. Les origines diverses de ces glucosides dans le règne végétal et leur homogénéité de structure ont conduit à l'utilisation d'une nomenclature simple : le nom du glucosinolate est formé du préfixe « gluco » et d'un suffixe rappelant l'origine botanique. Les exceptions à ces règles sont celles qui étaient connues antérieurement.

Ettlinger *et al* proposèrent en 1961 une nomenclature plus systématique : on utilise un préfixe correspondant au nom de la chaîne latérale et le suffixe « glucosinolate ». Cette nomenclature fait apparaître la fonctionnalité de la chaîne latérale, très importante dans les réactions de dégradation. Les glucosinolates peuvent être classés en plusieurs familles en fonction de cette chaîne latérale : les alkyle-, alcényle-, aralkyle-, thio- et les indolyle-glucosinolates. Certains glucosinolates sont largement répandus ou au contraire spécifiques d'un taxon botanique (Underhill, 1980). Leur quantité et leur nombre sont très variables d'une espèce végétale à une autre : de 2 à 30 différents avec des teneurs allant de 0,01 à 100 $\mu$ mol/g de graines (Fenwick *et al*, 1983; Daxenbichler *et al*, 1991). Des variations importantes peuvent également être observées à l'intérieur d'une espèce, d'une variété ou entre plantes ou organes de plante. A titre d'exemples, les quantités et la diversité des glucosinolates présents dans plusieurs espèces de *Brassica* sont présentées au Tableau 2.

Tableau 2 : Concentrations moyennes en glucosinolates ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$  poids sec) d'échantillons de feuilles de diverses espèces de Brassicaceae (Cole, 1997).

Glucosinolates	Espèces de Brassica									
	<i>B. carinata</i>	<i>B. juncea</i>	<i>B. nigra</i>	<i>B. fruticulosa</i>	<i>B. spinescens</i>	<i>B. villosa</i>	<i>B. macrocarpa</i>	<i>B. oleracea</i>	<i>B. campestris</i>	<i>B. napus</i>
Glucobérine	0,6	0,3	0,2	0,2	0,1	5,3	2,1	0,4	0,2	0,2
Progoitrine	0,3	0,4	0,1	0,7	0,7	0,1	0,1	3,9	13,1	6,4
Sinigrine	37,7	78,3	23,8	5,6	2,2	2,3	14,3	3,5	1,0	1,1
Glucoraphanine	t	0,2	t	t	t	t	t	0,1	t	0,1
Gluconapoléférine	t	t	0,3	t	0,6	t	0,1	2,9	2,3	1,3
Gluconapine	0,4	2,9	237,0	128,0	53,0	0,3	0,1	2,6	6,7	2,3
Glucobervérine	0,1	0,3	12,1	0,2	1,8	18,9	17,3	2,1	0,1	0,1
Glucobrassicinapine	t	0,5	1,1	0,6	1,7	0,1	t	1,7	3,8	0,4
Glucoérucine	t	t	t	0,2	t	t	t	t	t	t
Glucobrassicine	2,9	0,9	6,8	0,8	0,8	6,2	2,1	31,6	15,9	8,1
Gluconasturtiine	t	0,1	0,2	t	t	t	0,2	1,0	0,1	0,1
Néoglucobrassicine	t	0,0	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	3,0	2,0	0,2
<b>Quantités totales</b>	41,8	83,9	282,0	136,6	61,1	34,8	37,6	52,9	51,3	20,6

t : quantité de glucosinolates non quantifiable, à l'état de trace

## Biosynthèse des glucosinolates

### *Elongation des chaînes latérales*

La biosynthèse des glucosinolates comprend trois étapes indépendantes : la synthèse de la chaîne allongée d'acides aminés, la conjugaison au groupe glucone commun à tous les glucosinolates et enfin les modifications des chaînes latérales. La chaîne d'acides aminés provient de la transamination des protéines produisant les  $\alpha$ -kétosides correspondants. Ensuite, la condensation avec l'acétyl-coenzyme A et une seconde transamination permettent de retrouver le groupe d'acides aminés (similaire à la conversion de la valine en leucine). La preuve biochimique de la fonctionnalité de ce processus

est basée sur la formation de la chaîne allongée de glucosinolates après administration *in vivo* aux plantes d'acides aminés et d'acétate (Underhill *et al*, 1973). Un locus *Gsl-elong* est responsable de la régulation la longueur de la chaîne latérale aliphatique et probablement aussi la quantité totale de glucosinolates de type aliphatique (Mithen, 1995) .

### ***Développement du groupe glucone***

La première étape de la formation du glucone est la conversion de l'acide aminé en oxime. Divers enzymes interviennent dans ce processus. La tyrosine et la phénylalanine sont transformées en oximes. Les systèmes enzymatiques intervenant dans ces transformations sont des monooxygénases à cytochromes P450, flavin – monooxygénases et des peroxydases. Ces observations ont mis en évidence la similarité de ces enzymes catalysant la conversion des acides aminés lors de la biosynthèse des glucosides cyanogéniques secondaires de plantes (Poulton et Moller, 1993).

### ***Conversion des oximes en glucosinolates***

La conversion des oximes en thiohydroxymates est encore peu connue. Le taux élevé d'oxydation du thiohydroxymate serait obtenu par oxydation de l'oxime en un composé *aci*-nitro, accepteur d'un donneur thiol (Ettlinger et Kjaer, 1968). La cystéine est la source de soufre la plus efficace, suggérant que ce composé est le donneur immédiat de thiol dans les conditions normales. L'étape finale de la

production du glucone est la S-glucosylation du thiohydroxymate par une glucosyltransférase. Un désulphoglucosinolate est produit et est ensuite sulphaté par une 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulphate (Halkier et Du, 1997).

### ***Modifications des chaînes latérales***

Des modifications secondaires des chaînes latérales peuvent se produire après la formation du glucone. En particulier, les chaînes aliphatiques dérivant de la méthionine sont fortement modifiées. La variation importante des structures de ces chaînes aliphatiques n'est pourtant due qu'à la variation génétique de trois loci : *Gsl-oxid*, *Gsl-alk* et *Gsl-oh* (Giamoustaris et Mithen, 1996 ; Mithen, 1995). Les allèles du locus *Gsl-oxid* sont responsables de l'oxydation du groupe méthyle-thiol des chaînes méthyle-sulphinyle-alkyle et méthyle-sulphonyle-alkyle. Le locus *Gsl-alk* engendre la production d'homologues alkényle de glucosinolate en supprimant le groupe méthyle-thio suivi de l'insertion d'une double liaison. *Gsl-oh* régule la désaturation et l'addition de groupe hydroxy des alkényle-glucosinolates. La plupart des allèles de ces trois loci sont spécifiques de la longueur de la chaîne latérale, ce qui explique comment ces loci , en combinaison avec les allèles *Gsl-elong*, peuvent engendrer une importante diversité de glucosinolates.

### **Hydrolyse enzymatique des glucosinolates**

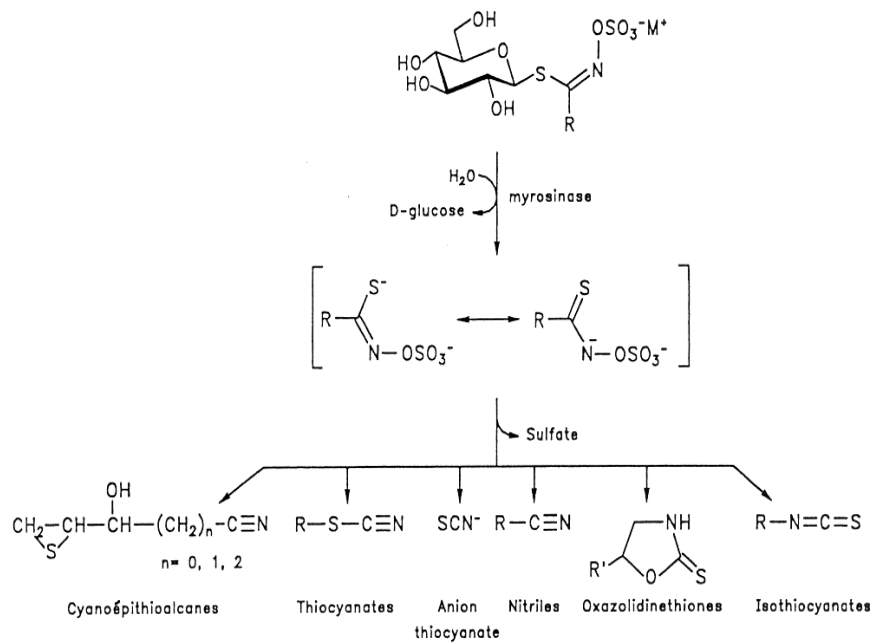
La myrosinase est présente dans les plantes qui contiennent les glucosinolates et permet de catalyser la dégradation de ces glucosides.

Ces enzymes sont également appelés thioglucosidases. Leur activité a aussi été détectée dans la mouche du chou (Mc Gibbon et Allison, 1968) et la flore microbienne intestinale de mammifères (Oginsky *et al*, 1965). Certaines caractéristiques physico-chimiques et biochimiques de ces enzymes sont différentes mais leur spécificité envers les glucosinolates est toujours la même (Björkman, 1976).

Dans la plante, la myrosinase est située dans des cellules appelées idioblastes, présentant ainsi une différenciation particulière dans un tissu destiné à une autre fonction. Cet enzyme est uniformément présent dans le cytoplasme tandis que les glucosinolates sont confinés dans les vacuoles (Grob et Matile, 1979). Cette localisation permet d'expliquer la stabilité des glucosides dans les tissus intacts et leur dégradation observée lors de la perturbation de l'organisation cellulaire correspondant notamment à l'attaque des insectes phytophages. La distribution périphérique de ces cellules dans les organes végétatifs laisse penser que cette réaction constitue un moyen de défense non sélectif contre les ravageurs de la plante (Birch, 1990).

La myrosinase hydrolyse la liaison thioglucosidique des glucosinolates et engendre la formation de glucose et d'un thiohydroximate-O-sulfonate. Ce dernier est instable et va spontanément se transformer en un produit de dégradation qui possède généralement un effet biologique prononcé. Un sulfate est ensuite libéré, accompagné d'un ou de plusieurs isothiocyanates, thiocyanates, cyanoépihalcanes, nitriles ou oxazolidine-2-thiones (Figure 6). La nature des produits de dégradation est fonction de la nature de la

chaîne latérale et des conditions du milieu (notamment le pH). La myrosinase est plus ou moins active en fonction de son origine botanique. L'activité spécifique de l'enzyme extrait de la moutarde blanche (*S. alba*) est 5 à 10 fois supérieure à celle du colza (*B. napus*)



(Björkman, 1976).

Figure 6 : Dégradation enzymatique des glucosinolates (Halkier et Du, 1997)

### Ecologie chimique des glucosinolates

Ces composés secondaires constituent un système de défense de la plante face aux attaques de ravageurs généralistes mais sont également impliqués dans la reconnaissance de ces plantes par de nombreux insectes spécialistes de Brassicaceae. Plus de 80 espèces de Lépidoptères, de Coléoptères, de Diptères mais aussi d'Hémiptères sont inféodés aux plantes de Brassicaceae (Tableau 3; Aliabadi et



Whitman, 2001). Divers isothiocyanates (ITC) sont volatils et jouent généralement un rôle de substances informatives pour les micro-organismes et les arthropodes (David et Garnier, 1966). Aucun rôle physiologique primaire n'a été jusqu'à ce jour démontré chez la plante pour les glucosinolates excepté une utilisation du groupe soufré en cas de déficience en soufre.

Le caractère remarquable des interactions Brassicaceae – insectes est lié à l'induction de modifications chimiques chez la plante par l'arthropode (Dicke *et al*, 1990). Suite à l'attaque de ravageurs phytophages, les crucifères émettent des substances volatiles, particulièrement actives vis-à-vis de l'entomofaune associée. S'il est connu depuis longtemps (Feeny, 1976) que les plantes produisent des métabolites pour se protéger des attaques d'insectes phytophages, les études relatives à la production de substances allélochimiques en relation avec les dégâts occasionnés par les ravageurs sont plus récentes. Les glucosinolates et leurs produits de dégradation sont responsables de nombreux effets d'importance biologique vis-à-vis de l'entomofaune associée aux plantes de Brassicaceae.

### ***Localisation et acceptation de la plante hôte***

La plupart des produits de dégradation des GLS sont volatils. Les insectes, principalement les spécialistes de cette famille botanique, sont attirés par ces molécules et localisent ainsi la plante hôte : *Plutella maculipennis*, *Mamestra brassicae*, *Ceuthorhynchus napi* ... *Brevicoryne brassicae*, le puceron du chou, utilise la présence de glucosinolates lors du choix de la plante hôte quand ils arrivent sur un

nouveau site d'infestation. S'ils atterrissent sur une plante et insèrent leur stylet, ils quittent le support végétal lorsque les glucosinolates, sont absents (van Emden, 1972). Une liste détaillée des insectes inféodés aux crucifères est présentée par Aliabadi et Whitman (2001).

Tableau 3 : Liste des espèces d'insectes phytophages inféodées aux plantes de Brassicaceae (Aliabadi et Whitman, 2001)

	Famille	Espèces
<b>Heteroptera</b>	Aphididae	<i>Brevicoryne brassicae</i> L., <i>Pemphigus populitransversus</i> , <i>Myzus persicae</i> Sultzer, <i>Lipaphis erysimi</i> Kaltenbach
	Lygaeidae	<i>Nysius niger</i> Baker
	Pentatomidae	<i>Eurydema ventrale</i> L., <i>E. oleraceum</i> , <i>Murgantia histrionica</i> Hahn
<b>Coleoptera</b>	Nitidulidae	<i>Meligethes aeneus</i> F., <i>M. viridescens</i> F.
	Chrysomelidae	<i>Entomoscelis americana</i> Brown, <i>Altica oleracea</i> (L), <i>Phaedon brassicae</i> Baly, <i>P. cochleriaeh</i> , <i>Psylliodes chrysocephala</i> , <i>Lisytroderes costriostriis</i> , <i>Phyllotreta striolata</i> Fab., <i>P. armoraciae</i> , <i>P. atra</i> , <i>P. cruciferae</i> , <i>P. tetrastigma</i> , <i>P. nemorum</i> , <i>P. undulata</i>
	Curculionidae	<i>Ceuthorhynchus napi</i> , <i>C. assimilis</i> Paykull, <i>C. quadridens</i> Panzer, <i>C. pleurostigma</i> Marsham, <i>C. constrictus</i> , <i>C. pallidactylus</i> Marsham, <i>C. rapae</i> Gyllenhal
<b>Lepidoptera</b>	Pieridae	<i>Pieris brassicae</i> , <i>P. mannii</i> , <i>P. napi oleracea</i> , <i>P. rapae</i> , <i>P. callidice</i> , <i>P. virginienis</i> , <i>P. chloridice</i> , <i>Pontia protodice</i> , <i>P. sisymbrii</i> , <i>P. daplidice</i> , <i>P. occidentalis</i> , <i>Anthocharis sara</i> , <i>A. cethura</i> , <i>A. midea</i> , <i>A. lanceolata</i> , <i>A. cardamines</i> , <i>Ascia monuste</i> , <i>Euchloe hyantis</i> , <i>E. olympia</i> , <i>E. ausonia</i> , <i>E. creusa</i> , <i>E. simplonia</i>
	Noctuidae	<i>Mamestra brassicae</i> L., <i>M. oleracea</i> , <i>Trichoplusia ni</i> Hübner, <i>Autographa gamma</i> L., <i>A. californica</i> Sepeyer, <i>A. precatationis</i> Guenée, <i>Agrotis segetum</i> , <i>Megalographa biloba</i> (Stephens), <i>Noctua pronuba</i> (L.), <i>Spaelotis clandestina</i> (Harris), <i>Agnorisma badinodis</i> (Grote), <i>Abagrotis alternata</i> (Grote)
	Pyalidae	<i>Evergestis rimosalis</i> , <i>E. pallidata</i> , <i>E. extimalis</i> (Scopoli), <i>Hellula rogatalis</i> Hulst, <i>H. phidilealis</i> (Walker), <i>Eustixia pupula</i> (Hübner)
	Plutellidae	<i>Plutella sylostella</i> , <i>P. porrectella</i> (L.), <i>P. maculipennis</i> <i>Rhigognostis senilella</i> (Zetterstedt), <i>R. incarnatella</i> (Steudel), <i>Eidophasia messingiella</i> (Fischer von Röslerstamm)
	Tortricidae	<i>Selania leplastriana</i>
<b>Diptera</b>	Cecidomyiidae	<i>Dasineura brassicae</i> , <i>Contarinia nasturtii</i> Kieffer
	Agromyzidae	<i>Liriomyza brassicae</i>
	Anthomyiidae	<i>Delia radicum</i> , <i>D. brassicae</i> , <i>D. floralis</i>
	Drosophilidae	<i>Scaptomyza flava</i>

Si les ravageurs phytophages sont attirés par les molécules émises par la plante, les isothiocyanates, certains insectes entomophages utilisent également ces médiateurs chimiques. Vet et Dicke (1992) ont démontré l'effet de l'allylisothiocyanate produit par les Brassicaceae sur l'orientation du parasitoïde *Diaeretiella rapae* (Braconidae).

### ***Stimulation de ponte***

L'effet stimulant de l'oviposition de la sinigrine a été démontré dans le cas des espèces de Lépidoptères du genre *Pieris*. Les pontes sont déposées sur des papiers filtres tant que ceux-ci sont préalablement trempés dans une solution de sinigrine. Traynier et Truscott (1991) ont ainsi stimulé la ponte de *Pieris rapae* en utilisant des solutions de glucobrassicine à partir de concentrations de l'ordre de  $10^{-6}$  M. D'une manière générale, *P. rapae* et *P. napi* sont plus sensibles aux glucosinolates aromatiques et indoliques plutôt qu'aux représentants aliphatiques (Huang et Renwick, 1994). De même, le papillon *Plutella xylostella*, le diptère Anthomyiidae *Delia brassicae* sont stimulés à pondre avec divers GLS et isothiocyanates à des doses de 2 mM (Stadler, 1976 ; Reed et al, 1989). L'effet de stimulant de ponte chez *D. brassicae* semble résulter d'une réponse à la fois du système olfactif chez l'insecte mais aussi d'une stimulation de contact de la plante.

### ***Stimulation d'alimentation***

Pour la majorité des insectes consommant des Brassicaceae, la présence de GLS dans les tissus végétaux est une nécessité absolue

lors de la phase d'acceptation de la nutrition (Bartlett, 1996). Le stimulus positif que représente la sinigrine pour les Lépidoptères et les pucerons inféodés aux crucifères a été démontré. Une augmentation de 20 % des quantités de nourriture consommée a été observée lorsque la sinigrine est ajoutée à la ration alimentaire de larves de Pieridae. Lorsque les larves sont transférées sur diète artificielle sans sinigrine, elles refusent de s'alimenter (Dethier, 1972).

La présence de glucosinolates dans la plante hôte induit la nutrition du puceron du chou (Nault et Styer, 1972ab). Ce dernier peut néanmoins s'alimenter sur d'autres plantes telles la fève (*Vicia faba*) si des injections préalables de sinigrine ont été réalisées dans cette plante. Selon van Emden (1972), la consommation de la plante hôte par *B. brassicae* est directement liée à la concentration en glucosinolate dans le support végétal. Les organes d'âge jeune de la plante sont les cibles privilégiées de l'attaque des phytophages spécialistes de Brassicaceae. En effet, ces organes sont les sites de synthèse les plus actifs au niveau des glucosinolates. Dans le cas de *Myzus persicae*, puceron généraliste qui tolère la présence de métabolites secondaires mais qui n'est pas spécifiquement inféodé aux crucifères, il s'installe sur les organes plus âgés, utilisant les parties de plante à faible teneur en glucosides (Hopkins *et al*, 1998).

### ***Rôle de phéromones***

Les isothiocyanates peuvent être également utilisés comme phéromone par des pucerons. Lorsque *Lypaphis erysimi* est dérangé ou lorsqu'il est broyé, le (E)- $\beta$ -farnésène et plusieurs isothiocyanates issus de la dégradation de glucosinolates d'origine végétale sont émis

et agissent comme phéromone d'alarme pour cette espèce aphidienne. L'efficacité du message d'alarme de cette dernière est supérieure avec les ITC plutôt qu'avec le (E)- $\beta$ -farnésène seul (Dawson et al., 1987).

Les glucosinolates apparaissent comme une classe de composés présentant des propriétés biologiques multifonctionnelles. Ces substances secondaires produites par les Brassicaceae affectent de nombreuses espèces entomologiques, à différents niveaux trophiques. L'étude de l'écologie chimique des relations entre les taxa végétaux de cette famille botanique et les insectes est l'illustration des interactions entre les organismes vivants (Whitman, 1988).

## Chapitre 4

### Biologie, écologie et importance de l'entomofaune étudiée

#### Introduction

De nombreuses espèces d'insectes sont inféodées aux Brassicaceae : des Lépidoptères (47 espèces), des Coléoptères (22 espèces), des Diptères (7 espèces) mais aussi des Hémiptères (8 espèces) (Aliabadi et Whitman, 2001). Parmi les quatre espèces de pucerons ravageurs de crucifères, deux sont largement répandues dans nos régions : *Myzus persicae* et *Brevicoryne brassicae*. Ces pucerons se différencient par leur comportement alimentaire. *M. persicae* est polyphage alors que *B. brassicae* est spécialiste des espèces de Brassicaceae. Comme les autres Aphididae, ces ravageurs se multiplient rapidement, se dispersent facilement sur de longues distances et occasionnent d'importants dégâts à la plante en prélevant la sève mais également en transmettant de nombreux virus. *M. persicae* peut transmettre plus de 100 maladies virales à ses diverses plantes hôtes (plus de 400 appartenant à 50 familles botaniques; Quaglia *et al*, 1993). Des traitements aphicides spécifiques sont donc appliqués dans les cultures de Brassicaceae telles que le colza, les cultures de choux et autres plantes maraîchères. L'utilisation intensive d'insecticides contre les ravageurs de cultures a été à la base de la sélection d'individus capables de survivre et de se reproduire en présence de pesticides. Ces phénomènes de résistance s'accroissent toujours plus rapidement, après quelques années d'utilisation (Field *et al*, 1989 ; Dewar *et al*, 1992 ; Devine *et al*, 1996). Il apparaît dès lors indispensable de considérer des méthodes de lutttes alternatives pour contrôler ces

ravageurs phytophages, comme l'utilisation des agents biologiques tels que les prédateurs aphidiphages. Le point de départ de la mise en œuvre et la réussite de la lutte biologique est la connaissance de la biologie et de l'écologie des ravageurs, des auxiliaires mais également l'étude des interactions de l'entomofaune avec les espèces végétales.

### ***Les pucerons***

#### **Caractéristiques générales**

Appartenant à l'ordre des Hémiptères, au sous-ordre des Homoptères, les 4000 espèces de pucerons identifiées dans le monde sont réparties en quatre familles : Eriosomatidae (Pemphigidae), Chermesidae (Adelgidae), Phylloxeridae et Aphididae (Dixon, 1998). Ces insectes de taille réduite (de 1 à 10 mm), hétérométaboles (à métamorphose incomplète) et héli-métaboles (stades larvaires ressemblent au stade adulte) sont phytophages et présentent un appareil buccal de type piqueur-suceur. Le corps de forme et de longueur variables peut présenter à l'arrière de l'abdomen des protubérances appelées cornicules, permettant l'excrétion de miellat, sécrétion sucrée permettant l'élimination de diverses substances ingérées par le puceron.

Des périodes de reproduction asexuée, par parthénogénèse, sont observées en alternance avec la reproduction sexuée chez toutes les espèces aphidiennes. Cette parthénogénèse, couplée à la présence de générations téléscopiques, permet aux pucerons de se multiplier très rapidement. Les pucerons présentent une variété de cycles de

développement, combinant des modes de reproduction sexuée et asexuée, et des associations particulières avec leurs plantes hôtes.

### **Localisation des plantes hôtes**

Les formes ailées des pucerons évitent certaines plantes lors de l'arrivée dans un biotope (Kennedy et al., 1959). Ces réponses comportementales sont régies par des stimuli olfactifs (Bodenheimer et Swirski, 1957) bien que certains signaux visuels sont également impliqués. Chez *M. persicae*, les couleurs verte et jaune ont été corrélées à la localisation de plante hôte adéquate. Un comportement de recherches ponctuelles aléatoires est observé chez les espèces aphidiennes et fournit au puceron une information sur les propriétés physiques et chimiques de la plante. A ce moment, l'acceptabilité du site investigué est déterminée. Ensuite, les insertions répétées du stylet de l'homoptère dans les organes végétaux testés sont plus nombreuses et aboutissent à l'acceptation de la plante hôte lorsque cette dernière est jugée adéquate (Muller, 1962 et 1965).

### **Plantes hôtes et comportement alimentaire**

La plupart des pucerons sont autoeciques, s'alimentant aux dépens d'une ou de quelques espèces d'un genre de plantes (Blackman et Eastop, 1985). Près de 10% des espèces sont hétéroeciques, vivant de l'automne au printemps sur une plante hôte primaire et migrant l'été sur des hôtes secondaires. Même si ces espèces hétéroeciques sont considérées comme polyphages, il faut noter que la majorité d'entre-



elles ne vivent que sur une espèce végétale à la fois, et sont de fait séquentiellement des monophages. Cependant, des espèces comme *M. persicae* présentent simultanément une large gamme de plantes hôtes et sont de réels généralistes alors que la plupart des espèces, dont *B. brassicae*, présentent des degrés élevés de spécificité d'hôtes, même pour des taxa hétéroeciques (Dixon, 1998).

Les espèces dioeciques vont sur l'hôte primaire, qui est une essence ligneuse (arbre ou arbuste) et migrent ensuite sur des hôtes secondaires herbacés avant de retourner sur les premiers. Les fondatrices se nourrissent de l'hôte primaire alors que les femelles ailées parthénogénétiques de la seconde génération (et des suivantes) migrent, généralement au printemps et au début de l'été, sur les hôtes secondaires, où plusieurs générations parthénogénétiques se développent. Les pucerons retournant à l'automne sur l'hôte primaire sont sexupares ou gynopares. Certaines espèces dioeciques sont capables d'accomplir leur cycle uniquement sur l'hôte primaire. Leur migration sur les hôtes secondaires en été est facultative tandis que d'autres espèces dioeciques doivent absolument effectuer ce transfert d'hôtes (Heie, 1980). Cette alternance d'hôtes peut être considérée comme une adaptation aux conditions nutritionnelles : les feuilles des espèces ligneuses sont plus riches en protéines au printemps. Pendant l'été, le feuillage des plantes herbacées est composé d'organes d'âge varié. Parmi eux, des jeunes feuilles et tiges représentant une source protéinique optimale sont continuellement disponibles pour les pucerons (Heie, 1980). L'évolution des modes d'alimentation chez les pucerons a engendré des associations étroites et spécifiques avec

certaines espèces végétales, affectant les valeurs adaptatives, le comportement de dispersion, les dynamiques de populations, la diversité spécifique et la dispersion géographique de ces Hémiptères (Dixon, 1998).

### **Evolution de la spécificité**

L'importante spécificité chez les pucerons est directement liée aux réponses comportementales régies par les signaux chimiques émis par le support végétal permettant aux pucerons de distinguer la plante hôte des non-hôtes et de différencier les parties de plantes adéquates ou non du point de vue nutritionnel. Si les caractéristiques chimiques de la plante (incluant la présence de substances secondaires) jouent un rôle important dans la spécialisation des pucerons face aux plantes hôtes, d'autres facteurs interviennent. La phénologie et la morphologie de la plante, la compétition avec d'autres espèces phytophages sur la plante hôte, mais aussi l'efficacité de prédation ou de parasitisme des auxiliaires entomophages sur certaines espèces végétales influencent aussi la spécificité du comportement alimentaire des pucerons (Dixon, 1998).

### **Description et biologie de *Myzus persicae* SULZER**

Le puceron vert du pêcher de la famille des Aphididae mesure de 1,5 à 2,5mm, de couleur vert jaunâtre, de forme ovoïde, présente des tubercules antennaires développés, des cornicules assez longues et légèrement renflées (Remaudière et Remaudière, 1993).

Espèce dioécique, les œufs sont déposés en automne sur diverses espèces du genre *Prunus* et éclosent dès la fin du mois de mars. La larve se développe et les adultes apparaissent trois semaines plus tard. De la mi - avril jusqu'à la mi – mai, 40 à 50 larves aptères sont produites par chaque fondatrice. Deux à trois générations de virginipares aptères se succèdent sur les plantes hôtes primaires (*Prunus* sp). La dernière génération est constituée uniquement par des virginipares ailées. En mai, le maximum d'infestation est atteint sur les *Prunus* sp et les pucerons ailés abandonnent le pêcher et migrent vers les hôtes secondaires appartenant aux familles les plus diverses : *Brassicaceae* (colza, chou, moutarde), *Solanaceae* (pomme de terre, tabac, tomate), *Asteraceae* (*Dahlia*), *Chenopodiaceae* (betterave, épinard), *Convolvulaceae* (liseron), *Boraginaceae* (*Borago*), ..

Les pucerons ailés génèrent une quinzaine de larves qui se développent en adultes aptères et engendrent une quarantaine de larves par géniteur.

Les sexupares ailés apparaissent dès septembre jusqu'à la fin de novembre. Ces pucerons retournent sur les *Prunus* spp., plantes hôtes primaires. La ponte s'échelonne sur 15 à 25 jours à raison de 5 à 10 œufs par femelle. Lors d'hivers rigoureux, la reproduction sexuée et la production d'œufs est l'unique forme de résistance pour la mauvaise saison. Néanmoins, les virginipares aptères ou ailés peuvent hiverner sur les plantes hôtes secondaires si le climat hivernal n'est pas trop rude (températures minimales supérieures à -15°C). Si ces pucerons survivent, ils peuvent produire des formes ailées dès février – mars si le climat est doux.

### **Description et biologie de *Brevicoryne brassicae* L.**

Le puceron cendré du chou de la famille des Aphididae est un insecte phytophage spécialiste des Brassicaceae. Mesurant de 2,1 à 2,6mm, il est globuleux, vert foncé recouvert d'une abondante pruinosité blanche (cire) et présente des cornicules assez courtes.

Présentant un cycle monoœcique sur les Brassicaceae, le puceron hiverne à l'état d'œuf dans les reliquats de culture et sur les Brassicaceae sauvages. Les œufs éclosent au début mars, les imagos aptères appelés fondatrices vont engendrer par parthénogenèse des femelles vivipares aptères ou ailées. En mai-juin, les pucerons ailés se disséminent sur de nouvelles espèces de crucifères où ils produisent par reproduction asexuée de jeunes pucerons qui forment des colonies. Le nombre de générations par an varie de 3 à 14. Les adultes ailés apparaissent dans les colonies principalement en juin et de septembre à début novembre. Les ailés sexupares de l'automne s'accouplent et les œufs d'hiver sont produits.

### ***Les auxiliaires entomophages***

Dans les écosystèmes, les auxiliaires entomophages représentent une composante non négligeable de l'entomofaune. A titre d'exemple, près de 7% des insectes collectés durant deux années en cultures maraîchères sont des prédateurs aphidiphages tels que les chrysopes, les syrphes, et les coccinelles (Colignon et al, 2001ab). La comparaison de l'évolution des populations de pucerons et des

prédateurs, et particulièrement des coccinelles, a permis de déterminer le rôle des auxiliaires dans la réduction du nombre de pucerons (Francis et al., 2001a). Dans la famille des Coccinellidae, deux espèces sont les plus fréquentes en Belgique, *Coccinella septempunctata* et *Adalia bipunctata* (Branquart et al., 1999 ; Francis, 2001b) .

### **Description et biologie d'*Adalia bipunctata* (L.)**

*A. bipunctata* (L.) appartient à l'ordre des Coléoptères, à la famille des Coccinellidae. Elle est fréquemment rencontrée dans toute l'Europe, en Afrique du Nord, en Corée, au Japon et en Chine (Majerus, 1989). Trois formes de colorations différentes sont observées chez l'espèce *A. bipunctata* : la forme *typica*, à élytres rouges avec 2 points noirs, la forme *quadrimaculata*, à élytres noires avec 4 points rouges et la forme *sestupunctata*, à élytres noires avec 6 points rouges. Les croisements entre ces trois formes ont donné, suivant la génétique mendélienne, un nombre incalculable de coloris sur les élytres (Majerus et Kearns, 1989 ; Majerus, 1994).

Insectes holométaboles, les coccinelles présentent 3 stades (œuf, larve, nymphe) avant l'imago. Les œufs sont produits du printemps au début de l'été par les adultes hivernant. La larve se nourrit pendant environ un mois, se nymphose et l'adulte émerge durant l'été. Deux à trois générations d'*A. bipunctata* peuvent être observées par an, notamment en fonction de l'abondance de proies. Les œufs d'*A. bipunctata* sont allongés, ovales, jaune clair à orange foncé (Iablokoff-Khinzorian, 1982). Ils sont déposés en amas de 20 à 50 sur la plante à proximité

des colonies de pucerons (Majerus, 1994). Avant l'éclosion, l'œuf s'assombrit au point de devenir noir. Les adultes peuvent déposer une trentaine de pontes par an. Le cycle de l'œuf à l'adulte nécessite 25 à 50 jours dans la nature. La ponte débute environ deux semaines après l'émergence des adultes (Iablokoff-Khnzorian, 1982).

La jeune larve consomme la coquille (chorion) de l'œuf d'où elle émerge et ensuite les œufs voisins si elle ne trouve pas de proie. La coccinelle passe par 4 stades larvaires mobiles (L1 à L 4). Le quatrième stade est suivi d'une phase d'immobilisation appelée pré-nymphe avant la nymphe proprement dite. D'abord orange pâle, cette dernière devient rapidement noirâtre. L'imago émerge en ouvrant l'extrémité de la nymphe. Les élytres sont très souples, de couleur jaune clair. La coloration définitive apparaît après quelques heures. Les adultes se dispersent pendant quelques semaines puis se rassemblent dans les différents sites d'hivernation.

A partir du mois d'août, *A. bipunctata* (L.) colonise *Salix caprea* L. (Salicaceae) ainsi que des plantes herbacées telles que *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae) et *Heracleum sphondylium* L. (Apiaceae) riches en pollen. Progressivement, *A. bipunctata* va quitter les habitats d'alimentation de la fin de l'été et va migrer vers les sites d'hivernation, troncs d'arbres et façades d'immeubles (Hemptinne, 1989). Le départ des sites d'hivernation s'échelonne de février à avril. Les coccinelles hivernantes se dispersent notamment dans les haies et dans les vergers où les espèces arborescentes commencent à fleurir. Les pucerons sont encore rares et les coccinelles se nourrissent principalement de pollen. Ensuite, les coccinelles quittent les vergers à

mesure que les fleurs disparaissent et migrent vers les peuplements d'orties (*Urtica dioica* L) sources très abondantes de pucerons à cette époque. Les prédateurs pondent abondamment dans cet habitat où se développe la première génération de l'année. A l'approche de l'été, *A. bipunctata* (L.) colonise une grande diversité de plantes cultivées et produit une deuxième génération (Hemptinne, 1989).

Pour faire face à la pénurie de pucerons, les coccinelles recourent à une nourriture végétale, pollen et nectar. Cette dernière assure la survie des prédateurs mais ne permet pas de reproduction (Hodek, 1973).

## **Chapitre 5**

### **Conclusions de l'étude bibliographique et buts des expérimentations**

Plusieurs hypothèses ont été avancées depuis plus de 40 ans afin d'expliquer l'écologie chimique de l'entomofaune associée aux espèces végétales qui produisent des substances secondaires comme moyen de défense contre les attaques des ravageurs phytophages. L'une d'elles propose que les insectes qui se sont spécialisés sur certaines plantes hôtes résistent aux molécules secondaires. Plusieurs enzymes de détoxification contribuent à la métabolisation des substances toxiques. Les glutathion S-transférases (GST) catalysent la conjugaison de diverses molécules électrophiles avec le glutathion, augmentant le caractère hydrophile des substances xénobiotiques. L'élimination de ces conjugués est facilitée et les molécules toxiques sont ainsi métabolisées.

Alors que les insectes phytophages ont développé des mécanismes biochimiques d'adaptation vis-à-vis des molécules secondaires émises par leurs plantes hôtes, d'autres arthropodes utilisent ces substances volatiles comme médiateurs chimiques de localisation de leur hôte mais peuvent aussi accumuler ces molécules allélochimiques végétales pour assurer leur propre défense face à leurs ennemis naturels. Les espèces de la famille botanique des Brassicaceae présentent des substances secondaires, les glucosinolates, dont les produits de dégradation sont notamment les isothiocyanates. Ces derniers jouent le rôle de kairomones pour de nombreux ravageurs comme certains pucerons mais aussi pour leurs parasitoïdes.



Les recherches réalisées visent à comprendre les interactions tritrophiques entre les Brassicaceae, les pucerons (spécialistes ou généralistes) et la coccinelle prédatrice *Adalia bipunctata*. Pour ce faire, différentes approches sont envisagées :

- (1) Comportementale : avec l'étude de la sélection des proies (pucerons) par la coccinelle et de l'impact des substances allélochimiques produites par les Brassicaceae,
- (2) Chimique : en analysant les deux premiers niveaux trophiques en tant que sources d'odeurs afin de déterminer précisément la composition des substances secondaires présentes dans les pucerons et les plantes étudiés,
- (3) Biologique : en déterminant les effets de diverses combinaisons d'espèces aphidiennes et de plantes hôtes sur les paramètres de développement et de reproduction, permettant le calcul des valeurs adaptatives (fitness) de la coccinelle prédatrice,
- (4) Biochimique : en étudiant les systèmes de détoxication qui permettent aux pucerons et au prédateur de faire face aux molécules allélochimiques de plantes hôtes : les glucosinolates et leurs produits de dégradation. Un modèle évolutif tritrophique plantes - pucerons (spécialistes et généralistes)-coccinelle est proposé. La purification et la caractérisation de la myrosinase de *Brevicoryne brassicae* et des glutathion S-transférases de *Myzus persicae* et de la coccinelle *Adalia bipunctata* sont réalisées.

- (5) Moléculaire : pour caractériser les systèmes enzymatiques impliqués dans la détoxification des substances allélochimiques produites par les Brassicaceae chez les pucerons et chez la coccinelle,
- (6) Immunologique : en produisant des anticorps anti-GST de coccinelles et en les utilisant comme méthode de révélation des glutathion S-transférases afin d'étudier plus précisément les phénomènes d'induction de ces GST par les molécules secondaires végétales.

## **Chapitre 6**

### **Etude de la localisation des proies en fonction de la plante hôte**

#### ***Introduction***

Lors de la localisation de proies dans leur habitat naturel, les prédateurs entomophages sont confrontés à une multitude de signaux chimiques émis par les végétaux et par l'entomofaune, dont notamment les pucerons. Une multitude de possibilités s'offre aux prédateurs, correspondant à la diversité d'espèces de proies potentielles en relation avec les plantes hôtes de ces dernières. Le caractère adéquat des proies implique directement la plante hôte aux dépens de laquelle les insectes phytophages s'alimentent. En effet, l'impact de substances allélochimiques végétales sur les paramètres biologiques de prédateurs aphidiphages a été évoqué pour expliquer la nocivité de certains pucerons qui ont la capacité de stocker des substances secondaires de la plante comme moyen de défense. Les larves de *C. septempunctata* n'atteignent pas leur complet développement et meurent dans les trois semaines lorsqu'elles sont nourries avec *Aphis sambuci* (Hodek, 1956). Blackman (1965, 1967) a également observé un effet négatif de cette espèce aphidienne ; même si la moitié des larves de coccinelles ont atteint le stade adulte, leurs poids étaient de moitié inférieurs à ceux des prédateurs nourris de pucerons témoins. Le passage du glycoside sambunigrine de la plante hôte *Sambucus nigra* dans la proie a été considéré comme étant la source de toxicité du puceron envers la coccinelle prédatrice (Hodek, 1956). D'autres espèces aphidiennes semblent aussi fonctionner de manière similaire et présentent une toxicité significative envers

plusieurs espèces de coccinelles aphidiphages : par exemples, *Macrosiphum aconitum* colonisant *Aconitum* sp. (contenant l'aconitine; Hawkes, 1920), *Aphis nerii* s'alimentant sur l'oléandre (contenant l'oléandrine et la nériine), *Macrosiphum albifrons* et *Aphis jacobaeae* colonisant respectivement *Lupinus mutabilis* et *Senecio* sp contenant divers alcaloïdes (Hodek et Honek, 1996).

La localisation de la proie, c'est à dire de l'espèce aphidienne dans le cas qui nous concerne, n'implique pas forcément que cette nourriture soit adéquate. En effet, les espèces de Coccinellidae consomment parfois des proies même si elles ne sont pas adaptées à leurs besoins. Dans ce cas, les paramètres de développement et de reproduction sont alors négativement influencés (Hodek et Honek, 1996). Ces auteurs ont d'ailleurs déterminé quatre catégories de proies pour les espèces prédatrices :

- les proies adéquates qui assurent un parfait développement et qui favorisent la reproduction;
- les proies acceptées qui permettent d'accomplir le cycle de développement sans trop de mortalité mais qui démontrent des effets négatifs sur la ponte;
- les proies alternatives qui sont consommées temporairement mais qui induisent de fortes mortalités, qui allongent les durées de développement et qui inhibent la reproduction;
- les proies toxiques qui provoquent une mortalité avant d'atteindre le stade adulte.

Avant d'étudier l'effet de différentes combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes (contenant des substances

allélochimiques) sur les paramètres biologiques des prédateurs Coccinellidae, une étude de la localisation des proies est envisagée en utilisant une méthode olfactométrique. Cette étape permettra d'observer si le prédateur répond systématiquement aux stimuli chimiques émis par toutes les espèces de pucerons ou si la coccinelle généraliste se comporte différemment en fonction des proies qui lui sont proposées. Différentes sources d'odeurs, simulant les diverses situations que peuvent rencontrer les prédateurs seront envisagées (notamment proies indemnes ou endommagées). Ces résultats devraient permettre de déterminer si le prédateur perçoit la toxicité potentielle de sa proie en reconnaissant certaines molécules volatiles ou si l'insecte aphidiphage réagit de manière similaire quelle que soit la source d'odeurs envisagée.

## **Matériel et Méthodes**

### **Choix et description de l'olfactomètre**

L'olfactomètre utilisé pour tester la réponse des larves de second stade (les individus de premier stade sont trop fragiles, de trop petite taille) d'*A. bipunctata* à différents stimuli a pour modèle celui de Vet et al. (1983) et est schématisé à la Figure 7. Trois plaques de Plexiglas transparent constituent l'appareillage. Une plaque de 1 cm d'épaisseur et de 20-30 cm de côté est évidée de façon à créer en son centre un quadrilatère à côtés concaves égaux qui forme les parois de l'arène expérimentale. La plus petite distance séparant les côtés opposés deux à deux est de 11 cm. Les quatre coins de ce quadrilatère sont perforés horizontalement d'une arrivée d'air de 5 mm de diamètre qui relie le bord de la plaque à l'intérieur de l'arène. Une plaque plus mince

(3 mm d'épaisseur) est fixée sur la première partie et sert de plafond. La chambre d'observation est complétée par une troisième plaque de Plexiglass d'1 cm d'épaisseur qui en constitue le fond. L'étanchéité de l'ensemble est assurée par deux vis papillons. De l'air est envoyé par une bonbonne après passage à travers 250 ml des paillettes de charbon actif. Cet air barbote ensuite dans de l'eau distillée afin d'être humidifié puis entre ensuite dans quatre débitmètres indépendants, chacun étant réglé au débit de 60 ml/min, qui divisent et contrôlent la circulation du flux dans les quatre bras du système. Trois arrivées d'air sont directement reliées à la chambre de manipulation. L'air provenant de la quatrième passe dans une cellule en verre de 25 ml, constituée de deux parties assemblées par une pince et un joint en caoutchouc adapté au système. Les échantillons émettant les stimuli (puçerons et/ou la plante) à tester sont placés dans cet élément en verre. Quatre champs d'odeur contigus sont créés par injection d'air dans la chambre. L'évacuation du flux est effectuée via un trou de 5mm de diamètre percé dans la plaque supérieure de la chambre d'observation. Cette perforation centrale sert également à introduire individuellement les insectes dans l'olfactomètre.

Les côtés incurvés de l'arène permettent d'obtenir quatre flux d'air indépendants et parfaitement délimités les uns des autres. Pour visualiser les quatre zones et calibrer l'appareil, une fumée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , résultat d'un mélange de  $\text{NH}_4\text{OH}$  et de  $\text{HCl}$  concentrés, est propulsé dans l'arène (Figure 8). Avant de débiter les tests olfactométriques proprement dits, l'appareillage a été nettoyé à l'éthanol pur, suivi par un rinçage à l'eau distillée pour éliminer les résidus de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

L'olfactomètre à quatre bras mis au point par Vet et al. en 1983 a été retenu pour tester les réponses des larves et les adultes d'*A. bipunctata* à différents stimuli car il présente plusieurs avantages par rapport à d'autres appareils et permet entre autre à l'insecte de tester les différentes substances avant de faire son choix. Par exemple, les champs d'odeurs dans un olfactomètre en Y ne sont pas contigus et une fois confiné dans l'axe des branches, l'insecte a difficilement accès à l'autre odeur. Il est donc difficile d'y tester sa préférence pour l'un des deux stimuli. En outre, des turbulences se créent à la jonction des bras du Y par conséquent les odeurs se mélangent. Enfin, la chambre de manipulation choisie est divisée en quatre champs d'odeurs délimités à travers lesquels la larve peut voyager facilement, permettant à l'insecte de tester les différentes sources d'odeurs avant de faire son choix.

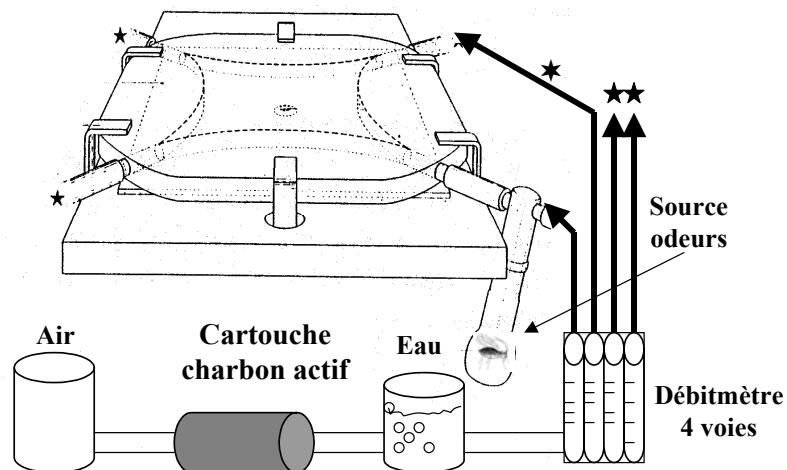


Figure 7 : Description de l'olfactomètre à 4 voies décrit par Vet et al. (1983). Les étoiles correspondent aux trois voies identiques, sources témoins.

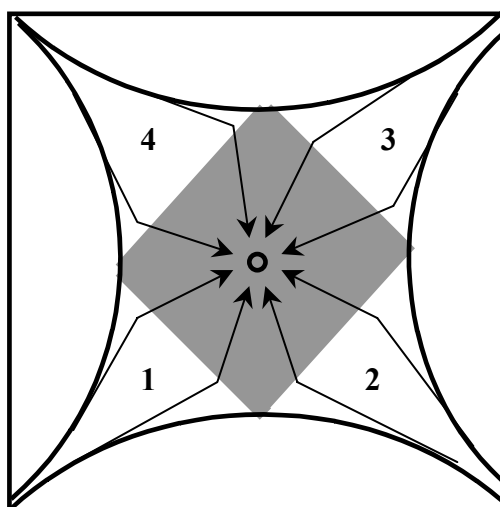


Figure 8 : Illustration des champs olfactifs (1 à 4) créés dans la chambre de manipulation par quatre flux indépendants de débit identique

Le choix de l'insecte est considéré comme effectif dès que l'individu sort de la zone centrale représentée en gris clair

### **Description et préparation du matériel biologique**

La fève de marais (*Vicia faba* L.), la moutarde blanche (*Sinapis alba* L.) et le colza (*Brassica napus* L.) ont été cultivés dans des pots en plastique de 10cm de diamètre dans des chambres conditionnées séparées à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  et 16 heures de luminosité. Les fèves ont été cultivées dans des pots contenant un mélange 1:1 de perlite:vermiculite, les plantes de Brassicaceae ont été semées dans des bacs en polystyrène de 20 cm x 30 cm contenant du compost ordinaire et ont été transplantées dans des pots en plastique avec le même substrat lorsque les plantes étaient au stade deux feuilles vraies.

Les espèces de pucerons *Acyrtosiphon pisum* (Harris) et *Myzus persicae* Sultzer sont élevées au laboratoire depuis de nombreuses



années alors que *Brevicoryne brassicae* L. a été collecté dans un champ de moutarde blanche à Waremmes en septembre 1998. *A. pisum* et *M. persicae* ont été élevés sur la fève et constituent les témoins exempts de glucosinolates. La seconde espèce aphidienne et *B. brassicae* ont été élevés en masse sur le colza et la moutarde blanche. Les espèces de Brassicaceae ont été inoculées de pucerons au stade 5-6 feuilles vraies. Chaque combinaison de l'espèce végétale et de celle de puceron a été cultivée dans une chambre conditionnée séparée.

Un élevage de masse d'*A. bipunctata* est maintenu depuis de nombreuses années au laboratoire. Les adultes sont élevés dans des boîtes en plastique aérées. *A. pisum* est utilisé pour nourrir les coccinelles aux stades adultes et larvaires. Des larves de deuxième stade âgées de 72 heures et des adultes (n = 20 par stimulus) sont utilisés individuellement dans l'olfactomètre. Chaque individu est déposé à l'aide d'un pinceau au centre de la chambre de manipulation et est observé pendant 20 minutes. La superficie de l'olfactomètre est subdivisée en une zone centrale et en quatre zones correspondant aux quatre sources d'odeurs (Figure 8). Dès son introduction, la durée de séjour de l'insecte dans les différentes zones est relevée. La localisation de la larve dans un des quadrants à l'issue de la période d'observation est considérée comme le choix du comportement de recherche des prédateurs. La chambre d'observation est nettoyée à l'éthanol puis à l'eau distillée et séchée à l'aide d'un papier absorbant entre chaque test olfactométrique.

## **Sources d'odeurs comme médiateurs chimiques potentiels**

Plusieurs stimuli sont utilisés comme source d'odeurs :

1. des pucerons indemnes: *A. pisum*, *M. persicae* ou *B. brassicae*;
2. des pucerons broyés: parmi une des trois espèces précitées;
3. une section de plante hôte: *V. faba*, *B. napus* ou *S. alba*;
4. des pucerons et une section de plante hôte: combinant les 3 espèces végétales et les 3 taxa aphidiens précités.

Les échantillons de pucerons et de plantes hôtes (250 mg d'insectes ou de plante) sont placés dans la cellule prévue, sur le passage d'air d'une des quatre voies de l'olfactomètre.

Des essais complémentaires ont été réalisés en utilisant du (E)- $\beta$ -farnésène, phéromone d'alarme de pucerons bien connue. Cette dernière a été purifiée à partir de pucerons *A. pisum* dans de l'hexane (Lognay, données non publiées). Le protocole des observations réalisées avec la solution phéromonale est identique à celui qui est décrit plus haut pour tester les sources d'odeurs émises par le matériel biologique est appliqué. Le (E)- $\beta$ -farnésène est injecté dans la cellule « source » à la seringue Hamilton. Trois minutes d'attente précèdent le raccordement de la source d'odeurs à la chambre d'observation pour permettre l'évaporation de l'hexane.

## **Résultats**

Les choix des coccinelles relatifs aux tests olfactométriques basés sur l'utilisation des trois espèces de pucerons, indemnes ou

endommagées, en fonction de trois plantes hôtes, comme stimuli chimiques sont présentés Tableaux 4 A et B.

<b>A</b>		<b>Combinaisons</b>		<b>Fréquences</b>	$\chi^2$	<b>P</b>
<b>Plantes hôtes</b>	<b>Pucerons</b>		<b>observées</b>			
<i>Vicia faba</i>	<i>A. pisum</i>	indemnes	0,40	2,40	0,121	
		broyés	0,45	4,27	0,039	*
	<i>M. persicae</i>	indemnes	0,35	1,07	0,301	
		broyés	0,50	6,67	0,010	**
<i>Brassica napus</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	0,40	2,40	0,121	
		broyés	0,45	4,27	0,039	*
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	0,30	0,27	0,603	
		broyés	0,25	0,00	1,000	
<i>Sinapis alba</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	0,35	1,07	0,301	
		broyés	0,45	4,27	0,039	*
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	0,20	0,27	0,603	
		broyés	0,30	0,27	0,603	

<b>B</b>		<b>Combinaisons</b>		<b>Fréquences</b>	$\chi^2$	<b>P</b>
<b>Plantes hôtes</b>	<b>Pucerons</b>		<b>observées</b>			
<i>Vicia faba</i>	<i>A. pisum</i>	indemnes	0,40	2,40	0,121	
		broyés	0,50	6,67	0,010	**
	<i>M. persicae</i>	indemnes	0,30	0,27	0,603	
		broyés	0,45	4,27	0,039	*
<i>Brassica napus</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	0,30	0,27	0,603	
		broyés	0,50	6,67	0,010	**
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	0,15	1,07	0,301	
		broyés	0,25	0,00	1,000	
<i>Sinapis alba</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	0,30	0,27	0,603	
		broyés	0,45	4,27	0,039	*
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	0,25	0,00	1,000	
		broyés	0,20	0,27	0,603	

Tableau 4 : Réponses d'*Adalia bipunctata* au stade adulte (A) et au deuxième stade larvaire (B) à divers stimuli olfactifs (n = 20 par traitement). Les fréquences observées sont comparées à la fréquence théorique correspondante (1 source d'odeurs et 3 voies témoins) en utilisant un test  $\chi^2$ .

Deux des trois espèces de proies, *A. pisum* et *M. persicae*, attirent significativement les coccinelles aux deux stades de développement lorsque les pucerons sont broyés, quelle que soit la plante hôte. Aucun effet informatif n'a été observé lorsque les homoptères indemnes sont utilisés comme source d'odeurs.

Les espèces végétales isolées ou en association avec des pucerons ont également été testées comme stimuli olfactifs. Lorsqu'un fragment de tige de *V. faba*, de *B. napus* ou de *S. alba* est utilisé comme source d'odeurs, aucune attraction significative n'est observée lors du comportement de recherche des coccinelles au stade larvaire ( $\chi^2 = 0,27$  et  $P = 0,603$ ,  $\chi^2 = 0,27$  et  $P = 0,603$ ,  $\chi^2 = 1,07$  et  $P = 0,301$ ) ni au stade adulte ( $\chi^2 = 0,27$  et  $P = 0,603$ ,  $\chi^2 = 1,07$  et  $P = 0,301$ ,  $\chi^2 = 2,40$  et  $P = 0,121$ ).

Des associations de segment de tige et de pucerons indemnes ont également été testées mais ne présentent aucun effet significatif en terme de médiateur chimique. *A. pisum* ou *M. persicae* sur *V. faba* ( $\chi^2 = 0,27$  et  $P = 0,603$ ,  $\chi^2 = 0,00$  et  $P = 1,000$ ), *M. persicae* ou *B. brassicae* sur *B. napus* ( $\chi^2 = 1,07$  et  $P = 0,301$  deux fois) et sur *S. alba* ( $\chi^2 = 1,07$  et  $P = 0,301$ ,  $\chi^2 = 0,27$  et  $P = 0,603$ ) n'attirent pas les larves prédatrices.

Les adultes d'*A. bipunctata* ne réagissent pas plus significativement aux molécules émises par les combinaisons d'espèces végétales et de pucerons indemnes. *A. pisum* ou *M. persicae* sur *V. faba* ( $\chi^2 = 1,07$  et  $P = 0,301$ ,  $\chi^2 = 0,27$  et  $P = 0,603$ ), *M. persicae* ou *B. brassicae* sur

*B. napus* ( $\chi^2 = 1,07$  et  $P = 0,301$ ,  $\chi^2 = 0,27$  et  $P = 0,603$ ) et sur *S. alba* ( $\chi^2 = 2,40$  et  $P = 0,121$ ,  $\chi^2 = 1,06$  et  $P = 0,301$ ).

L'observation des durées de résidence des coccinelles dans les quatre fractions de l'olfactomètre, correspondant aux quatre arrivées d'air et incluant la source d'odeurs testée, a permis de confirmer l'effet attractif des pucerons broyés, *A. pisum* et *M. persicae* quelle que soit la plante hôte, pour les larves et les adultes d'*A. bipunctata* (Tableaux 5A et B). Des associations de pucerons indemnes et de fractions de plantes, ou des organes végétaux seuls ont également été utilisés comme stimuli olfactifs. Lorsqu'un fragment de tige de *V. faba*, ou de *B. napus* ou de *S. alba* est utilisé comme source d'odeurs, aucune attraction significative n'est observée sur le temps de résidence des larves prédatrices dans le quadrant correspondant à la source de molécules volatiles ( $F = 0,23$  et  $P = 0,632$ ,  $F = 0,26$  et  $P = 0,578$ ,  $F = 0,29$  et  $P = 0,531$ ).

De même, les adultes de coccinelles ne sont pas attirés par les substances émises par les trois espèces végétales seules ( $F = 0,28$  et  $P = 0,404$ ,  $F = 1,87$  et  $P = 0,825$ ,  $F = 1,40$  et  $P = 0,321$  respectivement pour *V. faba*, *B. napus* et *S. alba*).

Des associations de segment de tige et de pucerons indemnes ont également été testées mais ne présentent aucun effet significatif sur la durée de résidence des coccinelles dans le quadrant correspondant à la source de médiateur chimique potentiel.

<b>A</b>	<b>Combinaisons</b>		<b>% durée dans source odeurs</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	
	<b>Plantes hôtes</b>	<b>Pucerons</b>				
<i>Vicia faba</i>	<i>A. pisum</i>	indemnes	30,1	0,40	0,527	
		broyés	54,5	8,73	0,004 **	
	<i>M. persicae</i>	indemnes	35,2	1,43	0,235	
		broyés	49,6	6,37	0,010 **	
<i>Brassica napus</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	35,0	0,70	0,406	
		broyés	64,7	16,37	0,001 ***	
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	15,1	1,04	0,310	
		broyés	19,9	0,28	0,596	
<i>Sinapis alba</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	34,1	1,04	0,311	
		broyés	47,6	5,30	0,024 *	
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	19,7	0,27	0,607	
		broyés	32,5	0,74	0,393	

<b>B</b>	<b>Combinaisons</b>		<b>% durée dans source odeurs</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	
	<b>Plantes hôtes</b>	<b>Pucerons</b>				
<i>Vicia faba</i>	<i>A. pisum</i>	indemnes	30,4	0,37	0,544	
		broyés	45,4	4,90	0,030 *	
	<i>M. persicae</i>	indemnes	27,9	0,15	0,704	
		broyés	43,2	4,75	0,032 *	
<i>Brassica napus</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	14,1	1,22	0,272	
		broyés	45,8	4,15	0,045 *	
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	13,3	1,45	0,232	
		broyés	17,9	0,37	0,544	
<i>Sinapis alba</i>	<i>M. persicae</i>	indemnes	29,7	0,25	0,617	
		broyés	46,1	4,27	0,039 *	
	<i>B. brassicae</i>	indemnes	19,1	0,30	0,588	
		broyés	28,6	0,38	0,538	

Tableau 5 : Durée relative (en %) de résidence d'*Adalia bipunctata* au stade adulte (A) et au deuxième stade larvaire (B) en réponse à divers stimuli olfactifs (20 minutes d'observation par insecte, n = 20 par traitement). Les durées relatives sont comparées par la méthode des contrastes en se référant au CMr des ANOVA après transformation de variable  $y = \arcsin\sqrt{x}$  (Dagnelie, 1973).

*A. pisum* ou *M. persicae* sur *V. faba* (F = 1,08 et P = 0,302 ; F = 1,43 et P = 0,289), *M. persicae* ou *B. brassicae* sur *B. napus* (F = 1,22 et P = 0,728 ; F = 1,45 et P = 0,768) et sur *S. alba* (F = 0,25 et P = 0,382 ; F = 0,30 et P = 0,412) n'attirent pas les larves prédatrices.

Les molécules émises par les combinaisons d'espèces végétales et de pucerons indemnes n'ont aucun effet significatif sur la durée de résidence des adultes d'*A. bipunctata* dans la chambre d'observation de l'olfactomètre. *A. pisum* ou *M. persicae* sur *V. faba* (F = 0,97 et P = 0,408, F = 1,27 et P = 0,309), *M. persicae* ou *B. brassicae* sur *B. napus* (F = 1,53 et P = 0,215, F = 1,04 et P = 0,311) et sur *S. alba* (F = 1,04 et P = 0,311, F = 0,21 et P = 0,644) n'induisent aucune différence significative de durée de résidence des adultes entre le quadrant correspondant à la source de substances volatiles testées et le reste de l'arène de l'olfactomètre.

La solution hexanique de trans- $\beta$ -farnésène ne contient que cette dernière molécule. Avant de débiter les tests olfactométriques avec la phéromone, un témoin « hexane » a été utilisé. Le comportement de recherche des coccinelles n'est pas affecté par l'hexane ( $0,27 < \chi^2 < 1,07$  et  $0,603 < P < 0,301$ ). Par contre, les larves et les adultes sont attirés par le (E)- $\beta$ -farnésène si la solution utilisée contient plus de 2  $\mu\text{g}$  de la molécule informative (respectivement  $\chi^2 = 6,67$  et P = 0,010,  $\chi^2 = 8,47$  et P < 0,006). La durée de résidence des coccinelles dans le champ d'odeurs relatif à la solution phéromonale est significativement supérieure par rapport au temps passé dans les autres quadrants de la

chambre de l'olfactomètre ( $F = 11,23$  et  $P < 0,001$ ,  $F = 9,89$  et  $P = 0,002$  respectivement pour les larves et les adultes).

### **Discussions**

La compréhension de l'écologie chimique des relations plantes – insectes est un facteur clé pour déterminer la manière dont l'insecte peut localiser les plantes hôtes ou les proies colonisant ces dernières si on s'intéresse aux auxiliaires entomophages. Si les substances sémiologiques émises par la plante peuvent expliquer l'orientation et la distribution des pucerons, elles jouent également un rôle de substances informatives pour les auxiliaires entomophages. Dans les premières étapes de recherche de leurs proies, les prédateurs localisent l'habitat de ces dernières en se basant sur certains reliquats déposés sur le support végétal (comme le miellat de pucerons) et sur des signaux chimiques directement émis par la plante (Tumlinson et al., 1992). Par exemple, les larves de premier stade du syrpe *E. balteatus* utilisent les molécules volatiles issues du miellat de pucerons comme stimulant de nutrition (Bargen et al., 1998). *Orius laevigatus* utilisent les odeurs émises par les plants de concombre infestés de thrips ou de tétranyques tisserands pour localiser les ravageurs afin de s'en alimenter (Venzon et al., 1999). La plante isolée n'est pas une source universelle de molécules informatives pour les auxiliaires entomophages. L'hyménoptère parasite *Diaeretella rapae* n'est pas attiré par des feuilles de Brassicaceae indemnes mais par l'association de pucerons *B. brassicae* et des feuilles de plantes hôtes (Reed et al., 1995).



Les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis de démontrer qu'il n'y a pas de réponse systématique du prédateur polyphage de pucerons face aux molécules émises par diverses proies. Tant que *M. persicae* et *A. pisum* élevés sur plusieurs espèces végétales sont utilisés broyés, les prédateurs répondent positivement aux stimuli émis. Si les pucerons sont utilisés indemnes, aucun effet informatif n'est observé. Des résultats similaires ont été obtenus par Du et al. (1996) qui ont constaté que le parasitoïde *Aphidius ervi* n'est pas attiré par le puceron *A. pisum* seul et indemne. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces observations. En broyant les pucerons, la libération de substances volatiles est accrue. La quantité de molécules émises est alors suffisante pour que les prédateurs perçoivent le stimulus chimique alors que les pucerons indemnes émettent trop peu de substances volatiles pour être localisés par la coccinelle. Dans ce cas, la colonie de pucerons indemnes doit être plus importante pour être localisée par les prédateurs. En utilisant une autre espèce aphidienne, Han et Chen (2002) ont démontré que *Toxoptera aurantii* attirent la coccinelle *C. septempunctata* lorsqu'au moins 2000 pucerons indemnes constituent la source d'odeurs reliée à une des quatre voies d'un olfactomètre. L'autre hypothèse consiste à penser que d'autres molécules sont émises par les pucerons lorsqu'ils sont broyés. Les analyses chimiques du chapitre suivant permettront d'identifier la présence d'autres substances volatiles, non émises par les proies indemnes et présentant un effet attractif potentiel.

Les coccinelles sont attirées par le (E)- $\beta$ -farnésène lorsque ce dernier a été utilisé pur comme stimulus olfactif. Un facteur dose dépendant a

cependant été observé. En effet, lorsque la quantité de (E)- $\beta$ -farnésène utilisée comme source d'odeurs est inférieure à 2 $\mu$ g, aucune attraction significative n'est observée chez les prédateurs Coccinellidae. L'absence de rôle informatif des pucerons *M. persicae* et *A. pisum* utilisés indemnes comme sources d'odeurs semble également être dû à la trop faible concentration de ce terpène tant que les pucerons ne sont pas broyés. De plus, le rôle kairomonal du (E)- $\beta$ -farnésène sur les auxiliaires est loin d'être systématique. Si l'espèce prédatrice étudiée est attirée par cette molécule, *Chrysopa cognata*, également prédateur de pucerons ne réagit pas au stimulus olfactif (E)- $\beta$ -farnésène (Boo et al., 1998). Par contre, des tests de vols en tunnel ont permis de mettre en évidence l'effet attractif du (E)- $\beta$ -farnésène sur l'auxiliaire *A. ervi* (Du et al., 1998). Chez les prédateurs polyphages Carabidae, le terpène émis par le puceron *Sitobion avenae* augmente l'activité de recherche (Kirkland et al., 1998). Deux espèces de carabes sont principalement sensibles au (E)- $\beta$ -farnésène: *Pterostichus melanarius* et *Harpalus rufipes* (Kielty et al., 1996).

L'autre espèce aphidienne que nous avons testée, *B. brassicae*, n'induit aucune attraction des coccinelles. *B. brassicae* (indemnes ou broyés) seuls ou associés à la plante hôte, n'attirent ni les larves ni les adultes d'*A. bipunctata*. Dans ce cas, deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'effet attractif. Les substances émises par la plante et / ou le puceron spécialiste de Brassicaceae peuvent modifier l'effet kairomonal observé vis-à-vis de la coccinelle prédatrice avec les deux premières espèces phytophages, *M. persicae* et *A. pisum*. L'émission d'isothiocyanates par *B. brassicae* pourrait

informer le prédateur du caractère inapproprié de la proie que représente cette espèce de puceron. A titre d'exemple, les isothiocyanates volatils émis par les crucifères, stimulent les récepteurs olfactifs des insectes phytophages généralistes comme *Aphis fabae*. Les pentényle- et butyle- ITC sont répulsifs pour cette espèce aphidienne (Isaacs et al., 1993). Si ces substances volatiles ont un effet informatif répulsif sur les pucerons polyphages, elles peuvent également repousser les prédateurs généralistes tel qu'*A. bipunctata*. Afin de confirmer la présence des substances volatiles d'origine végétale chez la proie *B. brassicae*, l'analyse des molécules émises par les différentes combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes, chacune isolée ou associée, sera envisagée au chapitre suivant.

L'autre hypothèse consiste à penser que les molécules volatiles émises par *B. brassicae* indemne ou lorsqu'il est broyé ne présentent aucun effet informatif. Dans ce cas, le puceron ne produit pas d'allomones mais développe uniquement un système de défense identique à celui des plantes hôtes de Brassicaceae qui font face aux infestations des insectes phytophages généralistes. Quand le puceron *B. brassicae* subit des dommages lors des attaques de prédateurs, le système glucosinolate-myrosinase est activé et la production d'isothiocyanates constitue un moyen de défense chimique, toxique pour le prédateur qui attaque ce puceron. Si l'espèce aphidienne n'utilise pas les substances secondaires de la plante comme médiateurs chimiques, elles sont à l'origine de la toxicité du puceron et permettent à *B. brassicae* de faire face à la coccinelle aphidiphage. Les études consacrées aux analyses chimiques et à l'observation des paramètres

biologiques d'*A. bipunctata* nourrie avec le puceron spécialiste des Brassicaceae permettront d'établir le rôle des substances secondaires végétales dans le mécanisme de défense de la proie aphidienne

### **Conclusions**

Même si *A. bipunctata* est une espèce prédatrice polyphage, elle n'est pas attirée de la même manière par toutes les combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes qui ont été testées comme stimuli olfactifs. Les larves et les adultes du prédateur ne sont attirés que par *A. pisum* et *M. persicae* lorsqu'ils sont broyés, quelle que soit la plante hôte. Le (E)- $\beta$ -farnésène, phéromone d'alarme de pucerons, attire également les coccinelles. Par contre, les segments de plantes isolées (*V. faba*, *B. napus* et *S. alba*) ou en association avec les pucerons indemnes (les trois espèces) ne présentent aucun effet informatif pour le prédateur. Le puceron spécialiste *B. brassicae* est la seule proie à ne pas attirer les larves et les adultes d'*A. bipunctata*. La présence de substances allélochimiques produites par la plante hôte ou par la proie semble être impliquée dans cette absence d'attractivité pour la coccinelle aphidiphage.

## **Chapitre 7**

### **Etude des caractéristiques chimiques et des molécules émises par des proies élevées sur diverses plantes hôtes**

#### ***Introduction***

Suite à l'étude du comportement de la coccinelle prédatrice, certaines combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes ne présentent aucun effet informatif pour le prédateur. Si les espèces de Brassicaceae émettent des molécules volatiles qui peuvent jouer un rôle de médiateurs chimiques en tant qu'allomones ou de kairomones dans les relations plantes – insectes (Lamb, 1989), certaines molécules émises par les pucerons peuvent également jouer un rôle informatif pour le troisième niveau trophique. Dans le chapitre précédent, seuls des échantillons broyés de pucerons *M. persicae* et *A. pisum*, quelle que soit la plante hôte aphidienne, ont modifié significativement le comportement des larves et des adultes de la coccinelle à deux points. En effet lorsque ces espèces de pucerons étaient employées indemnes, en association avec une partie de plante hôte ou lorsque la plante était utilisée comme seule source d'odeurs, aucune réponse comportementale significative n'a été observée chez *A. bipunctata*. Une molécule volatile, le (E)- $\beta$ -farnésène, présente un effet attractif vis-à-vis de la coccinelle prédatrice. La présence de cette molécule en quantité suffisante dans le bouquet de substances volatiles émises par les pucerons peut être le facteur limitant de l'effet kairomonal pour le prédateur. Soit les insectes indemnes ne libèrent pas suffisamment de médiateurs chimiques, soit ils produisent d'autres molécules qui interviennent dans la communication chimique. Cette seconde hypothèse peut être également évoquée lorsque le puceron

*B. brassicae* a été utilisé comme source potentielle de molécules volatiles. Aucune attraction n'a été déterminée vis-à-vis des larves et des adultes prédateurs suite à des modifications de la quantité et de la composition des molécules émises par cette espèce aphidienne. L'absence d'effet informatif de *B. brassicae* utilisé comme source d'odeurs pourrait être lié à la présence d'autres molécules ou à l'absence de (E)- $\beta$ -farnésène. Il est utile de s'interroger sur la nature des substances émises par les diverses combinaisons d'espèces de plantes et d'insectes afin de déterminer quelles sont les substances actives.

Les espèces de Brassicaceae qui ont été utilisées ont été sélectionnées pour leur profil en glucosinolates : la sinalbine est majoritairement présente (avec environ six fois plus de GLS totaux que dans le colza) chez *Sinapis alba* L. alors que les variétés de colza cultivées présentent plusieurs glucosinolates en faibles quantités. Les analyses qui ont été réalisées permettront de déterminer précisément la composition des substances secondaires présentes dans les pucerons et les plantes étudiées.

## **Matériel et Méthodes**

### **Description et préparation du matériel biologique**

La fève de marais (*V. faba*), la moutarde blanche (*S. alba*) et le colza (*B. napus*) ont été cultivés comme décrit dans la partie matériel et méthodes du chapitre précédent. Les méthodes d'élevage des pucerons *A. pisum* et *M. persicae* et *B. brassicae* ont également été décrites au chapitre 6.

### **Analyses des glucosinolates par chromatographie liquide (HPLC)**

Les glucosinolates ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC L-6200 et détecteur UV L-4000, Merck-Hitachi) suivant la méthode ISO 9167-1 légèrement modifiée. Les échantillons végétaux, d'insectes et de miellat de pucerons ont été pesés et broyés dans une solution bouillante de méthanol et d'eau (70 : 30 v/v). La désulfatation enzymatique des glucosinolates a été réalisée sur une colonne DEAE (Sephadex A-25) en utilisant une sulfatase commerciale purifiée à partir d'*Helix pomatia* (Sigma). Les désulfo-glucosinolates ont ensuite été analysés par HPLC.

Le miellat de *M. persicae* a été collecté en plaçant des plaques en verre de 20 cm x 20 cm sous le feuillage des plantes hôtes des pucerons. Après 48 heures, les plaques sont retirées et rincées avec 10 ml d'eau distillée. Pour évaluer la présence de glucosinolates dans la solution aqueuse de miellat, les échantillons ont été analysés par HPLC comme précédemment décrit. La sinigrine a été utilisée comme étalon interne lorsque *B. napus* et *S. alba* ont été analysées ou lorsque ces deux dernières ont été les plantes hôtes de pucerons. Chaque identification a été réalisée en triplicat.

### **Analyse des produits volatils par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

La moutarde blanche contient une grande quantité d'un glucosinolate majoritaire (la sinalbine) alors que la variété double zéro « Alaska » de colza qui a été utilisée présente un mélange de glucosinolates en

faibles concentrations. *S. alba* a été considérée comme modèle en sachant que le contenu trop faible en glucosinolates du colza ne permet pas de détecter les substances volatiles émises par les pucerons élevés sur cette espèce végétale. C'est la raison pour laquelle seuls les produits d'hydrolyse des glucosinolates émis par les pucerons élevés sur la moutarde blanche ont été analysés.

Les métabolites volatils de glucosinolates émis par les espèces aphidiennes (échantillons de 250 mg de pucerons en poids frais) ont d'abord été analysés en utilisant une unité de « Purge and Trap » (P&T Hewlett Packard) connectée à un système de GC-MS Hewlett Packard (constitué d'un spectromètre de masse HP5972 couplé à un chromatographe en phase gazeuse HP5890 séries II). Les échantillons broyés ont été maintenus pendant 1h à  $30 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  dans des tubes en verre thermostatés et adaptés à la méthode de « Purge and Trap ». Les molécules volatiles émises par les broyats ont été purgées avec de l'He au débit de  $4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 11 min, les substances volatiles sont ensuite concentrées à température ambiante sur un piège de type Vocarb 3000<sup>®</sup> et finalement désorbées par une augmentation de température rapide à  $250^{\circ}\text{C}$ . Les molécules d'intérêt sont automatiquement transférées au GC-MS à travers un injecteur de type split-splitless à  $250^{\circ}\text{C}$  (en mode splitless). Les molécules à identifier sont séparées sur une colonne HP5-MS (5% phényl-diméthylpolysiloxane, 30m x 0.25mm, df = 1 $\mu\text{m}$ ). L'évolution de la température a été programmée comme suit :  $40^{\circ}\text{C}$  (pendant 1 min) jusqu'à  $180^{\circ}\text{C}$  à raison de  $6^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  et ensuite jusqu'à  $280^{\circ}\text{C}$  à la vitesse de  $15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les spectres de masse ont été enregistrés en



mode EI à 70eV (gamme de masse de 30 à 300 amu). Les molécules ont été identifiées sur base de leur temps de rétention et par interprétation des résultats des fragmentations de spectres de masses. Les spectres enregistrés sont finalement comparés à ceux de la bibliothèque spectrale Wiley<sup>275</sup>.L.

Les produits de dégradation non-volatils des GLS issus des deux espèces de pucerons (échantillons de 250 mg en poids frais) élevées sur *S. alba* ont aussi été extraits avec 500 µl d'ether diéthylique pur pendant 12h. Les solutions d'extraction ont ensuite été injectées telles quelles dans l'injecteur de type splitless sous les mêmes conditions de GCMS que celles précitées dans le paragraphe précédent. La quantification des molécules identifiées a été réalisée par GLC dans les conditions analytiques identiques en utilisant un appareil Hewlett Packard (HP6890) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme maintenu à 250°C. Deux cents µl d'une solution éthanolique à 1mg/ml de phénéthyle-ITC ont été utilisés comme étalon interne. Le facteur de réponse a été fixé à 1.

## **Résultats**

### **Analyse des glucosinolates par chromatographie liquide (HPLC)**

Les analyses des glucosinolates qui ont été identifiés dans les échantillons de pucerons et de feuilles de plantes hôtes sont présentées dans les Tableaux 6 et 7. Aucun glucosinolate n'a été détecté dans les pucerons élevés sur *V. faba* ni dans cette plante hôte. De faibles quantités de glucobrassicine ( $\leq 0,10 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de poids frais), de

progoitrine ( $< 0,01 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de poids frais) ont été détectées dans les échantillons des deux espèces de puceron élevées sur le colza contenant peu de glucosinolates. Des teneurs plus importantes (jusqu'à 30 fois plus) de sinalbine ont été détectées dans les pucerons qui ont été récoltés sur *S. alba*. Des différences importantes de quantités de glucosinolates ont été observées en fonction de l'espèce aphidienne considérée. Les teneurs les plus élevées, 17 et 123 fois supérieures, en GLS ont été retrouvées dans *B. brassicae* par rapport à *M. persicae* respectivement élevés sur le colza et la moutarde blanche. Des analyses complémentaires du miellat produit par cette dernière espèce de puceron élevée sur les taxa végétaux de la famille des Brassicaceae ont révélé la présence de traces de sinalbine dans les échantillons collectés à partir des insectes élevés sur *S. alba* (Tableau 7). La production de miellat de l'autre espèce aphidienne, *B. brassicae*, est si faible qu'aucun liquide ne peut être collecté et aucune analyse n'a pu être envisagée.

Tableau 6 : Liste des glucosinolates identifiés dans les échantillons de plantes hôtes et de pucerons

<i>Noms communs</i>	<i>Chaîne latérale des glucosinolates</i>
Sinigrine	Allyle -
Sinalbine	p-hydroxybenzyle-
4OH-glucobrassicine	4-OH-3-indolylmethyl-
Progoitrine	2-OH-3-butenyle-
Glucobrassicinapine	4-pentenyle-
Gluconasturtine	2-phenylethyle-
Glucoraphanine	4-methylsulphinylbutyle-
Glucobrassicine	3-indolylmethyl-

Tableau 7 : Teneurs en glucosinolates des espèces végétales et des pucerons en fonction de leurs plantes hôtes (en  $\mu\text{mol} / \text{g}$  de poids frais).

Glucosinolates	Plante hôte	<i>Myzus persicae</i>		<i>Brevicoryne brassicae</i>
		Feuilles	Pucerons	Miellat <sup>(2)</sup>
<i>Vicia faba</i>	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	- <sup>(1)</sup>
<b><i>Brassica napus</i></b>				
Glucobrassicine	0.16 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
Gluconasturtine	0.49 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	2.80 $\pm$ 0.77
4OH-glucobrassicine	< 0.01	< 0.01	ND	ND
Progoitrine	0.57 $\pm$ 0.00	< 0.01	ND	< 0.01
Glucoraphanine	0.37 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.12	2.91 $\pm$ 1.07
<b>Total</b>	<b>1.59 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>0.47 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>0.34 <math>\pm</math> 0.09</b>	<b>5.81 <math>\pm</math> 1.13</b>
<b><i>Sinapis alba</i></b>				
Sinalbine	8.83 $\pm$ 0.15	0.72 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.29	180.96 $\pm$ 15.83
Gluconasturtine	1.82 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.04	ND
4OH-glucobrassicine	< 0.01	ND	ND	1.92 $\pm$ 0.37
Brassicinapine	< 0.01	ND	ND	< 0.01
Progoitrine	0.28 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.11	0.03 $\pm$ 0.00	3.28 $\pm$ 0.16
<b>Total</b>	<b>10.93 <math>\pm</math> 0.13</b>	<b>1.65 <math>\pm</math> 0.09</b>	<b>1.50 <math>\pm</math> 0.43</b>	<b>185.16 <math>\pm</math> 14.36</b>

<sup>(1)</sup> Les analyses de *B. brassicae* élevé sur *V. faba* n'ont pas été envisagées car ce puceron ne survit pas sur cette espèce végétale.

<sup>(2)</sup> Les quantités de GLS présentes dans le miellat de *M. persicae* (en  $\mu\text{mol}$ ) ont été déterminées à partir d'une solution de rinçage (10ml d'eau distillée) de plaques de verre placées sous le feuillage des plantes hôtes colonisées de pucerons.

Les glucosinolates non détectés sont notés ND.

### Analyse des produits volatiles par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les chromatogrames GC-MS des molécules volatiles émises par le puceron *M. persicae* sont présentés à la Figure 9. Une seule molécule a été identifiée quelle que soit la plante hôte considérée (*V. faba*, *B. napus* et *S. alba*) : le (E)- $\beta$ -farnésène, une phéromone d'alarme bien connue chez les pucerons (Pickett *et al.*, 1992). Aucun produit de

dégradation des glucosinolates n'a été détecté lors des analyses des divers échantillons de *M. persicae* (Figure 9A). Les analyses par la méthode du « Purge and Trap » du puceron *B. brassicae* collecté sur *S. alba* (qui contient la sinalbine) ne révèlent la présence d'aucun isothiocyanate. L'absence de pic sur les chromatogrames obtenus par cette méthode a été attribuée à la trop faible volatilité des molécules à mettre en évidence, notamment le 4-hydroxy-benzyle-ITC. L'extraction à l'éther diéthylique des échantillons de *B. brassicae* élevé sur *S. alba* a été entreprise et les chromatogrames relatifs à ces derniers présentent deux pics correspondant au benzyle-ITC et au benzyle-nitrile (Figure 9B). La présence du benzyle-ITC est surprenante. En effet, cette molécule est le produit de dégradation caractéristique de la glucotropaeoline (benzyle-glucosinolate). Des analyses complémentaires ont été réalisées afin de valider les résultats précédents. Pour ce faire, une solution tamponnée d'une thioglucosidase commerciale (purifiée à partir de plantes de *S. alba*) a été ajoutée à une solution aqueuse de sinalbine (2 mg/ml). Le 4-hydroxy-benzyle-ITC a été identifié par GC-MS. Ce résultat indique que la métabolisation de la sinalbine chez *B. brassicae* est plus complexe qu'attendu. Nous supposons que la perte d'un hydroxyle- est due à une activité enzymatique particulière chez l'insecte plutôt qu'à la méthode analytique qui a été utilisée. Cette observation nécessite de plus amples investigations (voir chapitre 11 relatif à la purification d'une myrosinase du puceron *B. brassicae*).

L'évaluation quantitative du benzyle - ITC produit à partir du puceron spécialiste a été réalisée et a révélé la production d'un ratio constant entre la quantité d'ITC et celle du nitrile associé ( $5.59 \pm 0.37$ ;

benzyle-ITC / benzonitrile) pour les trois répétitions qui ont été effectuées. Le benzyle-ITC qui a été produit à partir des échantillons de *B. brassicae* élevé sur *S. alba* représente  $3.0 \pm 0.2$   $\mu\text{mol}$  par gramme de poids frais (n = 4 répétitions).

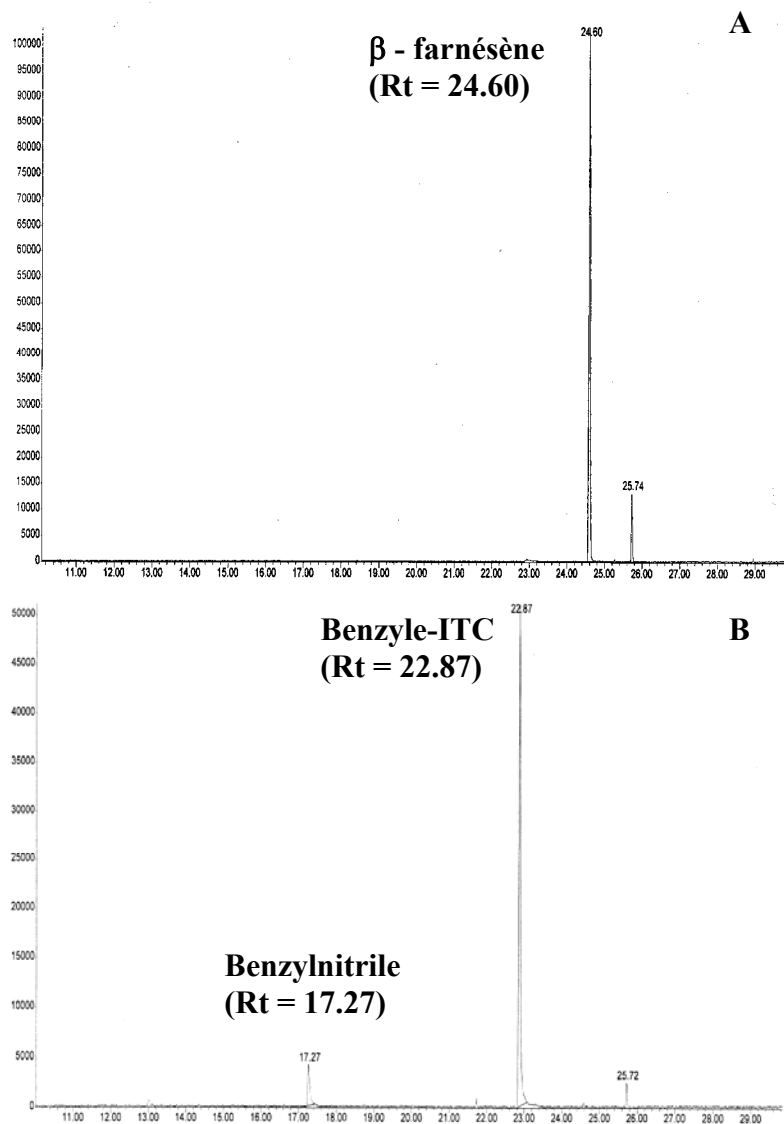


Figure 9 : Chromatogrammes en GC-MS des substances volatiles émises par les extraits de *Myzus persicae* (A) quelle que soit la plante hôte et *Brevicoryne brassicae* élevé sur *Sinapis alba* (B).

## ***Discussions et conclusions***

La composition chimique des plantes, et plus particulièrement celle des substances secondaires, joue un rôle important, en association avec les signaux visuels, dans la localisation de la plante hôte par les insectes phytophages (Prokopy et Owens, 1983). Depuis plus de 40 ans (Fraenkel, 1959), divers auteurs ont suggéré que les métabolites secondaires de plantes sont directement impliqués dans la recherche de nourriture des insectes. Les glucosinolates présentent des propriétés biologiques envers les insectes phytophages inféodés aux plantes de Brassicaceae comme stimulants de ponte ou d'alimentation (Hicks, 1974; Reed *et al.*, 1989; Traynier et Truscott, 1991) mais sont généralement répulsifs pour les ravageurs polyphages (Blau *et al.*, 1978, Erickson et Feeny, 1974). Les concentrations en glucosinolates déterminées dans les feuilles de moutarde sont nettement supérieures à celles qui ont été détectées dans les organes foliaires du colza (environ 6 fois plus). Ces résultats sont en concordance avec ceux de Hopkins *et al.* (1998). La quantité totale de GLS dans les feuilles de moutarde variait de 50 à 70  $\mu\text{mol/g}$  de poids sec, ce qui correspond aux concentrations de 10 à 15  $\mu\text{mol/g}$  de GLS lorsque ces dernières sont exprimées en poids frais. Alors que 12,5  $\mu\text{mol/g}$  (en poids sec) de GLS ont été détectées dans les feuilles de colza, variété "00", plus de 60  $\mu\text{mol/g}$  étaient présents dans les organes aériens des variétés de colza à forte teneur en GLS (Weber *et al.*, 1986). Des concentrations identiques de GLS ont été déterminées lors de nos analyses (en tenant compte que les teneurs en substances secondaires ont été exprimées par rapport au poids frais). Les variations des teneurs en GLS dans les espèces cultivées ont été testées afin d'obtenir des variétés résistantes

aux ravageurs phytophages. *Sinapis alba*, qui contient des quantités élevées de sinalbine, est moins sensible aux attaques des ravageurs par rapport au colza *B. napus* qui possède de faibles concentrations en GLS. Le puceron spécialiste, *B. brassicae*, est principalement localisé sur les jeunes organes végétaux qui contiennent les teneurs en GLS les plus élevées. *M. persicae*, insecte généraliste, est lui majoritairement observé sur les organes les plus âgés (Hopkins *et al.*, 1998). Selon ces auteurs, la distribution de ces espèces de pucerons est directement liée à la concentration des GLS dans la plante.

Des variations de teneurs en glucosinolates intacts ont également été enregistrées dans les échantillons de *M. persicae* inféodé à la moutarde et au colza qui ont été sélectionnés. Des quantités nettement supérieures de GLS ont été observées chez *B. brassicae* élevé sur le colza et surtout sur la moutarde blanche (respectivement 12 et 115 fois plus de GLS que dans *M. persicae* élevé sur *B. napus* et *S. alba*). Weber *et al.* (1986) ont détecté de plus faibles teneurs en GLS, de l'ordre de 60  $\mu\text{mol/g}$  (les teneurs étant exprimées en poids frais), dans *B. brassicae*. Ce dernier avait été élevé sur des variétés de colza présentant des contenus importants en GLS cependant inférieurs à ceux de *S. alba*.

Lors de nos analyses, des GLS ont été détectés dans le miellat de *M. persicae* élevé sur les deux espèces de plantes hôtes appartenant à la famille des Brassicaceae. Weber *et al.* (1986) avait détecté de 3,6 à 28,7  $\mu\text{mol/g}$  (en poids sec) de GLS dans le puceron vert du pêcher en fonction de la variété de colza qui a été utilisée comme plante hôte

(contenant de faibles ou d'importantes teneurs en GLS). La présence de GLS dans le miellat ne peut cependant être considérée comme responsable d'un effet informatif à longue distance puisque ces molécules ne sont pas volatiles.

L'impact des substances secondaires d'origine végétale n'est pas limité au second niveau trophique. Les interactions sont observées lorsque les insectes entomophages utilisent des synomones émis par les plantes comme signaux chimiques lors de la localisation des proies (Dicke, 2000). Les substances volatiles utilisées par les ennemis naturels peuvent provenir de la plante hôte, de l'hôte lui-même, d'autres organismes associés à l'hôte ou des molécules émises résultant des interactions entre l'hôte et la plante aux dépens de laquelle ce dernier s'alimente (Lewis et Martin, 1990). L'étude de l'émission de substances volatiles de la plante sous l'action d'attaques d'insectes phytophages a démontré le rôle de ces molécules dans plusieurs systèmes tritrophiques en tant que signaux chimiques efficaces pour les prédateurs et les parasitoïdes entomophages afin de localiser respectivement les proies et les hôtes (Dicke *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1990). Des exuvies ou du miellat de pucerons, même en l'absence des insectes eux-mêmes, induisent des changements dans le comportement d'oviposition des coccinelles aphidiphages (Carter et Dixon, 1984).

Des essais utilisant le parasitoïde de *B. brassicae*, *Diaeretiella rapae* ont démontré le rôle de molécules volatiles émises par les pucerons en tant que kairomones. En effet, les insectes aphidiphages répondent aux



odeurs émises par les feuilles de choux colonisées par des pucerons ou provenant uniquement des homoptères mais *D. rapae* reste insensible aux substances émises par des plantes saines, indemnes de pucerons. Ces expérimentations suggèrent que ces auxiliaires entomophages présentent une préférence innée pour les pucerons inféodés aux crucifères (Reed *et al.*, 1995).

Si les ennemis naturels des ravageurs de Brassicaceae utilisent des substances informatives pour leur propre bénéfice, les prédateurs généralistes comme *A. bipunctata* pourraient percevoir les ITC produits par *B. brassicae* comme étant des allomones pour éviter de consommer ces espèces phytophages inadéquates. L'analyse par « Purge & Trap » de *B. brassicae* élevé sur *S. alba* n'a révélé aucune trace d'isothiocyanate, ce dernier, le benzyle-ITC étant trop peu volatil. Cette observation nous permet de conclure que les molécules produites par le puceron *B. brassicae* indemne ou lorsqu'il est broyé ne présentent aucun effet informatif. Le puceron ne produit pas d'allomones mais développe un système de défense glucosinolate-myrosinase qui conduit à la production d'isothiocyanates, toxiques pour le prédateur qui attaque ce puceron. En effet, les extractions à l'éther diéthylique des molécules produites par le broyat de *B. brassicae* élevé sur *S. alba* ont permis de révéler la présence d'importantes quantités de benzyle-ITC peu volatil. Ce produit de dégradation typique de la glucotropaéoline, a démontré des effets toxiques envers plusieurs espèces d'insectes (Bartlet et Mikolajczak, 1989). La présence de cette molécule est assez surprenante; le 4-hydroxy-benzyle-ITC devait normalement être produit. La perte de

l'hydroxyle semble due à l'extrait enzymatique de *B. brassicae* mais a nécessité une étude biochimique plus approfondie (voir chapitre 11).

Aucun ITC ou nitrile n'a été identifié lors de l'analyse des émissions de volatils à partir de *M. persicae* élevé sur les différentes espèces végétales de la famille des Brassicaceae. L'identification par GC-MS du (E)- $\beta$ -farnésène, permet de conclure à l'effet attractif de cette phéromone d'alarme de pucerons. Des analyses d'échantillons de *M. persicae* indemnes ont révélé la présence de très faibles quantités (à l'état de traces) de (E)- $\beta$ -farnésène. L'émission insuffisante de cette molécule par les échantillons de pucerons indemnes constitue la raison de l'absence d'attraction de ces aphides vis-à-vis de la coccinelle prédatrice lorsqu'ils ont été utilisés comme source d'odeurs dans les expérimentations du chapitre précédent. La relation entre l'absence de (E)- $\beta$ -farnésène dans le bouquet de substances volatiles émises par *B. brassicae* et l'absence d'effet informatif de ce puceron indemne ou broyé confirment le rôle attractif du (E)- $\beta$ -farnésène vis-à-vis d'*A. bipunctata*.

Lorsque le puceron cendré du chou et un autre taxa aphidien (par exemple *M. persicae* et *B. brassicae* ou ce dernier et *A. pisum*) sont donnés à la coccinelle *A. bipunctata*, seules les proies appartenant à l'espèce spécialiste des plantes de Brassicaceae sont encore indemnes après 24 heures. Si aucune kairomone n'est produite par *B. brassicae*, les produits de dégradation des GLS peuvent engendrer un rejet de la proie, directement lié au caractère inadéquat de la nourriture représentée par l'espèce aphidienne (Hodek et Honek, 1996). L'effet

de diverses combinaisons de plantes hôtes et de pucerons, y compris *B. brassicae* élevé sur des espèces de crucifères, sur la viabilité des larves de la coccinelle à deux points sera abordé au chapitre suivant.

### **Conclusion**

Lors de l'étude de la localisation de la proie (chapitre 6), des différences significatives de comportement du prédateur ont été observées en fonction de l'espèce aphidienne. Les analyses chimiques des espèces de pucerons élevées sur les diverses plantes hôtes a permis de démontrer la présence isolée du (E)- $\beta$ -farnésène en tant que molécule volatile des échantillons de pucerons qui présentent un effet attractif pour le prédateur aphidiphage. Lorsqu'aucune attraction significative n'a été observée, d'autres substances telles que les isothiocyanates sont émises par les pucerons, seuls ou en association avec la plante hôte. Les substances sémiochimiques peuvent agir directement mais aussi par le biais des proies des auxiliaires entomophages. La localisation des pucerons par les prédateurs polyphages varie en fonction du bouquet de volatils émis par les ravageurs phytophages.

## **Chapitre 8**

### **Etude des paramètres biologiques en fonction de la plante hôte**

#### ***Introduction***

Une variation des teneurs et une diversité des molécules secondaires ont été observées chez les pucerons en fonction de la plante hôte (Chapitre 7). Les caractères adéquats et appropriés des plantes hôtes vis-à-vis des pucerons peuvent ne pas nécessairement correspondre aux besoins des prédateurs aphidiphages. La détermination de ces interactions entre niveaux trophiques constitue donc un intérêt théorique mais également pratique.

Les prédateurs Coccinellidae sont polyphages vis-à-vis d'une grande diversité d'espèces aphidiennes (Hodek, 1967) et semblent capable de détecter et d'éviter certaines proies présentant une très forte toxicité (voir chapitre 6). Cependant, des travaux antérieurs ont indiqué qu'un nombre réduit d'espèces de pucerons constituait une nourriture adéquate pour les coccinelles prédatrices (Blackman 1967b, Hodek et Honek 1996, Hauge et al. 1998). L'influence de la plante hôte sur l'efficacité de prédation des insectes entomophages en tant qu'agents de contrôle biologique a été très peu étudiée, même si la présence de substances allélochimiques chez la plante semble influencer certains paramètres de développement des insectes entomophages (Hodek 1956, Malcolm 1992, Hauge et al. 1998). L'objectif de ce chapitre est d'évaluer et de préciser les effets de diverses combinaisons d'espèces aphidiennes et de plantes hôtes sur certains paramètres biologiques de la coccinelle prédatrice. L'impact de ces substances allélochimiques

sera investigué indirectement, par le biais de la proie qui sera consommée par le prédateur. La durée de développement, la mortalité, la fécondité et la viabilité des oeufs de l'espèce aphidiphage seront évalués et permettront d'estimer les valeurs adaptatives (« fitness ») en fonction de la plante hôte du puceron. Afin d'optimiser les stratégies de lutte biologique et de raisonner le contrôle des pucerons par des prédateurs sur plusieurs générations d'auxiliaires, le caractère héréditaire et l'influence du sexe (tel qu'un effet maternel potentiel) lié à la qualité de la proie seront étudiés. En effet, la nourriture des prédateurs adultes peut influencer le développement et la reproduction de leur progéniture de manière plus ou moins persistante.

## **Matériel et Méthodes**

### **Description du matériel biologique et des techniques d'élevage**

Les fèves de marais (*V. faba*), la moutarde blanche (*S. alba*) et le colza (*B. napus*) ont été cultivés dans des conditions identiques à celles décrites au chapitre 6. L'élevage de la coccinelle *A. bipunctata* et des pucerons *M. persicae*, *B. brassicae* et *A. pisum* est également décrit au chapitre 6. Le puceron *Aphis fabae* Scopoli est élevé sur des plantes de *V. faba* dans les mêmes conditions que les autres espèces aphidiennes maintenues sur cette espèce végétale. Les pucerons sont maintenus au moins deux semaines sur leur plante hôte avant d'être utilisés comme proie pour *A. bipunctata*.

Un élevage de masse d'*A. bipunctata* est maintenu dans le laboratoire (voir matériel et méthodes du chapitre 6). Le puceron utilisé pour

nourrir *A. bipunctata* est *A. pisum* car celui-ci présente une valeur nutritive optimale pour la coccinelle (Hodek et Honek, 1996).

### Taux d'accroissement des pucerons

Les plantes hôtes ont été inoculées avec 10 adultes aptères et ont été observées toutes les 24 heures pendant une semaine. L'évolution du nombre de pucerons a été observée sur dix répétitions pour chaque espèce végétale utilisée.

### Paramètres de développement des coccinelles

Cinq combinaisons d'espèces de plante hôte et de proie ont été utilisées pour nourrir les coccinelles (Tableau 8).

Tableau 8 : Combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes utilisées comme proies d'*Adalia bipunctata*.

Espèces de puceron	Plantes hôtes	Glucosinolates	Isothiocyanates
<i>M. persicae</i>	<i>V. faba</i>	-	-
	<i>B. napus</i>	+	-
	<i>S. alba</i>	+++	-
<i>B. brassicae</i>	<i>B. napus</i>	+	+
	<i>S. alba</i>	+++	+++

Les caractéristiques chimiques en substances secondaires des proies en fonction des plantes hôtes sont qualitativement représentées par l'absence (-), la présence de faibles (+) et d'importantes (+++) teneurs en molécules secondaires (suivant les analyses du chapitre 7).

Le puceron spécialiste de Brassicaceae est incapable de survivre sur la fève. Pour chaque combinaison d'espèces de puceron et de plante hôte, deux fois trente larves d'*A. bipunctata* fraîchement écloses

(12 heures) sont isolées individuellement dans des boîtes de Pétri de 5cm de diamètre pour éviter le cannibalisme. Les pucerons sont récoltés sur la plante hôte déterminée et donnés comme nourriture aux larves *ad libitum*. Dès l'éclosion, les larves sont placées à une température de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  et une photopériode de 16 heures de lumière par jour. Chaque individu est observé toutes les 24 heures pour déterminer la mortalité et l'apparition de nymphes. Le temps nécessaire pour chaque changement de stade de développement est pris en compte. Le poids à l'émergence des adultes et le sexe-ratio sont également déterminés.

#### **Estimation de la fécondité et de la viabilité des œufs de coccinelles**

Après émergence, les prédateurs survivants nourris avec chacune des combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes sont sexés et les couples ( $n = 10$ ) de coccinelles nourries avec des proies identiques sont constitués afin d'observer pendant 21 jours la fécondité d'*A. bipunctata* et la viabilité des œufs correspondant aux cinq combinaisons d'espèces de plantes hôtes et de pucerons. Les pontes sont placées dans un incubateur à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  individuellement dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre. Le nombre de pontes, le nombre d'œufs et la viabilité des œufs sont observés tous les jours.

#### **Détermination des valeurs adaptatives des coccinelles**

Pour comparer la qualité des plantes hôtes des proies des coccinelles, la valeur adaptative aussi appelée valeur de fitness correspondant à chaque combinaison d'espèce de puceron et de plante hôte a été

calculée comme une mesure des performances biologiques intégrant la durée de développement (D) et la fécondité potentielle (V) couplant les valeurs de fécondité et l'émergence des larves issues de ces pontes via l'équation :  $r = (\ln V) / D$ , où ln représente le logarithme naturel (McGraw et Caswell, 1996). Cette formule a été sélectionnée pour le calcul de valeurs adaptatives par analogie par rapport à d'autres études de qualité de proies d'autres espèces de prédateurs aphidiphages tels que les syrphes *E. balteatus* et *Syrphus ribesii* (Sadeghi et Gilbert, 2000).

### **Etude de l'effet environnemental de la proie des coccinelles**

Suite aux expérimentations précédentes, l'influence d'une consommation momentanée d'une proie alternative (qui induit de fortes mortalités, allonge les durées de développement et inhibe la reproduction), telle que *B. brassicae* élevé sur *B. napus*, a été observée en utilisant des prédateurs adultes qui ont été nourris avec une proie optimale, c'est à dire *A. pisum* élevé sur fève, durant le développement larvaire. Le choix de la proie inadéquate est basé sur les résultats obtenus dans les manipulations précédentes : des effets négatifs de *B. brassicae* élevé sur *B. napus* ont été observés sur le développement et la reproduction des coccinelles qui les consomment sans toutefois provoquer une mortalité trop élevée, de l'ordre de 25% supérieure à celle du témoin. Vingt adultes ont été placés par couple (n = 10) dans des boîtes plastique aérées de 11 x 14 x 4 cm et ont été nourris de *B. brassicae* élevé sur *B. napus* pendant 6 jours avant de changer de proie, en nourrissant ensuite les prédateurs avec l'optimum *A. pisum* (pendant 9 jours). Dix couples de coccinelles ont été nourris



continuellement avec *A. pisum* (proie optimale) et constituent le témoin. La durée de préoviposition, la fécondité et la viabilité des oeufs ont été quotidiennement observées. La progéniture (n = 60) de chaque coccinelle a été placée individuellement en boîte de Pétri de 5cm de diamètre et nourrie avec la proie optimale. Les paramètres de développement ont été observés quotidiennement.

### **Evaluation de l'effet maternel lié à la qualité de la proie des coccinelles**

Deux éléments ont été étudiés pour tester l'effet maternel lié à la qualité de la proie des coccinelles aphidiphages : d'une part l'espèce aphidienne et d'autre part la plante hôte. Deux espèces de pucerons ont été utilisées pour déterminer l'effet spécifique de la proie vis-à-vis des prédateurs Coccinellidae. *A. fabae* est peu favorable au développement d'*A. bipunctata* et *A. pisum* est considéré comme alimentation optimale (Hodek et Honek, 1996). Ces deux espèces aphidiennes sont élevées sur la fève, *V. faba*. L'effet de la plante hôte est étudié en élevant *M. persicae* sur deux plantes hôtes, *V. faba* ne contenant pas de GLS et *S. alba* contenant une teneur élevée en GLS.

Pour chacune des quatre combinaisons testées (2 espèces de pucerons sur la fève et une espèce de puceron élevée sur deux plantes hôtes), 60 larves d'*A. bipunctata* fraîchement écloses et issues de l'élevage de masse sont nourries individuellement en boîte de Pétri de 5 cm de diamètre. Les larves sont placées à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  de température et à 16 h de photopériode. Les coccinelles adultes qui viennent d'émerger sont

sexées et dix couples sont constitués pour chaque croisement. Cinq types de croisements ont été réalisés (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste des croisements réalisés lors de l'étude de l'effet maternel en fonction des différentes combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes utilisées comme proies d'*Adalia bipunctata*

<i>Proies des coccinelles</i> ♀			<i>Proies des coccinelles</i> ♂	
Combinaisons			Combinaisons	
Pucerons	Plantes hôtes		Pucerons	Plantes hôtes
<i>A. fabae</i>	<i>V. faba</i>	x	<i>A. fabae</i>	<i>V. faba</i>
<i>A. fabae</i>	<i>V. faba</i>	x	<i>A. pisum</i>	<i>V. faba</i>
<i>A. pisum</i>	<i>V. faba</i>	x	<i>A. fabae</i>	<i>V. faba</i>
<i>M. persicae</i>	<i>V. faba</i>	x	<i>M. persicae</i>	<i>S. alba</i>
<i>M. persicae</i>	<i>S. alba</i>	x	<i>M. persicae</i>	<i>V. faba</i>

Les croisements ♀ *M. persicae* *V. faba* x ♂ *M. persicae* *V. faba* et ♀ *M. persicae* *S. alba* x ♂ *M. persicae* *S. alba* ont déjà été réalisés précédemment lors de l'étude de l'effet de la plante hôte sur les paramètres de reproduction d'*A. bipunctata*.

La fécondité des coccinelles et la viabilité des œufs sont quotidiennement observées.

### Analyses statistiques

Les taux de reproduction des pucerons (évolution du nombre d'individus) sont calculés quotidiennement pour chaque répétition et sont analysés en réalisant des ANOVA à 2 facteurs (plante hôte et jour comme second facteur) suivis par des tests d'égalité de moyennes selon la méthode de Tukey. La mortalité et la viabilité des œufs, exprimées en pourcents sont d'abord transformées par la méthode angulaire ( $\arcsin\sqrt{x}$ , Dagnelie 1973) avant de réaliser les analyses ANOVA et les comparaisons de moyennes selon la méthode de Tukey. Les autres paramètres biologiques sont analysés directement

par ANOVA et test de comparaisons de moyennes par la méthode de Tukey.

Des ANOVA à deux facteurs sont réalisées pour analyser les résultats de fécondité, du nombre de pontes et de la viabilité des œufs de coccinelles observés lors de l'étude de l'effet maternel (en fonction de la combinaison de l'espèce aphidienne et de la plante hôte ainsi que du facteur temps). MINITAB (version 11.2) a été utilisé pour effectuer les analyses statistiques (Minitab, 1998).

## **Résultats**

### **Taux d'accroissement des pucerons selon la plante hôte**

Après avoir comparé les coefficients  $\beta_{yx}$  (respectivement 23,0, 29,0 et 53,6 pour *V. faba*, *S. alba* et *B. napus*) des équations des droites de régression linéaire, des différences significatives ont été observées suivant la plante hôte de *M. persicae* ( $t = 2,29$  et  $P = 0,035$ ,  $t = 11,05$  et  $P < 0,001$ ,  $t = 7,75$  et  $P < 0,001$  respectivement pour les comparaisons *V. faba* et *S. alba*, *V. faba* et *B. napus*, *S. alba* et *B. napus*). *B. napus* et *S. alba* influencent positivement le développement de *M. persicae* (Figure 10 et Tableau 10).

Dans le cas de *B. brassicae*, le coefficient  $\beta_{yx}$  de la droite de *B. napus* est également significativement supérieur à celui de la droite de régression relative à *S. alba* (respectivement 23,6 et 9,20 ;  $t = 13,63$  et  $P < 0,001$ ).

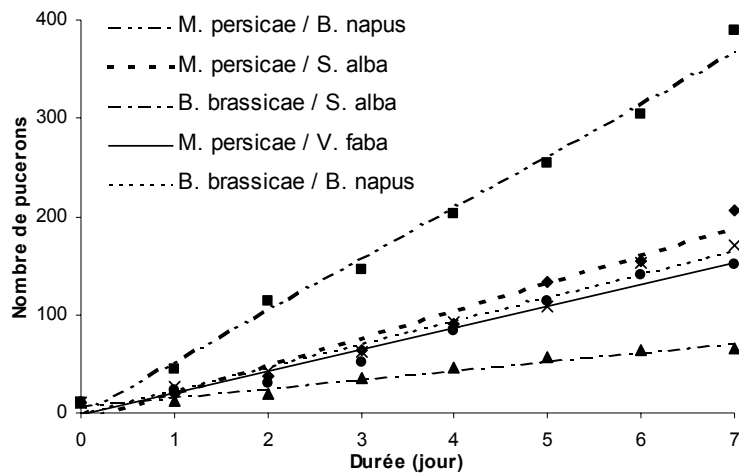


Figure 10 : Taux de reproduction de *Myzus persicae* et *Brevicoryne brassicae* en fonction de diverses plantes hôtes

Tableau 10: Equations de régression linéaire calculées pour les deux espèces de pucerons selon la plante hôte

Espèces de puceron et de plante hôte	Equation de la droite de régression	Coéfficient de détermination
<i>M. persicae</i> / <i>V. faba</i>	$y = 23.0 x - 6.03$	$R^2 = 0.983$
<i>M. persicae</i> / <i>B. napus</i>	$y = 53.6 x - 5.59$	$R^2 = 0.992$
<i>M. persicae</i> / <i>S. alba</i>	$y = 29.0 x - 12.09$	$R^2 = 0.978$
<i>B. brassicae</i> / <i>B. napus</i>	$y = 24.9 x - 6.00$	$R^2 = 0.982$
<i>B. brassicae</i> / <i>S. alba</i>	$y = 9.6 x + 4.34$	$R^2 = 0.971$

## Paramètres de développement des coccinelles

### *Durées de développement et mortalité*

Avant d'analyser l'influence de la plante hôte sur la durée de développement et la mortalité des prédateurs, l'impact des deux espèces aphidiennes sur ces paramètres a été étudié. Le développement larvaire d'*A. bipunctata* est significativement allongé lorsque les coccinelles sont nourries avec *B. brassicae* élevé sur *B. napus* plutôt qu'avec *M. persicae* élevé sur *B. napus* ( $F = 199,49$  et

P < 0,001). En considérant chaque stade larvaire des coccinelles nourries avec *M. persicae* ou *B. brassicae*, des différences significatives de durée de développement ont été observées (F = 8.54 et P = 0,004 ; F = 137,75 et P < 0,001; F = 16,65 et P < 0,001; F = 120,75 et P < 0,001; F = 19,64 et P < 0,001 respectivement pour les quatre stades larvaires et pour le stade de nymphe). L'allongement de la durée de développement du prédateurs est encore plus élevé lorsque la proie *B. brassicae* est élevée sur *S. alba*. Dans ce cas, aucune larve de coccinelle n'accomplit un cycle biologique complet. Les valeurs des tests statistiques respectifs des 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> stades sont F = 53,19 ; F = 103,87 ; F = 214,75 et P < 0,001). Les comparaisons relatives au 4<sup>ème</sup> stade larvaire et à la nymphose n'ont pas été réalisées puisque les coccinelles nourries avec *B. brassicae* élevé sur *S. alba* n'ont jamais atteint la nymphose du dernier stade larvaire puisqu'elles meurent préalablement.

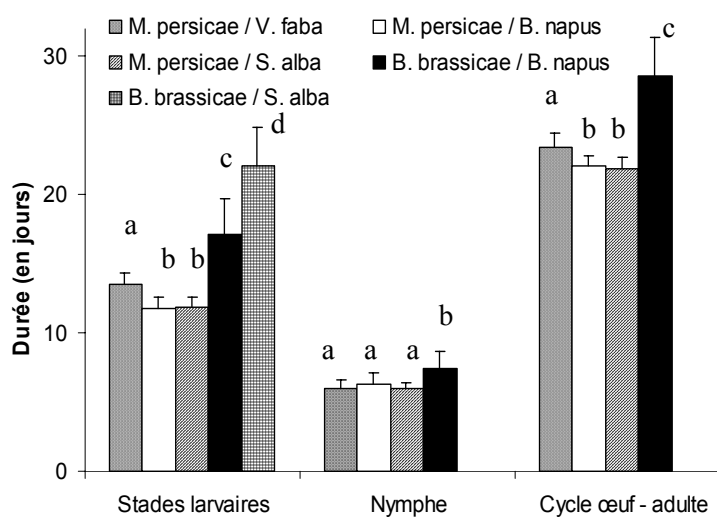


Figure 11 : Durées de développement larvaire, de nymphose et de cycle œuf - adulte d'*Adalia bipunctata* nourrie avec les combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes

La plante hôte du puceron provoque des variations significatives des paramètres biologiques de la coccinelle. Les durées de développement des larves d'*A. bipunctata* nourries avec *M. persicae* élevés sur *S. alba* et *B. napus* sont significativement différentes de celles correspondant aux larves élevées avec *M. persicae* sur *V. faba* ( $t = 11,66$  et  $P < 0,001$  ;  $t = 12,82$  et  $P < 0,001$ ) (Figure 11). Il n'y a cependant pas de différence significative entre les deux espèces de Brassicaceae ( $t = 0,984$  et  $P = 0,245$ ). La durée de nymphose des individus nourris avec *M. persicae* élevé sur *B. napus* est significativement supérieure à celles correspondant aux autres combinaisons ( $t = 2,88$  et  $P = 0,007$ ;  $t = 3,21$  et  $P = 0,003$ ). La durée totale du cycle de développement des coccinelles nourries avec *M. persicae* élevé sur *V. faba* est significativement supérieure à celles des individus nourris avec le puceron ayant les deux espèces de Brassicaceae comme plante hôte ( $t = 10,23$  et  $P < 0,001$  ;  $t = 8,82$  et  $P < 0,001$  respectivement pour les comparaisons *M. persicae* sur *V. faba* et *M. persicae* sur *S. alba*, *M. persicae* sur *V. faba* et *M. persicae* sur *B. napus*). Aucune différence significative n'a été observée entre les larves nourries avec *M. persicae* sur *S. alba* et *B. napus* ( $t = 1,33$  et  $P = 0,164$ ).

L'effet de la plante hôte de la proie sur la durée de développement des coccinelles a aussi été investigué en considérant chaque stade larvaire séparément. Quand *M. persicae* est utilisé, des différences significatives de durées de développement sont observées pour les 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> stades larvaires et pour la durée de nymphose en fonction de la plante hôte (respectivement  $F = 35,59$  et  $P < 0,001$ ;  $F = 53,82$  et  $P < 0,001$ ;  $F = 77,51$  et  $P < 0,001$ ). La plante hôte de *M. persicae*

n'influence pas significativement les durées des 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> stades larvaires (respectivement  $F = 3,45$  et  $P = 0,066$ ;  $F = 0,64$  et  $P = 0,426$ ).

Lorsque les larves de coccinelles sont nourries avec *B. brassicae* élevé sur *B. napus* ou *S. alba*, des différences significatives de durées de développement ont été observées à chaque stade larvaire en fonction de l'espèce de plante hôte. Les valeurs statistiques sont respectivement  $F = 75,43$  et  $P < 0,001$ ;  $F = 14,18$  et  $P = 0,001$ ;  $F = 43,75$  et  $P < 0,001$  pour les 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> stades larvaires. Aucune comparaison n'a été réalisée pour le 4<sup>ème</sup> stade larvaire et pour la nymphose; aucune coccinelle nourrie avec *B. brassicae* élevé sur *S. alba* n'a atteint le dernier stade larvaire puisqu'elles meurent avant.

### ***Mortalités larvaires et totales***

Lorsque la mortalité totale des coccinelles est considérée (Figure 12), des différences significatives ont été observées en fonction de l'espèce aphidienne ( $F = 60,46$ ,  $P < 0,001$ ). Aucune différence significative de mortalité n'est observée pour les coccinelles nourries avec *M. persicae* élevé sur les espèces de Brassicaceae et sur la fève utilisée comme témoin ( $F = 0,87$ ;  $P = 0,494$ ). Lorsque *B. brassicae* est utilisé comme proie des coccinelles, des différences hautement significatives de mortalité totale ont été observées en fonction de la plante hôte ( $F = 447,97$ ;  $P < 0,001$ ). La mortalité des coccinelles nourries avec *B. brassicae* élevé sur *B. napus* est significativement inférieure à celles correspondant aux prédateurs nourris de pucerons élevés sur *S. alba* ( $t = 0,141$ ;  $P < 0,001$ ).

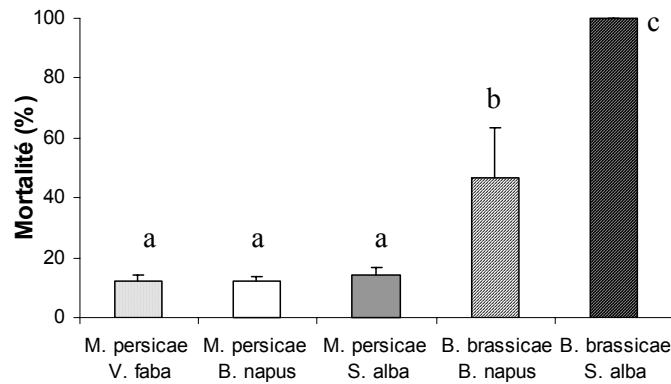


Figure 12 : Taux de mortalité totale d'*Adalia bipunctata* nourrie avec différentes combinaisons d'espèces de plantes hôtes et de pucerons (n = 60). Les barres d'erreur représentent les écarts types par rapport à la moyenne et les lettres indiquent des différences significatives à P = 0,05.

La mortalité à chaque stade larvaire d'*A. bipunctata* nourrie avec les combinaisons d'espèces de puceron et de plante hôte a été évaluée (Figure 13). Le changement de plante hôte de *M. persicae* provoque une différence significative de mortalité au 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> stades larvaires (respectivement F = 40,41 et P < 0,001; F = 65,65 et P < 0,001). *B. napus* provoque une mortalité inférieure à celle correspondant à la moutarde (t = 0,094 et P < 0,010). Les mortalités observées au 2<sup>ème</sup> stade larvaire chez les coccinelles ne sont pas significativement différentes lorsque les prédateurs sont nourris avec *M. persicae* élevé sur *B. napus* ou *S. alba* (F = 0,60 et P = 0,579). Le changement de plante hôte de *B. brassicae* engendre des différences significatives de mortalité des coccinelles aux 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> stades larvaires (respectivement F = 27,42 et P = 0,001; F = 5,16 et P = 0,048). La plante hôte de *B. brassicae* n'induit, quant à elle, aucune différence significative de mortalité aux 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stades larvaires (respectivement F = 0,26 et P = 0,779; F = 1,88 et P = 0,232).



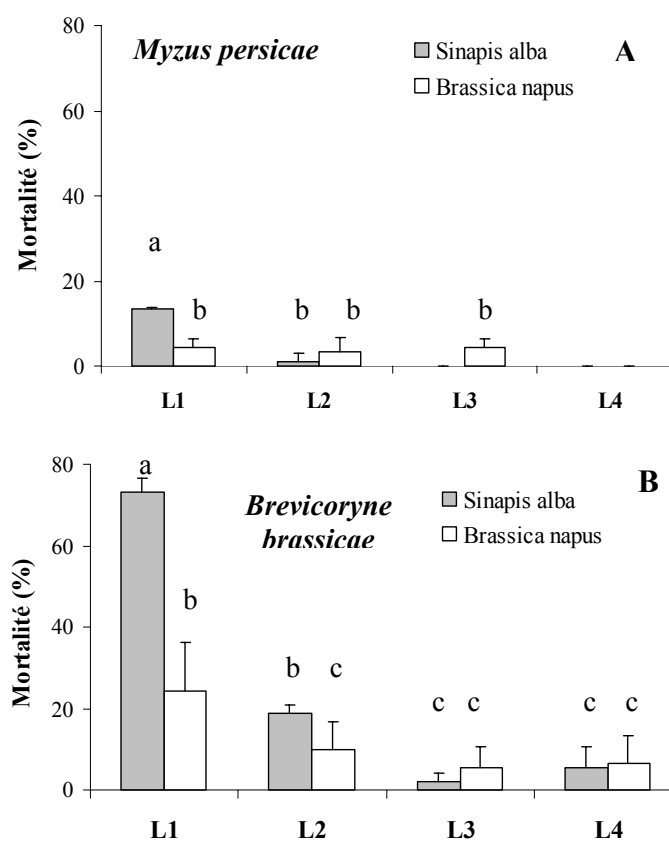


Figure 13 : Effet de la plante hôte de la proie sur la mortalité larvaire d'*Adalia bipunctata* nourrie avec *Myzus persicae* (a) et *Brevicoryne brassicae* (b) élevés sur *Brassica napus* ou *Sinapis alba* (n = 60 pour chaque test). Les barres d'erreur représentent l'écart type par rapport à la moyenne et les lettres indiquent des différences significatives à P = 0,05.

### **Poids à l'émergence des adultes et sexe ratio**

Les poids des adultes d'*A. bipunctata* nourris avec *M. persicae* élevé sur *S. alba* ou *B. napus* sont significativement supérieurs à ceux des prédateurs nourris avec cette espèce de pucerons élevés sur *V. faba* (t = 4,69 et P < 0,001; t = 3,68 et P < 0,001) (Figure 14). Aucune différence significative de poids des adultes n'a été observée lorsque les coccinelles ont été nourries avec *M. persicae* élevés sur *B. napus*

ou *S. alba* ( $t = 0,945$  et  $P = 0,255$ ). Par contre, les poids des coccinelles nourries avec *M. persicae* élevé sur *B. napus* ou avec *B. brassicae* élevé sur *B. napus* sont significativement différents ( $F = 302,84$  et  $P < 0,001$ ).

Aucune différence significative n'a été observée pour les sexe ratios des coccinelles nourries avec *M. persicae* élevé sur les trois plantes hôtes ( $u = 1,347$  et  $P = 0,178$ ;  $u = 0,135$  et  $P = 0,893$ ;  $u = 1,350$  et  $P = 0,177$ ). De même, les sexe ratios des coccinelles nourries avec *M. persicae* élevé sur *B. napus* ou avec *B. brassicae* élevé sur *B. napus* ne sont pas significativement différents ( $u = 0,118$  et  $P = 0,906$ ).

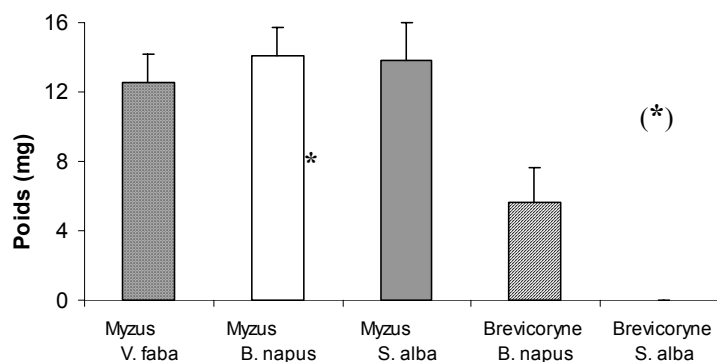


Figure 14 : Poids des adultes d'*Adalia bipunctata* nourris avec une des différentes combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes.

(\*) Aucune coccinelle n'a atteint le stade adulte.

## Paramètres de reproduction des coccinelles

### *Estimation de la fécondité et de la viabilité des oeufs de coccinelles*

Seules les observations relatives aux coccinelles nourries avec *B. brassicae* sont manquantes dans le deuxième tableau récapitulatif (Tableau 11). En ce qui concerne la combinaison *B. brassicae* élevé

sur *S. alba*, aucune coccinelle n'est arrivée au stade adulte. Lorsque *B. napus* a été utilisé comme plante hôte pour la même espèce de puceron, certains adultes d'*A. bipunctata* ont émergé (34 individus sur 60) mais aucune progéniture n'a été observée après 21 jours.

La plante hôte du puceron influence la fécondité des femelles et la viabilité des oeufs d'*A. bipunctata* (Tableau 12). Les résultats concernant la fécondité (Figure 15) ont été analysés en réalisant une ANOVA à 2 critères. Une interaction entre la plante hôte des proies et le facteur temps a été observée ( $F = 2,20$  ;  $P = 0,003$ ). Plusieurs ANOVA à un critère ont été réalisées séparément et ont révélé des différences significatives en fonction de la plante hôte ( $F = 10,60$ ;  $P < 0,001$ ). L'utilisation de *S. alba* comme plante hôte de *M. persicae* diminue la fécondité des coccinelles ( $t = 3,63$  et  $P < 0,001$ ;  $t = 4,27$  et  $P < 0,001$  respectivement par rapport à *V. faba* et *B. napus*). La période d'observation influence aussi significativement la fécondité des prédateurs ( $F = 7,22$  et  $P < 0,001$ ) même si le nombre d'oeufs par femelle ne varie pas significativement durant les neuf premiers jours ( $0,24 < t < 3,05$  et  $0,985 < P < 0,240$  en fonction du jour considéré). Des différences significatives de fécondité de coccinelles ont été observées à partir du 10<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de l'expérimentation ( $3,81 < t < 5,56$  et  $0,030 < P < 0,001$  suivant le jour considéré).

La viabilité des œufs de la coccinelle varie significativement en fonction de la plante hôte ( $F = 8,96$  et  $P < 0,001$ ) (Figure 16). *M. persicae* élevé sur *S. alba* réduit l'émergence des larves de coccinelles ( $t = 4,20$  et  $P < 0,001$ ;  $t = 2,54$  et  $P = 0,037$  respectivement

pour les prédateurs nourris avec *M. persicae* élevé sur *V. faba* et sur *B. napus*).

Le nombre de pontes déposées par femelle et par jour est significativement différent en fonction de la plante hôte de la proie ( $F = 17,25$  et  $P < 0,001$ ) et de la période d'observation ( $F = 5,84$  et  $P < 0,001$ ). Aucune interaction n'a été observée entre la plante hôte et le facteur temps ( $F = 1,20$  et  $P = 0,257$ ). Le nombre de pontes déposées par *A. bipunctata* diffère significativement en fonction de la plante hôte de *M. persicae* ( $t = 5,87$  et  $P < 0,001$ ;  $t = 2,90$  et  $P = 0,013$ ;  $t = 2,97$  et  $P = 0,011$  respectivement pour *M. persicae* élevé sur *V. faba* et *S. alba*, *V. faba* et *B. napus*, *S. alba* et *B. napus*). Des différences significatives de nombre de pontes de coccinelle ont été observées à partir du 5<sup>ème</sup> jour ( $3,86 < t < 5,34$  et  $0,040 < P < 0,001$  en fonction du jour considéré).

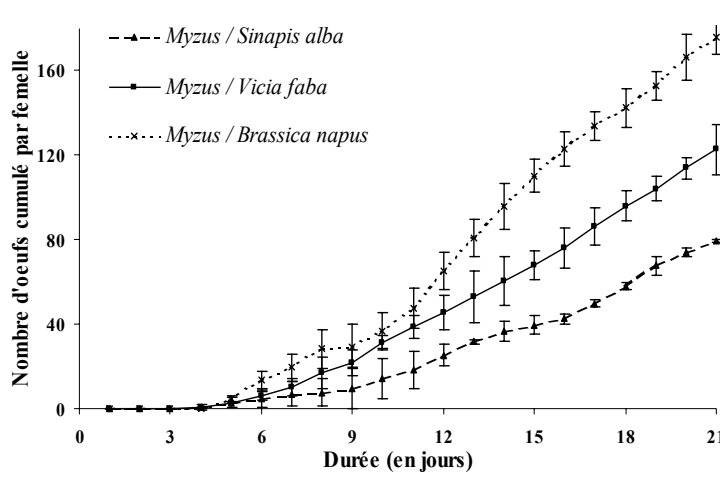


Figure 15 : Evolution de la fécondité d'*Adalia bipunctata* nourries avec *Myzus persicae* en fonction de la plante hôte (*Vicia faba*, *Brassica napus* et *Sinapis alba*).

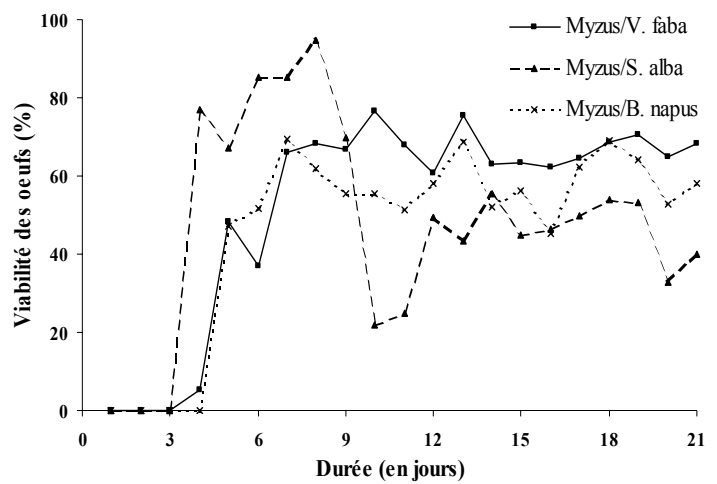


Figure 16 : Evolution de la fertilité d'*Adalia bipunctata* nourries avec *Myzus persicae* en fonction de la plante hôte (*Vicia faba*, *Brassica napus* et *Sinapis alba*).

Tableau 11: Résultats récapitulatifs des performances reproductives d'*Adalia bipunctata* nourrie avec *Myzus persicae* en fonction de la plante hôte.

Plante hôte	Pontes (nombre/♀/jour)	Fécondité (œufs/♀/jour)	Viabilité œufs (%)	Fitness (r) <sup>a</sup>
<i>V. faba</i>	0,67 ± 0,26 a	6,82 ± 2,78 a	64,9 ± 3,9 a	1,00 ± 0,00 a
<i>B. napus</i>	0,53 ± 0,21 a	10,35 ± 4,27 b	57,6 ± 0,5 b	1,14 ± 0,07 a
<i>S. alba</i>	0,33 ± 0,12 b	4,42 ± 2,65 c	48,8 ± 0,5 c	0,50 ± 0,02 b

Les valeurs sont des moyennes ± écart-types des observations quotidiennes. Les lettres différentes dans une colonne indiquent des différences significatives à P = 0,05.

<sup>a</sup> Valeurs relatives par rapport à la valeur de fitness du témoin (*Myzus persicae* élevé sur *Vicia faba* : 0,14 ± 0,01). Les valeurs de fitness ont été calculées sur base des moyennes obtenues par répétition pour chaque espèce de plante hôte.

Les valeurs relatives des fitness des coccinelles nourries avec les diverses combinaisons d'espèces aphidiennes et de plantes hôtes ont été calculées et sont présentées au Tableau 11.

### **Etude de l'effet environnemental de la plante hôte de la proie des coccinelles**

Lorsqu'*A. bipunctata* est nourrie avec *B. brassicae* infestant *B. napus* dès l'émergence des adultes, aucune influence significative sur la durée de préoviposition n'a été observée par rapport au témoin ( $4,56 \pm 0,44$  et  $4,22 \pm 0,36$ ;  $F = 0,34$  et  $P = 0,570$ ). La consommation momentanée (durant 6 jours) de *B. brassicae* élevé sur *B. napus* par les coccinelles diminue la fécondité des prédateurs (Figure 17). Le nombre d'œufs déposés par *A. bipunctata* nourrie avec *B. brassicae* est significativement inférieur à celui des coccinelles témoins pendant les trois premiers jours (respectivement  $F = 9,13$  et  $P = 0,008$ ;  $F = 1,97$  et  $P = 0,180$ ). Suite au transfert de proie (de nouveau l'optimum *A. pisum* pendant 9 jours), aucune différence significative de fécondité n'a été observée ( $F = 0,33$  et  $P = 0,574$ ;  $F = 0,01$  et  $P = 0,905$ ;  $F = 0,91$  et  $P = 0,354$ ).

L'influence la plus marquée du transfert de proies est observée sur la viabilité des œufs durant la période d'alimentation des coccinelles avec *B. brassicae* infestant *B. napus* ( $F = 11,49$  et  $P = 0,004$ ;  $F = 9,97$  et  $P = 0,006$  respectivement pour les jours 1-3 et 4-6, Figure 18). Les coccinelles momentanément nourries avec *B. brassicae* continuent à pondre moins d'œufs après le transfert à la proie optimale *A. pisum* ( $F = 1,59$  et  $P = 0,228$ ;  $F = 6,07$  et  $P = 0,026$ ;  $F = 0,03$  et  $P = 0,860$  respectivement pour les jours 7-9, 10-12 et 12-15).

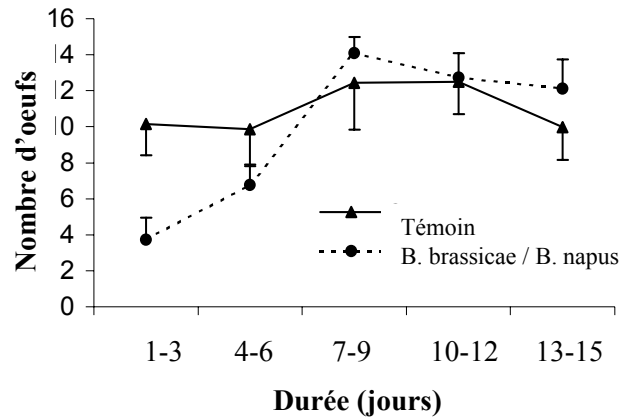


Figure 17: Effet d'un transfert de proie pendant 6 jours sur la fécondité d'*Adalia bipunctata* (moyenne  $\pm$  SE). *Acyrtosiphon pisum* élevé sur *Vicia faba* constitue la proie témoin optimum et a été remplacé pendant 6 jours par *Brevicoryne brassicae* infestant *Brassica napus*.

La viabilité de la descendance des coccinelles nourries avec *B. brassicae* élevé sur *B. napus* est de loin inférieure à celle du témoin. Aucune des six larves survivantes n'a atteint le stade de nymphe. Après avoir changé de proie en nourrissant à nouveau les coccinelles avec *A. pisum*, aucune différence significative n'est observée ( $F = 4,53$  et  $P = 0,118$ ). La durée totale de développement de la descendance est supérieure lorsque les parents ont été nourris avec la proie inadéquate ( $F = 15,64$  et  $P < 0,001$ ). Le poids des adultes à l'émergence est inférieur lorsque les coccinelles parents ont été nourries avec *B. brassicae* élevé sur *B. napus*. Les femelles ( $11,83 \pm 1,65$  mg;  $F = 4,33$  et  $P = 0,047$ ) et les mâles ( $8,71 \pm 1,44$  mg;  $F = 28,56$  et  $P < 0,001$ ) de coccinelles issus de couples nourris avec *B. brassicae* sont plus légers que les individus nourris avec la proie témoin (respectivement  $13,26$  mg  $\pm$  2,05 et  $11,54$  mg  $\pm$  1,38).

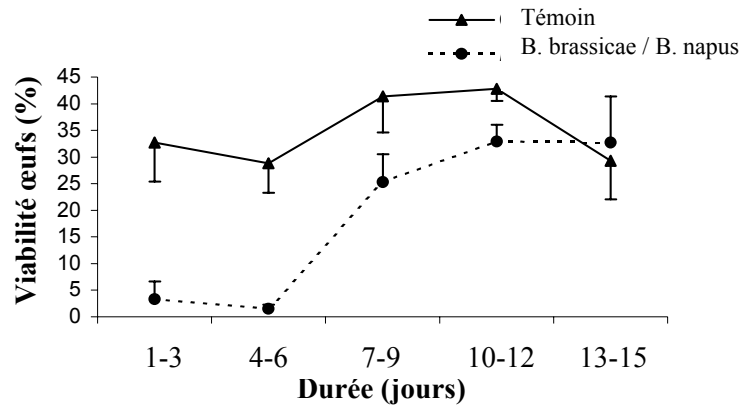


Figure 18 : Effet d'un transfert de proie pendant 6 jours sur la viabilité des œufs d'*Adalia bipunctata* (moyenne  $\pm$  SE). *Acyrtosiphon pisum* élevé sur *Vicia faba* constitue la proie témoin optimum et a été remplacé pendant 6 jours par *Brevicoryne brassicae* infestant *Brassica napus*.

### Evaluation de l'effet maternel lié à la qualité de la proie

L'influence de l'espèce de puceron a été investiguée en utilisant *A. fabae*, proie inappropriée mais de subsistance (permettant d'accomplir le cycle de développement sans trop de mortalité mais diminuant la fécondité), pour nourrir *A. bipunctata*. Le premier paramètre reproductif considéré, la fécondité, est significativement différent en fonction des croisements réalisés (Figure 19) ( $F = 80,30$ ;  $P < 0,001$ ). Chaque croisement est significativement différent des autres ( $t = 5,19$ ;  $t = 11,24$ ;  $t = 6,14$  et  $P < 0,001$  pour les trois comparaisons). Des observations similaires ont été réalisées lors de l'évaluation du nombre de pontes par femelle ( $F = 63,22$ ;  $P < 0,001$ ): les trois combinaisons sont significativement différentes les unes des autres ( $t = 4,74$ ;  $t = 12,61$ ;  $t = 7,91$  et  $P < 0,001$  pour les trois comparaisons).



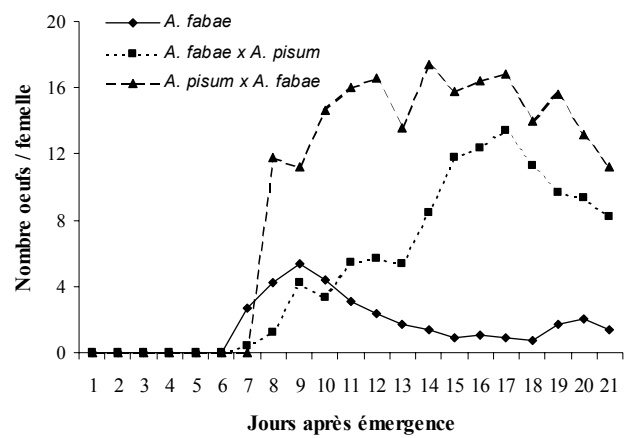


Figure 19 : Effet maternel de l'espèce de puceron (*Aphis fabae* ou *Acyrtosiphon pisum*) sur la fécondité d'*Adalia bipunctata*. La première espèce de puceron citée correspond à la proie de la femelle.

En considérant la viabilité des oeufs, des différences significatives ont été observées entre les croisements réalisés ( $F = 8,06$ ;  $P = 0,001$ ) (Figure 20). Alors que la viabilité des oeufs correspondant au croisement ♀ *A. pisum* x ♂ *A. fabae* est significativement supérieure aux deux autres combinaisons ( $t = 3,26$  et  $P = 0,003$ ;  $t = 3,73$  et  $P < 0,001$ ), aucune différence significative n'a été observée entre les croisements ♀ *A. fabae* x ♂ *A. fabae*, ♀ *A. fabae* x ♂ *A. pisum* ( $t = 0,54$ ;  $P = 0,340$  ; Figure 21).

La seconde source d'effet maternel potentiel qui a été étudiée est la plante hôte de la proie (Figure 22). Comme le facteur temps influence les trois paramètres de reproduction des coccinelles ( $F = 2,06$  et  $P = 0,024$  ;  $F = 2,39$  et  $P = 0,018$  ;  $F = 5,20$  et  $P < 0,001$  respectivement pour le nombre de pontes, la fécondité et la viabilité des œufs), des analyses de la variance à 1 critère ont été réalisées en fonction du croisement considéré. Le nombre de pontes issu des croisements impliquant des femelles nourries avec *M. persicae* élevé

sur *S. alba* est significativement supérieur aux valeurs du témoin ( $t = 2,82$  et  $P = 0,017$ ).

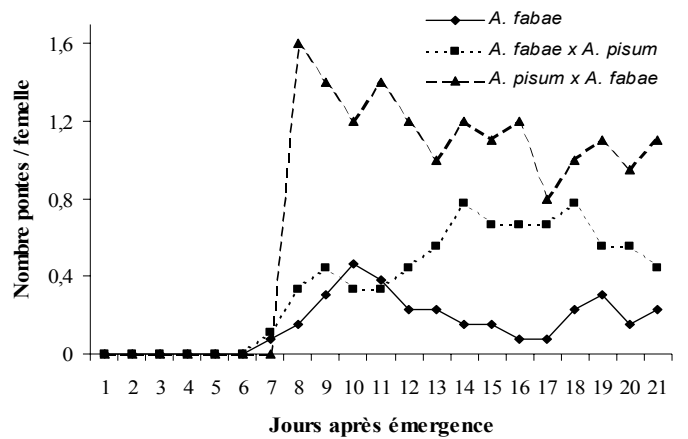


Figure 20 : Effet maternel de l'espèce de puceron (*Aphis fabae* ou *Acyrtosiphon pisum*) sur le nombre de pontes déposées par *Adalia bipunctata*. La première espèce de puceron citée correspond à la proie de la femelle.

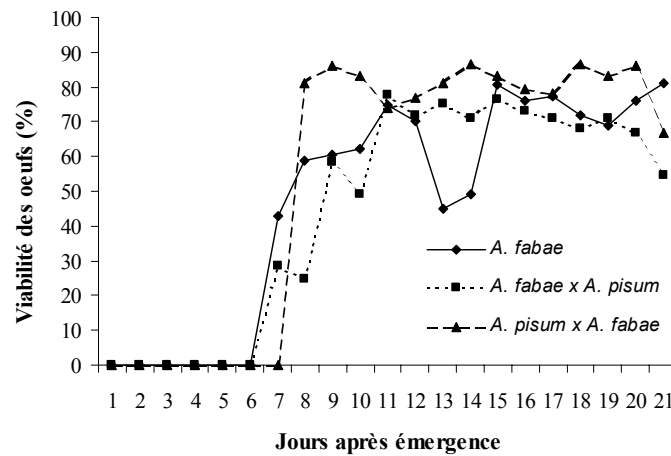


Figure 21 : Effet maternel de l'espèce de puceron (*Aphis fabae* ou *Acyrtosiphon pisum*) sur la viabilité des oeufs d'*Adalia bipunctata*. La première espèce de puceron citée correspond à la proie de la femelle.

La fécondité relative des femelles nourries avec *M. persicae* élevé sur *S. alba* est significativement supérieure à celle des femelles nourries avec *M. persicae* élevé sur *V. faba* et qui ont été utilisées dans les deux autres types de croisements ( $F = 9,22$  et  $P < 0,001$ ;  $t = 4,11$  et  $P < 0,001$  ;  $t = 3,13$  et  $P = 0,007$  respectivement par rapport au croisement ♀ *Myzus V. faba* x ♂ *Myzus S. alba* et au témoin ; Figure 23).

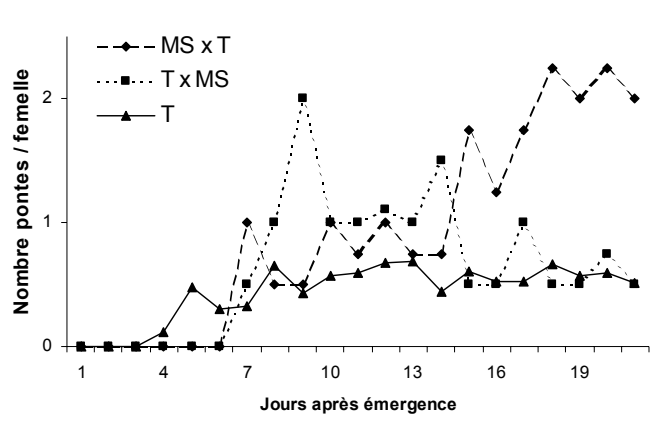


Figure 22 : Effet maternel de la plante hôte de *Myzus persicae* sur le nombre de pontes déposées par *Adalia bipunctata*. MS : *Myzus* élevé sur *Sinapis alba* et T : *Myzus* élevé sur *Vicia faba* comme témoin. La première espèce de puceron citée correspond à la proie de la femelle.

La fertilité des oeufs déposés par les coccinelles correspondant aux croisements ♀ *Myzus V. faba* x ♂ *Myzus S. alba* est significativement inférieure aux taux d'émergence larvaire relatifs aux deux autres combinaisons ( $F = 5,69$  et  $P = 0,005$  ;  $t = 2,85$  et  $P = 0,016$  ;  $t = 2,98$  et  $P = 0,011$  respectivement par rapport au croisement ♀ *Myzus S. alba* x ♂ *Myzus V. faba* et au témoin ; Figure 24).

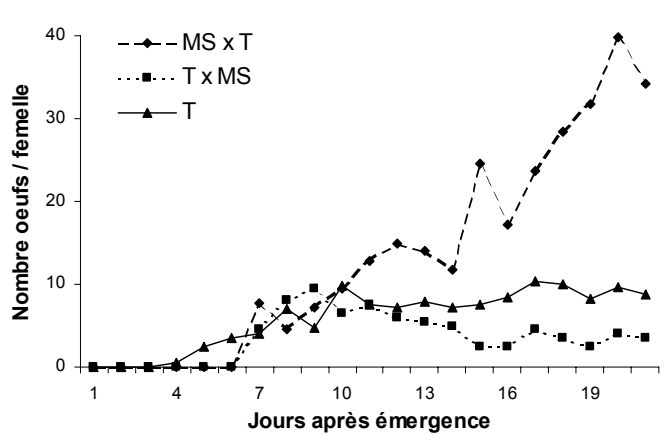


Figure 23 : Effet maternel de la plante hôte de *Myzus persicae* sur la fécondité d'*Adalia bipunctata*. MS : *Myzus* élevé sur *Sinapis alba* et T : *Myzus* élevé sur *Vicia faba* comme témoin. La première espèce de puceron citée correspond à la proie de la femelle.

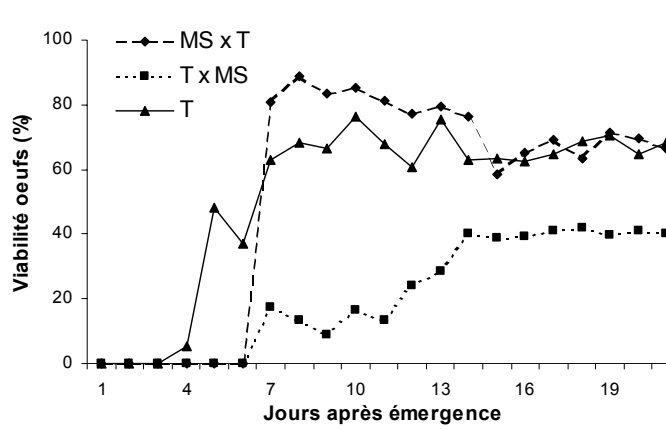


Figure 24 : Effet maternel de la plante hôte de *Myzus persicae* sur la viabilité des oeufs d'*Adalia bipunctata*. MS : *Myzus* élevé sur *Sinapis alba* et T : *Myzus* élevé sur *Vicia faba* comme témoin. La première espèce de puceron citée correspond à la proie de la femelle.

## ***Discussions***

### **Taux d'accroissement des pucerons**

Les taux d'accroissement des pucerons sont supérieurs lorsque les espèces de Brassicaceae ont été utilisées comme plantes hôtes. Alors que *S. alba* favorise déjà l'augmentation du nombre moyen de pucerons, les taux de reproduction des insectes phytophages sont nettement supérieurs lorsque *B. napus* est la plante hôte par rapport à la plante témoin. Cette tendance a également été observée chez le ravageur spécialiste, *B. brassicae*. Des observations similaires ont été reportées par van Emden (1990). Ce dernier a suggéré que les glucosinolates jouent un rôle de stimulation de la nutrition chez le spécialiste *B. brassicae* alors que les substances nutritives, pour l'essentiel des acides aminés, stimulent le puceron généraliste *M. persicae*. Cole (1997 ab) a conclu que les profils en glucosinolates des espèces végétales de Brassicaceae ont un impact significatif sur les performances de développement des deux taxa, *B. brassicae* et *M. persicae*. Ce dernier, élevé sur *B. napus*, donne une progéniture présentant une durée de vie plus longue, un poids plus élevé et des durées de développement plus rapides par rapport à des pucerons inféodés à des betteraves (Gladders et Peters, 1986). Ces auteurs ont également montré que les modifications des paramètres biologiques observés chez *M. persicae* ne dépendaient pas de l'espèce de plante hôte précédent le transfert des pucerons sur *B. napus* (colza ou betterave). Nault et Styer (1972 ab) ont montré une augmentation de la nutrition de *M. persicae* lorsqu'un glucosinolate, la sinigrine, est présente dans la diète artificielle. La présence de substances végétales

secondaires comme caractère adéquat de la plante hôte a été illustrée en utilisant *Brassica juncea*, *B. napus* et *B. campestris* comme hôtes du puceron *Lipaphis erysimi*. Weibull et Melin (1990) ont conclu que les variations de taux de reproduction du puceron n'étaient pas liées à la qualité nutritionnelle de la plante mais bien à la présence de molécules allélochimiques.

### **Paramètres de développement de la coccinelle**

Les insectes entomophages peuvent être directement influencés par les plantes, soit en affectant la qualité (valeur nutritive, toxicité) ou le comportement de recherche de la proie (Vet et Dicke, 1992). Si les substances allélochimiques induisent des changements de paramètres biologiques chez le puceron, l'impact de ces molécules sur les paramètres de développement des prédateurs aphidiphages est également démontré. En effet, la coccinelle à deux points atteint le stade adulte plus rapidement lorsqu'elle est nourrie avec *M. persicae* élevé sur les espèces de Brassicaceae. Par contre, les plantes de crucifères hôtes de *B. brassicae* augmentent les durées de développement du prédateur et le poids à l'émergence des adultes est deux fois plus faible lorsque *B. napus* est utilisée comme plante hôte du puceron cendré du chou par rapport à une proie témoin telle que *M. persicae* infestant *V. faba*. Si le taux de GLS dans la plante est supérieur, comme chez *S. alba*, aucune coccinelle n'atteint le stade adulte. Ces résultats doivent être mis en relation avec le comportement de plusieurs coccinelles. En effet, si *A. bipunctata* évite de consommer *B. brassicae*, ce puceron est aussi une proie peu appréciée de *Coccinella septempunctata* (Blackman, 1965 et 1967) et d'*Harmonia*

*axyridis* (Hukusima et Kamei, 1970). Des inhibitions de développement liées à la présence de molécules secondaires végétales ont été démontrées chez *Spodoptera eridiana* et *Papilio polyxenes* lorsque les substances secondaires de Brassicaceae sont introduites dans le régime alimentaire de ces insectes (Blau et al., 1978).

Si la toxicité des GLS et de leurs produits de dégradation est bien connue vis-à-vis de nombreux insectes phytophages (Erickson et Feeny, 1974 ; Aliabadi et Whitman, 2001), l'influence de ces molécules sur les performances biologiques des prédateurs devait être investiguée. Les analyses chimiques par chromatographie réalisées au chapitre 7 ont permis d'identifier des GLS intacts chez *M. persicae* élevé sur les espèces de Brassicaceae alors que les ITC, produits de dégradation de ces derniers par la myrosinase endogène du puceron *B. brassicae*, sont émis par cette dernière espèce aphidienne. Dès lors, la toxicité élevée de *B. brassicae* lorsqu'il est utilisé comme proie des coccinelles peut être objectivement expliquée par la présence des ITC. En effet, l'allyle-ITC et le méthyle-ITC sont rapidement toxiques pour *A. bipunctata* (respectivement  $0,189 \text{ ppm} < DL_{50} < 0,308 \text{ ppm}$  et  $0,218 \text{ ppm} < DL_{50} < 0,551 \text{ ppm}$ ) après 24 heures d'exposition (Francis et al., 1999). Par contre, comme aucune activité thioglycosidase n'a été détectée chez *M. persicae*, les GLS sont stockés intacts dans le puceron avant d'être éliminés dans le miellat et la toxicité des GLS est bien inférieure à celles correspondant aux ITC. Même si les GLS ont un effet moins marqué sur les paramètres biologiques des insectes qui les ingèrent, ces molécules sont actives. La sinigrine incorporée dans une diète artificielle de *Mamestra brassicae* ralentit le développement et le gain de poids des insectes, comme l'allyle-ITC, lorsqu'on

observe les droites de régression du poids en fonction des concentrations en substances allélochimiques (McCloskey et Isman, 1993).

L'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer la toxicité de certains pucerons envers les insectes entomophages est la séquestration des substances secondaires végétales. Les larves de *C. septempunctata* ne peuvent accomplir leur cycle de développement et meurent dans les 25 jours lorsque les coccinelles sont nourries avec *Aphis sambuci* (Hodek, 1956). Blackman (1965 et 1967) a répété ces expérimentations et a observé un effet moins marqué sur cette espèce prédatrice. La moitié des coccinelles ont atteint le stade adulte même si les individus sont deux fois plus légers que les coccinelles nourries avec un proie témoin. Le passage de la sambunigrine de *Sambucus nigra* dans le puceron a été confirmé (Hodek, 1956). Le glycoside peut être dégradé enzymatiquement en acide cyanohydrrique lorsque les proies sont consommées par les coccinelles. D'autres espèces de puceron sont également toxiques vis-à-vis d'*A. bipunctata* : *Macrosiphum aconitum* élevé sur *Aconitum* sp (contenant l'aconitine; Hawkes, 1920), *Aphis nerii* infestant l'oléandre (contenant l'oléadrine et la nériine; Malcolm, 1990), *Macrosiphum albifrons* et *Aphis jacobaeae* inféodés au *Lupinus mutabilis* (avec des alcaloïdes quinolizidines) et *Senecio* sp. (contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques) (Hodek et Honek, 1996).



### **Paramètres de reproduction d'*Adalia bipunctata***

L'étude de l'impact de la plante hôte sur la fécondité des prédateurs de pucerons a été réalisée en utilisant trois espèces végétales. *V. faba*, exempte de GLS, représente la plante témoin par rapport aux deux espèces de Brassicaceae. Alors que *S. alba* influence négativement la production d'œufs (diminution de 35%), *B. napus* engendre l'augmentation de la fécondité des prédateurs (augmentation de 43%). Les glucosinolates comme la sinigrine sont connus pour leur rôle de stimulant d'oviposition chez les insectes spécialistes de Brassicaceae comme *Delia brassicae* mais sont également responsables d'une inhibition de ponte et de phénomène de toxicité envers les insectes spécialistes d'autres familles botaniques (Lerin, 1980). Si une plus faible fécondité des coccinelles nourries avec des pucerons élevés sur des plantes à hautes teneurs en GLS (*S. alba*) a été observée, une augmentation du nombre d'œufs a été induite chez le prédateur généraliste, en présence de faibles taux de GLS dans la plante hôte (*B. napus*).

La diminution constante de la fertilité des œufs semble être liée à l'augmentation des taux de GLS dans la plante. Il est intéressant de souligner une inversion de fertilité des œufs de coccinelles nourries avec le puceron infestant *S. alba* observée après le neuvième jour. En effet, ce phénomène pourrait être lié à une toxicité chronique de certaines substances d'origine végétale. Même si des effets immédiats n'ont pas été observés dès le départ des observations expérimentales, les GLS ingérés par *M. persicae* pourraient être responsables de cet important changement des paramètres de reproduction chez la

coccinelle. De tels effets de substances secondaires végétales ingérées par les pucerons sur des auxiliaires entomophages ont déjà été observés par Hodek (1967).

### **Détermination des valeurs adaptatives des coccinelles**

La plante hôte des proies de coccinelles influence les paramètres de développement et de reproduction des prédateurs aphidiphages. Lorsque les valeurs adaptatives (fitness) des coccinelles nourries avec les pucerons élevés sur *S. alba*, cette dernière Brassicaceae réduit significativement le fitness d'*A. bipunctata* (valeur deux fois inférieure au témoin). L'impact de la variation des valeurs adaptatives chez les syrphes aphidiphages (*E. balteatus* et *S. ribesii*) en présence de diverses espèces de proies ont été investiguées par Sadeghi et Gilbert (2000). Ces auteurs ont démontré que les valeurs de fitness sont généralement constantes à quelques exceptions près. L'influence de la qualité de la proie, en terme de diversité d'espèces aphidiennes, n'est cependant pas systématique suivant les études considérées. Différents auteurs ont utilisé les mêmes espèces de prédateurs et de pucerons mais ont obtenu des résultats assez variables. Cette variabilité a été directement liée aux différentes plantes hôtes utilisées et à la présence de molécules secondaires dans ces plantes. Ces observations ont confirmé l'importance des interactions tritrophiques.

Enfin, même si les coccinelles se comportent différemment en fonction de l'espèce aphidienne (voir chapitre 6), l'acceptation des pucerons n'implique pas forcément qu'ils soient adéquats. Les Coccinellidae consomment parfois des proies inappropriées. Le

développement et la reproduction sont alors négativement affectés (Hodek et Honek, 1996). Les combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes utilisées dans ce chapitre pour nourrir *A. bipunctata* peuvent être classées comme suit :

- *M. persicae* élevé sur *V. faba* (sans glucosinolate) ou *B. napus* (contenant de faibles taux en glucosinolates) comme proies appropriées (assurant l'accomplissement du cycle de développement et l'oviposition);
- *M. persicae* élevé sur *S. alba* (avec de hautes teneurs en glucosinolates) comme proie acceptable (assurant le développement sans mortalité élevée mais présentant un effet négatif sur la reproduction);
- *B. brassicae* élevé sur *B. napus* comme proie alternative (provoquant une mortalité élevée, un allongement des durées de développement et une inhibition de l'oviposition);
- *B. brassicae* élevé sur *S. alba* comme proie toxique (mortalité totale).

### **Effet environnemental de la plante hôte de la proie**

Après avoir testé l'efficacité de prédation d'*A. bipunctata* nourrie avec les espèces de pucerons élevées sur des plantes hôtes contenant des molécules allélochimiques, le généraliste *M. persicae* mais aussi le spécialiste *B. brassicae* se sont révélés être des proies inadéquates pour la coccinelle lorsqu'ils sont élevés sur des plantes présentant des teneurs élevées en GLS. Quelle que soit la plante hôte, le puceron du chou est le plus dommageable des deux taxa aphidiens testés. Comme le comportement de nutrition des coccinelles prédatrices varie en fonction de la disponibilité des proies (Hemptinne et al., 1996),

*B. brassicae* élevé sur *B. napus* a été utilisé comme nourriture inappropriée pendant une courte période afin d'évaluer l'impact de cette proie sur la reproduction du prédateur. *S. alba* n'a pas été testé comme plante hôte du puceron du chou vu les résultats des expérimentations précédentes : cette combinaison ne permet pas aux coccinelles qui les consomment de se reproduire.

Les GLS et leurs produits de dégradation réduisent fortement la fécondité et la viabilité des œufs d'*A. bipunctata* tant que la proie aphidienne contient ces molécules végétales. Après avoir changé de puceron en alimentant les prédateurs avec une nourriture exempte de substances allélochimiques, l'effet négatif de la précédente diète disparaît progressivement.

Aucune des larves issues des coccinelles nourries avec *B. brassicae* n'a survécu. Une semaine après le changement de proie, les effets sont encore observés : des durées de développement accrues et un poids des adultes à l'émergence inférieur à celui des témoins. De même, une diète inadéquate de *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) influence négativement le développement de la génération suivante (Rossiter, 1991). Chez les drosophiles, un effet environnemental associé à la résistance au froid et à la chaleur est répercuté sur plusieurs générations (Jenkins et Hoffman, 1994). Comme dans le cas précédent, la qualité de la proie de coccinelle peut être définie comme un effet environnemental puisque les conséquences défavorables disparaissent lorsque le stress alimentaire cesse.

Même si les prédateurs Coccinellidae contribuent à la régulation des populations aphidiennes dans les cultures et sont considérés comme des agents efficaces de contrôle biologique, la coccinelle à deux points présente une spécificité élevée et est sensible à la qualité de ses proies. L'utilisation temporaire de pucerons inappropriés par les coccinelles est fréquemment observée lorsqu'aucune autre nourriture n'est disponible (Hodek et Honek, 1996) mais ce régime transitoire peut avoir des conséquences importantes sur les valeurs adaptatives (fitness) des prédateurs. Un effet à plus long terme peut dès lors être observé sur les générations suivantes, notamment en terme d'efficacité de reproduction et finalement de contrôle biologique des ravageurs aphidiens.

### **Effet maternel lié à la qualité de la proie des coccinelles**

Le bagage génétique mais aussi l'environnement déterminent le phénotype d'un organisme. Cette structure, non figée dans le temps, évolue durant toute la vie de l'individu (Bonner, 1974). Les insectes ont développé une certaine plasticité pour faire face aux changements perpétuels de leur environnement. Cette plasticité a été démontrée pour la plupart des paramètres biologiques des insectes: mortalité, fécondité (Kahn et Bradshaw, 1976), taille de la descendance (Weinstein et Hass, 1977).

Les coccinelles migrent d'un environnement à un autre en fonction de l'abondance de leurs proies. Quand de nouvelles plantes hôtes sont visitées par les prédateurs aphidiphages, d'autres espèces de pucerons

sont présentes et vont constituer les proies potentielles des coccinelles. Après avoir consommé les populations locales de pucerons, les prédateurs recherchent d'autres sources de nourriture. Les coccinelles nourries avec *A. fabae* développent une plasticité en atteignant le stade adulte avec un poids inférieur lorsque la proie est inappropriée, même si les durées de développement sont allongées. La taille réduite des femelles est directement impliquée dans la diminution des capacités reproductives des prédateurs. En effet, un effet maternel de la qualité de la proie (*A. fabae*) a été observé en terme de réduction du nombre de pontes, du nombre d'œufs et de la viabilité de ces derniers. L'influence maternelle de la taille a déjà été démontrée pour être impliquée sur les valeurs adaptatives (fitness) de la descendance chez certains vertébrés et chez les insectes (Fleming et Gross, 1990). La taille des femelles de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) est positivement corrélée à la taille des œufs et à la disponibilité en tant que ressource alimentaire pour les larves. Ce désavantage initial des larves se prolonge par des allongements de durée de développement mais pas nécessairement en affectant la taille des adultes émergeant (Fox, 1993). Chez *L. dispar*, le régime alimentaire des femelles affecte le développement de la descendance même si le critère de la taille des œufs n'est plus considéré. Ces observations indiquent que ce dernier critère n'est pas nécessairement une mesure adéquate de l'effet parental ou de la qualité de l'œuf (Rossiter, 1991).

L'effet maternel de la qualité de la proie a pu être déterminé sur base du changement d'espèces de proies aphidiennes. Lorsque les femelles

d'*A. bipunctata* sont nourries avec la proie optimale (*A. pisum*), la fécondité et le nombre de pontes déposées par les femelles sont les plus élevées. L'influence de la qualité des proies des mâles (*A. fabae* ou *A. pisum*) est moins déterminante même si un effet significatif sur les paramètres reproductifs est observé. L'importance de l'effet maternel a été confirmée lors de l'étude de l'influence de la plante hôte. Les oeufs et les pontes issus des couples dont la femelle a été nourrie avec *M. persicae* sur *S. alba* sont plus nombreux que les valeurs correspondant aux autres croisements (incluant *M. persicae* élevé sur *V. faba*). Cette influence positive de la plante hôte n'a pas été observée sur la viabilité des œufs. Néanmoins, ce dernier paramètre reproductif est réduit lorsque les prédateurs mâles ont été nourris avec le puceron élevé sur *S. alba*. L'utilisation de coccinelles mâles, nourries avec une proie optimale (*A. pisum*), dans les croisements n'a aucune influence favorable sur la viabilité des œufs. Des résultats similaires à la référence négative, les insectes de deux sexes nourris avec *A. fabae*, ont été observés. D'autres sources d'effets maternels liées à l'alimentation de drosophiles ont été étudiées pour leur influence sur le développement et la reproduction des insectes (Jenkins et Hoffman, 1994). Aussi, Fox *et al.* (1999) ont démontré que les femelles de *Stator pruininus* (Coleoptera : Bruchidae) élevées dans des grains fortement infestés déposent des oeufs de plus petite taille que les insectes élevés en plus faible densité. Le poids des œufs n'est pas affecté par des modifications des conditions environnementales subies par le représentant mâle du couple.

## **Conclusions**

Les expérimentations réalisées dans ce chapitre ont permis de mieux comprendre les effets biologiques des substances allélochimiques végétales sur les auxiliaires que sont les prédateurs aphidiphages. La connaissance de l'influence des glucosinolates est essentielle à la compréhension des interactions tritrophiques. La séquestration de ces molécules et l'émission des produits de dégradation (les isothiocyanates) par les pucerons leur procurent une protection vis-à-vis de leurs prédateurs. Les paramètres de développement et de reproduction des coccinelles prédatrices sont fortement influencés par la plante hôte de leurs proies. De plus, cette influence environnementale plus marquée chez les femelles peut engendrer d'importantes perturbations sur plusieurs générations de prédateurs. Les connaissances écologiques et multitrophiques acquises lors de ce chapitre illustrent la complexité des relations plantes-insectes. La mise en œuvre de programmes de lutte biologique pour contrôler les ravageurs aphidiens ne peut être envisagée de manière universelle sous peine de constater des inefficacités et de compromettre ces méthodes alternatives de lutte contre les ravageurs de cultures.



## **Chapitre 9**

### **Etude des systèmes de détoxification chez les pucerons et le prédateur en présence de substances allélochimiques**

#### ***Introduction***

La dégradation des glucosinolates par la myrosinase végétale engendre la production d'isothiocyanates (ITC) qui démontre des effets toxiques et constitue une partie de la défense de la plante contre les attaques d'insectes (Heaney et Fenwick, 1995). Certains ravageurs phytophages ont également développé des systèmes de défense pour minimiser les effets de ces molécules toxiques. Les principaux mécanismes de détoxification chez les animaux et les plantes sont l'hydrolyse, l'oxydation et la conjugaison visant à la production de composés présentant des propriétés hydrophiles pouvant être plus facilement excrétés. Les glutathion S-transférases (GST), appartenant à cette dernière catégorie, sont affectées par la présence de glucosinolates et des ITC. En effet, Egaas *et al* (1991) ont mis en évidence le rôle de ces derniers dans l'induction des GST chez les pucerons exposés à des ITC volatils. Le système de métabolisation GST présente un spectre d'activité vis à vis d'une large gamme de substrats. Cette capacité accrue de métaboliser de nombreuses substances toxiques, lorsque l'activité de ces GST est induite, implique une importante détoxification et peut mener à des résistances à de nombreuses molécules chimiques (Clark, 1990).

Les GST sont également étudiées comme modèle d'induction de l'activité des systèmes enzymatiques dans les relations plantes - insectes. En effet, les ravageurs phytophages, principalement les

espèces de Lépidoptères, présentent d'importantes activités GST qui sont corrélées à la présence de substances secondaires d'origine végétale. Les inductions de GST correspondant à des changements de plantes hôtes semblent être une adaptation physiologique non héréditaire d'une génération d'insectes à l'autre (Egaas *et al*, 1991). Alors que d'évidentes interactions ont été observées entre la présence de substances allélochimiques de plante et l'induction de l'activité des enzymes intervenant dans la métabolisation de substances xénobiotiques (XME), peu d'études ont été menées sur les XME d'espèces autres que les Lépidoptères (Yu, 1984). C'est pourquoi les expérimentations de ce chapitre visent à déterminer l'effet des substances allélochimiques des Brassicaceae sur les systèmes de détoxification des pucerons et de leur prédateur. Les activités GST des diverses espèces entomologiques étudiées sont-elles induites ? A partir de quelle concentration observe-t-on des modifications biochimiques ? En plus des composés volatils, l'influence des glucosinolates sur la biochimie des coccinelles est investiguée en mesurant l'activité GST des individus nourris avec différentes combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes mais aussi en utilisant des milieux artificiels incluant les molécules secondaires végétales.

### ***Matériel et Méthodes***

#### **Description et préparation du matériel biologique**

Les insectes qui ont été utilisés lors des études enzymatiques ont été élevés sous les mêmes conditions que celles présentées dans la partie matériel et méthodes du chapitre 6.

Les insectes sont broyés (individuellement pour les coccinelles, environ 50 mg pour les pucerons) à l'aide d'un petit broyeur de Potter dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant du tampon phosphate (pH 7,0). Les homogénats sont ensuite centrifugés à 4°C et 15000 g pendant 15 minutes en utilisant un Rotor Sigma 2K15. Un aliquote de surnageant est ajouté au tampon phosphate, à la solution de GSH et de substrat benzénique.

Les dosages biochimiques relatifs aux tests sur l'effet de la plante hôte de la proie sur les prédateurs ont été réalisés en nourrissant des coccinelles avec diverses combinaisons d'espèces de pucerons et de plante hôtes. Les pucerons se sont alimentés au moins deux semaines sur la plante hôte étudiée avant d'être utilisés comme proies des prédateurs.

*B. brassicae* et *M. persicae* ont été élevés sur les trois plantes hôtes (*V. faba*, *B. napus*, *S. alba*) pendant deux semaines avant d'être utilisés pour déterminer l'effet de la plante hôte sur l'activité GST de ces insectes phytophages.

### **Mesure de l'activité myrosinase**

La détermination de l'activité myrosinase est basée sur la mesure du taux de décroissance de l'absorbance de la sinigrine à 227 nm pendant l'hydrolyse enzymatique (Pessina et al, 1990). Le but de cette manipulation est d'évaluer semi-quantitativement l'occurrence de la myrosinase chez les insectes étudiés.

Les coccinelles et les pucerons sont broyés à l'aide d'un broyeur de Potter dans un tube à centrifuger contenant un volume d'eau distillée équivalent au double du poids de l'échantillon prélevé. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 10000 g pendant 10 minutes. La solution de sinigrine est préparée dans un tampon acétate (0,05 M et pH 5,0) à la concentration finale de 0,15 mM. Deux cents microlitres d'extrait enzymatique sont ensuite ajoutés au 1,8 ml de substrat (solution de sinigrine). La mesure de la décroissance de l'absorbance s'effectue à 30°C en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu 2100. Etant donné la forte coloration des homogénats de coccinelles, les volumes prélevés pour l'analyse de ces échantillons étaient de 100 µl d'extrait pour 2,9 ml de substrat.

#### **Mesure de l'activité glutathion S-transférases et dosage des protéines totales**

L'activité GST a été déterminée suivant le protocole décrit par Habig *et al.* (1974) en utilisant un tampon phosphate 20mM (pH 7,0) contenant une concentration finale de 0,25% en éthanol. Le substrat benzénique (soit le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), le 2,4-dinitro-1-iodobenzene (DNIB), le 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) et le glutathion réduit (GSH) ont été utilisés à une concentration finale respectivement de 0,5 mM et 1 mM. La concentration en protéines des homogénats a été déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951). Une série de dilutions d'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisée afin d'établir la courbe étalon qui fournit les valeurs d'absorption. Un spectrophotomètre Shimadzu UV-160A a été utilisé pour les mesures d'activité enzymatique et de

dosage des protéines. Le CDNB, le DNIB et le DCNB proviennent de chez Fluka Chemical ou Merck-Belgolabo.

### **Tests biologiques sur diètes artificielles**

Des diètes artificielles (solution de 10% de sucrose) contenant des doses croissantes de sinigrine ont été utilisées pour nourrir les pucerons durant une semaine. De nouvelles solutions de sinigrine sont préparées chaque jour. Un système constitué d'un cylindre en verre (3 cm de hauteur x 2cm de diamètre) dont l'extrémité ouverte est obturée par un double film de parafilm étendu contenant la diète liquide a été utilisée. Vingt pucerons ont été utilisés par tube, cinq répétitions ont été réalisées pour chaque dose de glucosinolate de la diète.

Des diètes artificielles pour coccinelles ont également été préparées à base de sucrose, de poudre de foie, de levure, d'agar et d'eau suivant une recette de Majerus (com. pers.). Des adultes d'*A. bipunctata* ont été nourris quotidiennement durant 6 jours avec des cubes de diètes de 5mm de côtés dans des boîtes de Pétri de 5cm de diamètre. Des séries de vingt coccinelles par traitement ont été nourries avec une diète témoin alors que des concentrations entre 0,1 et 0,5% en substances allélochimiques (GLS ou ITC) ont été introduites afin de déterminer leur effet sur l'activité GST. Trois molécules (le benzopyrène, le méthylecholanthrène et le phénobarbital) connues pour leur rôle d'inducteur d'activité GST (Mannervik, 1985) ont été également testées dans cette manipulation comme témoins positifs.

### **Expositions des coccinelles aux substances volatiles pures**

Le but de cette manipulation est d'exposer des adultes d'*A. bipunctata* à différentes concentrations en isothiocyanates, produits de dégradation des glucosinolates. Dans ce cas, l'impact des composés volatils émis naturellement par les plantes sur le système glutathion S-transférases est étudié. Vingt coccinelles par test sont exposées aux ITC dans des enceintes hermétiques d'un volume de 800 ml. Des solutions éthanoliques d'allyle- et de méthyle-ITC sont préparées afin d'exposer les insectes à une gamme de 0,01 à 0,50 ppm de la molécule testée. Le benzyle-ITC utilisé jusqu'à présent a été remplacé par le méthyle-ITC en raison de sa trop faible volatilité. Dix microlitres de ces solutions (ou d'éthanol pur pour le témoin) sont déposés dans l'enceinte hermétique. Les activités GST des coccinelles sont ensuite mesurées après 24 heures d'exposition.

### **Mise en évidence du rôle inducteur de l'activité glutathion S-transférase des substances allélochimiques**

Afin de confirmer le rôle inducteur, et non d'activateur, des molécules allélochimiques de plantes de Brassicaceae, les substances secondaires (des concentrations de 0,1 à 1 mM de sinigrine, d'allyle- et de benzyle-ITC) ont été ajoutées individuellement dans la solution tamponnée utilisée pour mesurer l'activité GST des insectes issus des traitements des divers tests envisagés.

### **Traitements statistiques**

Les résultats des mesures d'activité enzymatique ont été traités en effectuant des analyses de la variance (ANOVA) suivies par des

comparaisons de moyennes suivant la méthode de Tukey. Les moyennes de l'activité des glutathion S-transférases sont calculées sur base d'au moins dix mesures spectrophotométriques. Le logiciel MINITAB (vs 11.2) a été utilisé pour le traitement statistique des données.

## Résultats

### Mise en évidence de l'activité myrosinase chez les pucerons et la coccinelle

Une forte activité myrosinase a été observée chez le puceron *B. brassicae* (Figure 25a). Par contre, aucune activité enzymatique n'a pu être détectée chez *M. persicae* et *A. bipunctata* (Figure 25b et c).

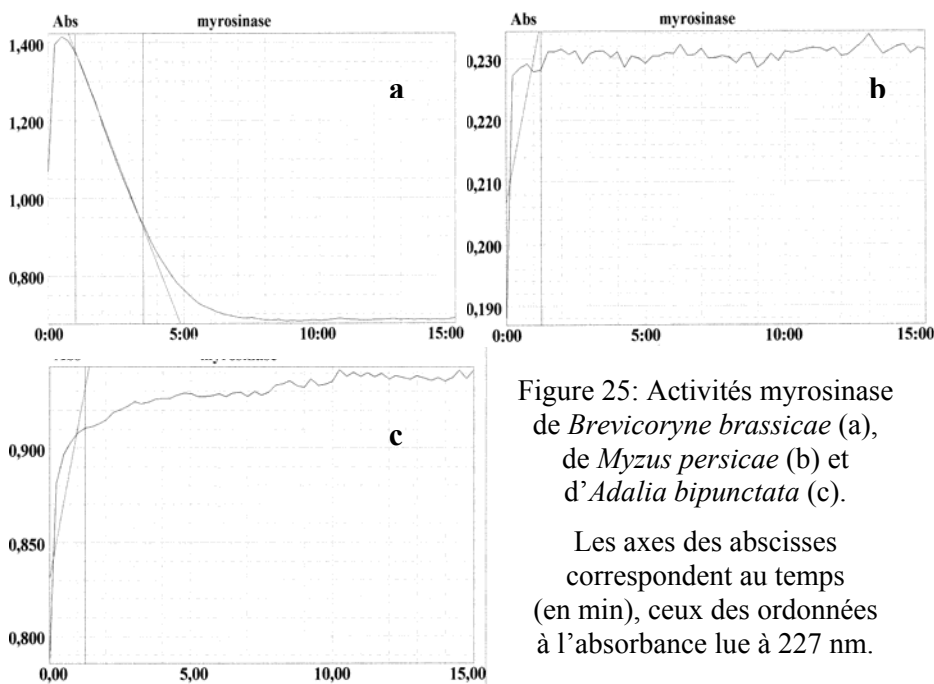


Figure 25: Activités myrosinase de *Brevicoryne brassicae* (a), de *Myzus persicae* (b) et d'*Adalia bipunctata* (c).

Les axes des abscisses correspondent au temps (en min), ceux des ordonnées à l'absorbance lue à 227 nm.

L'absence d'activité myrosinase lors de l'analyse de *M. persicae* inféodé à une Brassicaceae permet de conclure à la nature endogène de la myrosinase chez *B. brassicae*.

### Etude de l'activité glutathion S-transférase chez les pucerons

L'activité GST de *M. persicae* augmente en fonction de la teneur en glucosinolates de la plante hôte (Figure 26). L'activité enzymatique de ce puceron élevé sur *S. alba* est significativement différente de celles correspondant à *V. faba* et *B. napus* (respectivement  $t = 3,12$  et  $P = 0,005$ ;  $t = 2,39$  et  $P = 0,027$ ). Par contre, la comparaison des résultats relatifs à *M. persicae* ayant colonisé *B. napus* et *V. faba* ne révèle aucune différence significative ( $t = 0,91$  et  $P = 0,258$ ). Enfin, les activités enzymatiques de *B. brassicae* inféodé aux deux espèces de Brassicaceae ne sont pas significativement différentes ( $F = 0,46$  et  $P = 0,505$ ).

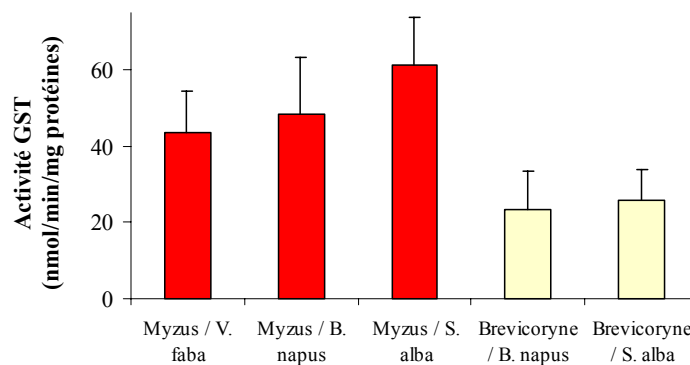


Figure 26 : Variation de l'activité glutathion S-transférases des espèces de pucerons, *Myzus persicae* et *Brevicoryne brassicae* en fonction de la plante hôte

Si on compare les activités GST des deux pucerons inféodés à la même plante hôte, les mesures effectuées chez *B. brassicae* sont significativement inférieures à celles réalisées chez *M. persicae* ( $F = 140,83$  et  $P < 0,001$ ;  $F = 27,87$  et  $P < 0,001$  respectivement pour *S. alba* et *B. napus*).



L'effet des glucosinolates sur l'activité GST de *M. persicae* a été confirmé par l'utilisation de diètes artificielles contenant de la sinigrine (Figure 27). Des différences significatives d'activités enzymatiques ont été observées entre les pucerons nourris avec la diète témoin et celles contenant 0,1 et 0,5% de sinigrine ( $F = 19,74$  et  $P = 0,019$ ). Les activités GST de *M. persicae* nourri avec les différentes diètes sont significativement différentes les unes des autres aussi bien avec le CDNB qu'avec le DNIB ( $13,14 < t < 6,45$  et  $0,024 < P < 0,049$ ).

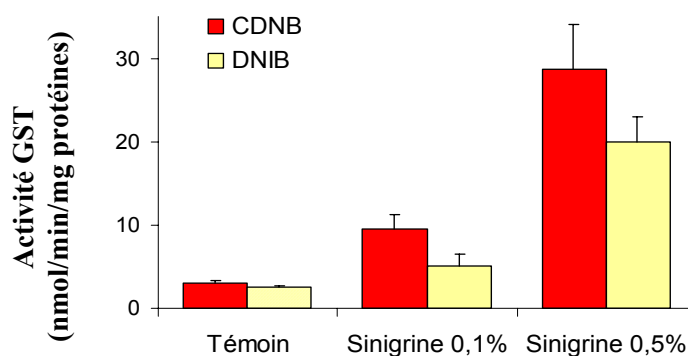


Figure 27 : Activités glutathion S-transférases de *Myzus persicae* nourri avec des diètes artificielles contenant de la sinigrine

### Détermination de l'activité glutathion S-transférase chez *Adalia bipunctata*

Chez la coccinelle, l'activité GST augmente également en fonction de la teneur en glucosinolates de la plante hôte de pucerons (Figure 28). *B. brassicae* élevé sur *S. alba* et *B. napus* engendre de fortes augmentations d'activité enzymatique chez *A. bipunctata*. Des résultats identiques sont observés avec *M. persicae*. Les activités GST des coccinelles nourries avec *M. persicae* élevé sur *S. alba* et sur *B. napus*; *M. persicae* élevé sur *V. faba* et sur *B. napus*; *M. persicae*

élevé sur *V. faba* et sur *S. alba* se révèlent toutes significativement différentes les unes des autres (respectivement  $t = 3,47$  et  $P = 0,001$ ;  $t = 5,54$  et  $P < 0,001$ ;  $t = 2,58$  et  $P = 0,016$ ).

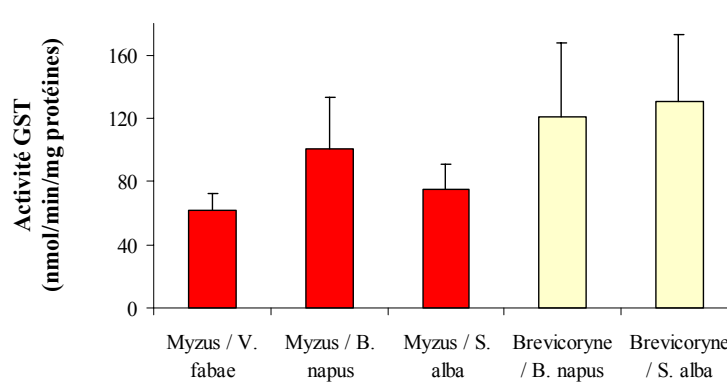


Figure 28 : Variation de l'activité glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* en fonction des combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes

Si on compare les activités d'*A. bipunctata* nourrie avec les deux pucerons inféodés à la même plante, aucune différence significative n'est observée dans le cas du colza ( $F = 2,08$  et  $P = 0,154$ ) alors que les mesures d'activité pour les coccinelles nourries avec *B. brassicae* sont supérieures à celles des prédateurs nourris avec *M. persicae* élevé sur *S. alba* ( $F = 22,60$  et  $P < 0,001$ ).

### Exposition des coccinelles aux substances allélochimiques pures

Des activités croissantes de GST ont été observées lorsque la concentration en ITC augmente lors de l'exposition des coccinelles aux substances volatiles (Figure 29). Des différences significatives d'activités enzymatiques ont été observées lorsque les coccinelles ont été exposées à l'allyle-ITC ( $F = 5,18$  et  $P < 0,001$ ). Les activités GST correspondant aux doses de 0,03 et 0,5 ppm sont significativement supérieures au autres concentrations (respectivement  $t = 4,22$  et  $P$

< 0,001 ; t = 3,80 et P = 0,004). L'activité GST d'*A. bipunctata* a été significativement affectée lors de l'exposition des coccinelles au méthyle-ITC (F = 6,41 et P< 0,001). L'activité enzymatique des prédateurs est significativement accrue à de 0,04 à 0,5 ppm de MITC ( $3,41 < t < 5,05$  et  $0,014 < P < 0,001$ ).

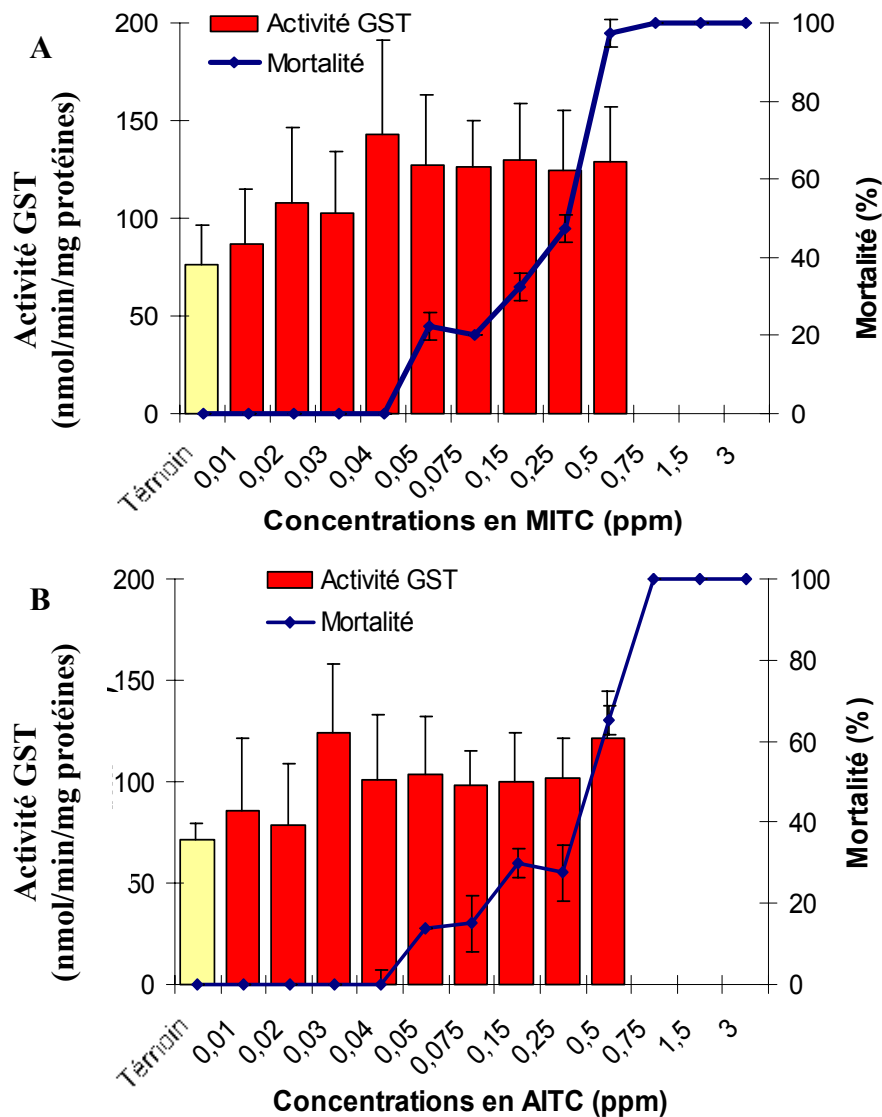


Figure 29 : Activités glutathion S-transférases d'adultes d'*Adalia bipunctata* exposés à une série de concentrations en MITC (A) et AITC (B)

Alors que les augmentations d'activités enzymatiques sont observées à partir de concentrations très faibles en ITC (0,01 ppm), un niveau constant d'activité GST est obtenu à partir de 0,25 ppm. Lorsque cette activité limite d'enzyme est atteinte, l'augmentation des concentrations en ITC provoque l'apparition de mortalités significatives. A partir de la dose de 0,5 ppm d'ITC, les taux de survie deviennent très faibles (inférieurs à 15%).

### Détermination du rôle inducteur des substances allélochimiques pour l'activité glutathion S-transférase des coccinelles

L'ajout d'une concentration variable de trois molécules secondaires de Brassicaceae dans le tampon de réaction n'a pas d'effet activateur sur les GST de coccinelle (Figure 30). Au contraire, une inhibition de l'activité GST a été observée lorsqu'un ITC est présent dans le tampon. Aucune variation significative d'activité enzymatique par rapport à celles relatives aux taux de 0,1mM n'a été observée lorsque des concentrations de 0,5 et 1 mM ont été testées pour chacune des trois substances.

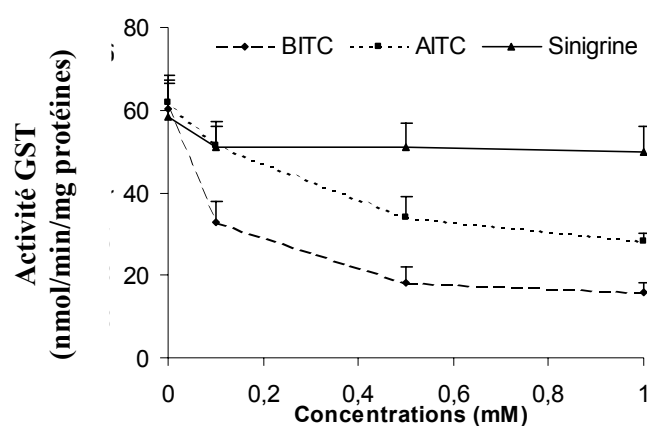


Figure 30 : Variation de l'activité GST d'*Adalia bipunctata* en présence de substances allélochimiques dans le tampon de réaction.

### Tests biologiques sur diètes artificielles

Le rôle inducteur des substances allélochimiques a été observé chez la coccinelle (Figure 31). Les activités GST de la coccinelle envers le CDNB sont significativement induites lorsqu'au moins une des substances (un des ITC ou la sinigrine) a été ajoutée à la diète ( $F = 4,75$  et  $P = 0,007$ ). Seule l'activité enzymatique relative à la présence du BITC dans la nourriture d'*A. bipunctata* est significativement supérieure envers le CDNB à celle du témoin ( $t = 3,61$  et  $P = 0,005$ ). Aucune différence significative d'activité GST envers le DNIB n'a été observée quelle que soit la substance ajoutée à la diète de coccinelle ( $F = 2,17$  et  $P = 0,110$ ).

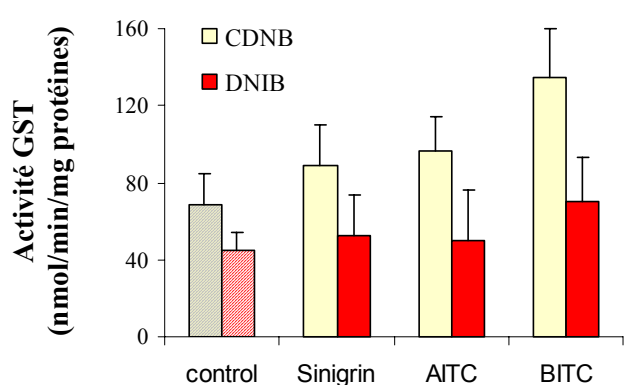


Figure 31: Activités glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* nourrie avec des diètes artificielles incluant 0.2% de sinigrine, allyle- ou benzyle-ITC.

Afin d'évaluer la réponse enzymatique face à des teneurs croissantes en ITC, du benzyle-ITC a été ajouté à la diète artificielle (Figure 32). Une augmentation significative d'activité GST chez *A. bipunctata* a été observée envers le CDNB ( $F = 3,83$  et  $P = 0,024$ ) et le DNIB ( $F = 3,44$  et  $P = 0,034$ ) lorsque le BITC a été ajouté à la diète. Les activités enzymatiques des coccinelles nourries avec des doses

supérieures à 0,1% de BITC sont significativement supérieures envers le CDNB à celle du témoin ( $2,91 < t < 3,13$  et  $0,043 < P < 0,023$ ). Seule la dose de 0,3% de BITC engendre une activité GST envers le DNIB significativement supérieure aux autres ( $t = 3,20$  et  $P = 0,019$ ). La mortalité des coccinelles, de 9% à la dose de 0,2%, dépasse les 80% à la concentration de 0,5% de BITC. L'allyle-ITC provoque des taux de mortalité élevés, 58% à la dose de 0,2% de la diète, et 100% dès la concentration suivante. Dès lors, il n'a pas été possible de mesurer l'activité GST des prédateurs nourris avec les teneurs supérieures en AITC.

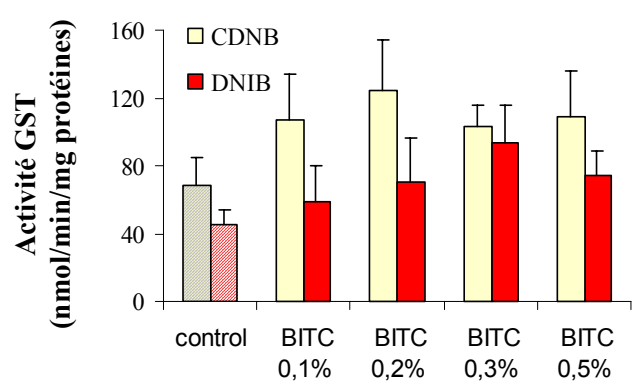


Figure 32 : Activités glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* nourrie avec des diètes artificielles incluant le benzyle-ITC. Les barres d'erreur représentent les écarts types par rapport à la moyenne.

### **Discussions**

L'adaptation de l'entomofaune aux moyens de défense développés par la plante implique des changements comportementaux, physiologiques ou biochimiques (Harborne, 1993). La métabolisation de substances secondaires végétales par les insectes implique différents systèmes de détoxification. Lors de l'étude qualitative de la myrosinase chez les

espèces entomologiques, seul le puceron spécialiste *B. brassicae* a développé le mécanisme basé sur la présence d'une thioglucosidase afin de métaboliser les glucosinolates de la plante hôte. L'autre homoptère et le prédateur généraliste ont développé un autre système, celui des glutathion S-transférases.

L'effet des substances d'origine végétale sur la physiologie et le métabolisme des insectes a été démontré lors de l'étude de l'activité GST chez le puceron *M. persicae* et chez la coccinelle à deux points. Une augmentation de l'activité enzymatique en fonction de la teneur en GLS de la plante hôte et dans des diètes artificielles a été confirmée. Dans un tout autre domaine, des études basées sur l'alimentation de rats avec différentes quantités de Brassicaceae avaient permis d'établir une relation linéaire entre la quantité de choux dans la ration alimentaire et l'induction enzymatique. L'augmentation de l'activité GST totale du foie de rat s'échelonnait de 15% (2.5% de choux dans la ration) à 180% (30% de la ration) (Bogaards *et al*, 1990).

L'induction de l'activité GST a aussi été observée au niveau trophique supérieur, chez le prédateur aphidiphage. *B. brassicae* induit des augmentations d'activités enzymatiques plus importantes que celles obtenues lorsque *M. persicae* est utilisé comme proie des coccinelles. Ces observations se répètent quelle que soit la plante hôte utilisée, *B. napus* ou *S. alba*, même si les activités GST sont supérieures avec cette dernière espèce végétale. Le rôle d'inducteur d'un GLS et de deux ITC a été confirmé en utilisant des diètes artificielles et en

exposant les coccinelles aux molécules volatiles. Yu (1982) démontra les propriétés inductrices de GST de la sinigrine et du phényléthyle-ITC chez *Spodoptera frugiperda*. Des résultats identiques ont été observés chez *S. frugiperda* lorsqu'il est élevé sur des Brassicaceae (Yu, 1982).

Généralement, les plantes des familles de Brassicaceae et d'Apiaceae sont inductrices de l'activité GST. Le chou, le radis et la moutarde induisent les GST chez certains Lépidoptères (Yu, 1984). Si le fait de constater l'influence de la plante hôte sur les ravageurs qui la colonisent semble logique, l'impact des molécules secondaires végétales sur le métabolisme des prédateurs est nettement moins apparent. Les substances ingérées par les pucerons (identifiées au chapitre 7) modifient considérablement la physiologie des coccinelles aphidiphages. La détermination précise de la nature des inducteurs a été approfondie : les ITC présentent une action inductrice de GST supérieure au GLS testé.

### **Conclusions : Ebauche d'un modèle évolutif**

Les résultats de l'étude des systèmes de détoxification chez les pucerons et le prédateur en présence de substances allélochimiques permettent d'établir un modèle évolutif des différents protagonistes auxquels nous nous sommes intéressés (Figure 33).

Les Brassicaceae possèdent des taux variables de GLS selon l'espèce envisagée. Conjointement à la présence de ces glucosides, les plantes possèdent une myrosinase qui catalyse la dégradation des GLS en ITC



lorsque la plante subit des agressions, notamment des attaques par les pucerons. Ces molécules volatiles montrent des effets sémiachimiques pour bon nombre d'espèces entomologiques. La production de ces substances allélochimiques constitue un mécanisme de défense de la plante face aux attaques des ravageurs phytophages. Pour faire face à la présence de ces substances secondaires de Brassicaceae, deux types de réponses ont été développés par les pucerons. D'un côté, l'espèce généraliste *M. persicae* présente des augmentations d'activités enzymatiques du système de détoxication GST, de l'autre, le spécialiste de crucifères, *B. brassicae*, possède le système myrosinase.

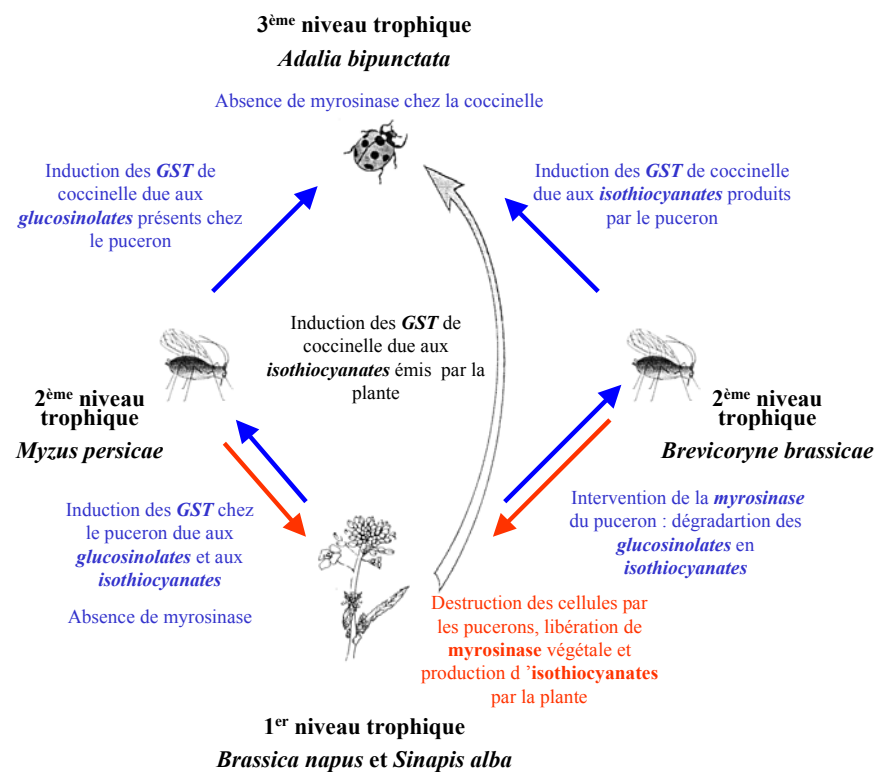


Figure 33 : Schéma du modèle présentant la co-évolution de la plante, des pucerons *Myzus persicae* et *Brevicoryne brassicae* et de la coccinelle *Adalia bipunctata*

L'augmentation des quantités de GST chez *M. persicae* lui permet de détoxiquer les glucosinolates, de les métaboliser et de les excréter par le miellat qu'il produit en grande quantité (voir analyses au chapitre 7). L'autre espèce aphidienne considérée, *B. brassicae*, accumule les glucosinolates. Lorsque le puceron subit des attaques du prédateur, ces molécules entre en contact avec la myrosinase que *B. brassicae* synthétise et sont dégradées en isothiocyanates. Le puceron développe un système de défense identique à celui de ses plantes hôtes, les Brassicaceae, afin de faire face aux insectes aphidiphages. Peu de miellat est retrouvé sur les surfaces foliaires des plantes colonisées par cette espèce de puceron.

Au niveau trophique supérieur, le prédateur aphidiphage s'est également adapté à la présence des molécules secondaires végétales en présence. *A. bipunctata* produit également des quantités accrues de glutathion S-transférases lorsqu'elle ingère des GLS ou est en présence d'ITC. La coccinelle ne possède cependant pas le système myrosinase catalysant la dégradation des GLS en produits volatiles. L'interprétation des paramètres biologiques observés au chapitre 8, lors de l'alimentation des coccinelles avec les différentes combinaisons d'espèces de puceron et de plante hôte peut être réalisée plus précisément. En effet, la présence de la myrosinase chez *B. brassicae* permet d'expliquer l'effet toxique important correspondant aux observations relatives à l'alimentation d'*A. bipunctata* avec ce puceron élevé sur *B. napus* ou *S. alba*. La production d'ITC par le puceron accentue sa toxicité vis-à-vis des

prédateurs. La mortalité et l'allongement de la durée de développement d'*A. bipunctata* sont proportionnels au taux de GLS de la plante et donc à la quantité d'ITC produits. *M. persicae* qui ne possède pas la myrosinase n'induit pas d'effets négatifs sur le développement de son prédateur. Au contraire, les glucosinolates ingérés par le puceron semblent être responsables de la réduction du cycle de développement de la coccinelle.

## **Chapitre 10**

### **Purification et caractérisation d'une myrosinase chez le puceron *Brevicoryne brassicae***

#### ***Introduction***

L'hydrolyse des glucosinolates notamment en isothiocyanates est catalysée par des myrosinases. Le système glucosinolate - myrosinase est un moyen de défense de la plante à deux composantes qui est activé lorsque les tissus végétaux sont endommagés (Birch et al., 1990). Pour faire face aux substances volatiles toxiques émises par la plante hôte, les insectes inféodés aux espèces de Brassicaceae ont développé des adaptations biochimiques : soit des inductions du système glutathion S-transférases, soit la présence du système myrosinase comme chez certains végétaux. Chez le puceron cendré du chou, *B. brassicae*, spécialiste de Brassicaceae, aucune induction de GST n'a été détectée mais l'autre moyen de métabolisation des GLS a été identifié (voir chapitre 9). Si des myrosinases végétales comme celles de *S. alba* (Björkman et Janson, 1972; Palmieri et al., 1986), de *B. napus* (Lonnerdal et Janson, 1972) et de *Rhaphanus sativus* (Shikita et al., 1999) ont été purifiées et caractérisées, peu d'études ont été réalisées sur les enzymes thioglucosidases d'origine animale.

La présence de myrosinase chez les arthropodes phytophages est une caractéristique intéressante de la co-évolution entre la plante et l'insecte phytophage. En effet, le puceron cendré du chou ne développe pas d'adaptation classique telle que l'augmentation de l'activité GST observée chez les insectes ravageurs généralistes. Plus qu'un moyen de métabolisation des GLS, cette espèce aphidienne a

évolué comme ses plantes hôtes en initiant le système de défense glucosinolate-myrosinase contre ses ennemis naturels par l'utilisation des substances allélochimiques de la plante. Des taux de mortalité élevés et l'allongement de la durée de développement ont été observés chez la coccinelle aphidiphage, *A. bipunctata* (voir chapitre 8) et le syrphe, *Episyrphus balteatus* lorsque ces derniers ont été alimentés de *B. brassicae* élevés sur des plantes de Brassicaceae (Vanhaelen et al., 2002).

Dans ce chapitre, nous détaillerons la purification de la myrosinase du puceron cendré du chou, *B. brassicae*, en trois étapes: une précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie sur DEAE et d'une filtration sur gel. Les fractions présentant une forte activité myrosinase ont été utilisées pour réaliser l'étude de métabolisation de huit glucosinolates purs. Après avoir calculé les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_m$  pour chaque substrat, l'identification et la quantification des produits de dégradation ont été réalisés respectivement par GC-MS et GC-FID. Les paramètres cinétiques et les hydrolyses catalysées par la myrosinase sont discutés en relation avec l'adaptation potentielle de *B. brassicae* aux plantes hôtes.

## **Matériel et Méthodes**

### **Produits et réactifs**

Les glucosinolates purs (glucoprogoitrine, glucoérucine, gluconapine, épiprogoitrine, glucotropaéoline, sinalbine et glucoraphénine) utilisés lors de ces expérimentations ont été fournis par le Dr. Iori (Istituto sperimentale per le colture industriali, Bologna, Italy). Ils ont été

isolés et purifiés à partir de graines les contenant : respectivement *Brassica napus* L. cv Jet Neuf, *Eruca sativa* L., *B. napa* L. cv Silla, *Crambe abyssinica* L., *Lepidium sativum* L., *Sinapis alba* L. et *Raphanus sativus* L.). La sinigrine a été fournie par Sigma (St.Louis-USA). La diéthylaminoéthyle (DEAE), le sulfate d'ammonium et le kit de dosage de protéines ont été acquis respectivement chez V.W.R. et Biorad. La colonne Superdex 200 (matrice d'agarose et de dextran, particules de 13µm, séparation  $M_r$   $10^4$ - $6.10^5$ ) et les autres réactifs ont été obtenus chez Pharmacia (Uppsala, Sweden).

### **Culture des plantes et élevage des pucerons**

La moutarde blanche (*S. alba*) a été cultivée en serre dans des pots en plastique contenant du compost ordinaire. Les plantes sont transférées au laboratoire lorsqu'elles ont atteint le stade 6-7 vraies feuilles et sont alors inoculées de pucerons. *B. brassicae* est élevé en chambre conditionnée à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  et 16 h de photopériode depuis plusieurs années sur moutarde et colza.

### **Purification d'enzyme**

Les pucerons entiers sont broyés dans un tampon phosphate 20mM et pH 7,0. L'homogénat est ensuite ultracentrifugé pendant 1h30 à 100000g. La précipitation au sulfate d'ammonium est réalisée en utilisant le surnageant afin d'obtenir les fractions correspondant à des niveaux de saturation en sel de 40 à 65%. Les protéines précipitées sont resuspendues dans le tampon phosphate. Les fractions présentant une activité myrosinase élevée sont dialysées pendant 24 h contre 500 volumes de tampon Tris-HCl 10 mM et pH 8,0 pour éliminer le

sulfate d'ammonium. Le dialysat est ensuite filtré (sur un filtre Millipore à 45 $\mu$ m) et appliqué sur une colonne DEAE-650 Fractogel de 1,6 cm x 40,0 cm (V.W.R.) préalablement équilibrée avec un tampon Tris-HCl 10 mM et pH 8,0. L'enzyme myrosinase est séparé en utilisant un gradient de 0-250 mM NaCl dans un tampon Tris à 10mM et pH 8,0 à un débit de 0,25 ml/min assuré par une pompe péristaltique. Des volumes de 2,5 ml sont collectés. Les fractions à forte activité myrosinase sont de nouveau dialysées contre un tampon Tris-HCl pendant 24 h et ensuite déposées sur une colonne HiLoad (16mm de diamètre intérieur x 60 mm de haut) de Superdex 200 (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le même tampon. L'élution a été réalisée en utilisant un système FPLC constitué d'un Chromatography Rack II (Pharmacia), d'un programmeur de gradient GP-250 Plus, d'un collecteur de fractions FRAC-200, de deux pompes P-500 et d'un moniteur UV-M. Un contrôleur de chromatographie LCC-500 Plus a été utilisé pour gérer le système FPLC réglé à un débit de 0,5 ml/min de 10 mM de tampon Tris pH 8,0. Des fractions de 1ml ont été collectées.

### **Mesure de l'activité myrosinase et dosage des protéines totales**

L'activité myrosinase a été mesurée en suivant l'hydrolyse d'une solution de 0.2 mM de sinigrine dans un tampon phosphate à 20 mM et pH 7,0 à 30°C et à 227 nm. Des conditions identiques ont été maintenues pour l'étude des sept autres substrats. L'activité a été mesurée pendant 3 minutes en utilisant un volume de réaction de 3 ml et calculée en appliquant la formule de Pessina et al. (1990). Une unité enzymatique correspond à 1  $\mu$ mol de substrat hydrolysé par minute.

La concentration en protéines des échantillons a été déterminée par la méthode de Lowry et al. (1951). Différentes dilutions de BSA ont été utilisées pour établir une courbe étalon. Un spectrophotomètre Shimadzu UV-160A a été utilisé pour la mesure des activités enzymatiques et le dosage protéinique.

### **Détermination des paramètres cinétiques envers différents substrats**

Les cinétiques enzymatiques de la myrosinase purifiée de *B. brassicae* ont été déterminées en suivant l'activité envers une série de concentrations (allant de 0,01 à 0,1 mM) de huit glucosinolates. La vitesse maximale  $V_m$  et la constante de Michaelis  $K_m$  ont été déterminées pour chaque substrat par la méthode de Lineweaver-Burk.

### **Electrophorèse PAGE en conditions dénaturantes**

Pour réaliser les électrophorèses en SDS-PAGE, les échantillons sont dilués à raison de 1:4 (v:v) dans une solution de 1% SDS; de 0,02% bromophenol; de 1%  $\beta$ -mercaptoethanol dans le tampon de migration et sont dénaturés dans l'eau bouillante durant 3 minutes avant électrophorèse. Le gel de séparation est composé de 12% d'acrylamide / de 0,01% de SDS dans 0,5M de Tris-HCl à pH 8,8. Le gel de concentration est composé de 3,5% d'acrylamide dans 1,5M de Tris-HCl à pH 6,8. La solution de Laemmli (Laemmli, 1970) est utilisée. Le tampon de migration 10x est constitué de 2M-glycine / 0,1% de SDS / 0,4M de Tris à pH 8,3. Les électrophorèses sont réalisées à 45 V et 20 mA durant une nuit dans un système vertical de



type Hoeffler. Les gels sont colorés avec une solution 0,25% de bleu brillant de Coomassie, 40% de méthanol et 10% d'acide acétique.

### **Quantification des produits de dégradation des substrats utilisés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

Les hydrolyses sont réalisées comme suit : 100 µl d'extrait enzymatique (myrosinase d'origine végétale de *S. alba*, ou homogénat de pucerons *B. brassicae* après centrifugation 15 minutes à 15000g et de la myrosinase purifiée à partir de pucerons à raison de 0,35 U/ml) sont ajoutés à 2 ml d'une solution à 1 mM de chaque substrat dans 20 mM de tampon phosphate à pH 7,0. Après 1h de réaction à  $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  et après avoir injecté 100 µl d'une solution éthanolique de phénéthyle-ITC (comme étalon interne à 2 mg/ml), les mélanges aqueux ont été extraits avec 500 µl d'éther diéthylique exempt de peroxydes pendant 1 heure à température ambiante.

Afin d'identifier les produits d'hydrolyse, les solutions ont été analysées par GC-MS sur un spectromètre de masse Hewlett-Packard HP5972 couplé à un chromatographe en phase gazeuse HP5890 series II et leurs quantifications ont été réalisées par GC-FID au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse HP6890. Les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées : les molécules d'intérêt ont été séparées sur une colonne HP5-MS (5% phényle-diméthylepolysiloxane) (30m x 0,25mm, df=1µm); le programme de température variait de 40°C (pendant 1 min) à 180°C par progression de 6°C.min<sup>-1</sup> et ensuite jusqu'à 280°C à 15°C.min<sup>-1</sup> ; une injection de

type split-splitless à 250°C (mode splitless); le gaz vecteur : He à 1.4 ml.min<sup>-1</sup> (vitesse linéaire moyenne: 33 cm.sec<sup>-1</sup>). Le spectre MS a été obtenu en mode EI à 70eV (gamme de masse scannée de 30 à 400 amu). Les analytes ont été identifiés sur base de leurs temps de rétention et par interprétation des fragmentations. Les spectres enregistrés ont finalement été comparés à ceux de la bibliothèque spectrale Wiley275.L et aux données obtenues par analyses MS des isothiocyanates de référence. Pour les mesures en GC-FID, le détecteur a été maintenu à 250°C.

## Résultats

### Précipitation des protéines au moyen de sulfate d'ammonium

La myrosinase du puceron du chou a été purifiée par une procédure en trois étapes (Tableau 12). Plus de 70% de l'activité myrosinase totale sont retrouvés dans les fractions 45-50 et 50-55% de la précipitation au sulfate d'ammonium (Figure 34). Ces dernières sont regroupées afin de poursuivre la procédure de purification.

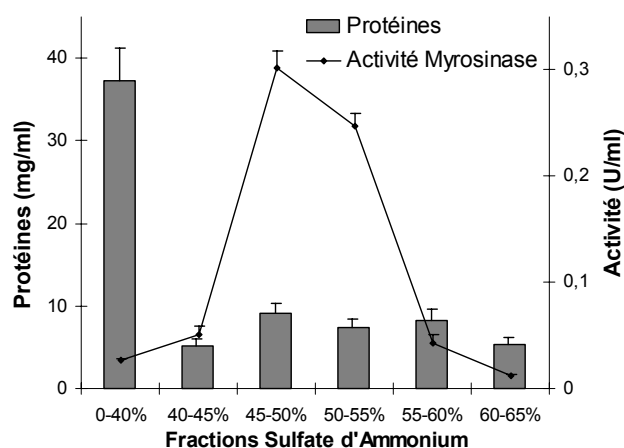


Figure 34 : Précipitation des protéines d'un homogénat de *Brevicoryne brassicae* en utilisant une concentration croissante en sulfate d'ammonium.

Tableau 12 : Purification de la myrosinase du puceron *Brevicoryne brassicae*

<b><i>Etapes de Purification</i></b>	<b><i>Protéines (mg / ml)</i></b>	<b><i>Activité spécifique (U/ mg)</i></b>	<b><i>Rendement (%)</i></b>	<b><i>Facteur de purification</i></b>
Homogénat	13,18 ± 0,09	0,009 ± 0,000	100,0	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,28 ± 0,85	0,033 ± 0,001	74,2	3,7
Dialyse	2,23 ± 0,09	0,059 ± 0,004	65,1	6,5
DEAE	0,58 ± 0,02	1,041 ± 0,062	40,6	115,6
Superdex	0,11 ± 0,00	0,982 ± 0,024	31,5	109,2

### **Chromatographies de filtration sur gel (DEAE et Superdex 200)**

Le profil d'élution des fractions regroupées de l'étape précédente, après avoir été dialysées, sur la colonne de DEAE ne présente qu'un pic d'activité myrosinase (Figure 35A). La filtration sur gel au moyen d'une colonne Superdex 200 n'a pas amélioré le taux de purification mais a confirmé la pureté de l'enzyme purifié et a permis de déterminer le poids moléculaire de la myrosinase : un seul pic à 120 kDa a été observé (Figure 35B).

### **Technique d'électrophorèse PAGE**

L'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes de la protéine a révélé la présence d'une bande unique à 60 kDa, indiquant que la myrosinase native de *B. brassicae* est un dimère (Figure 36).

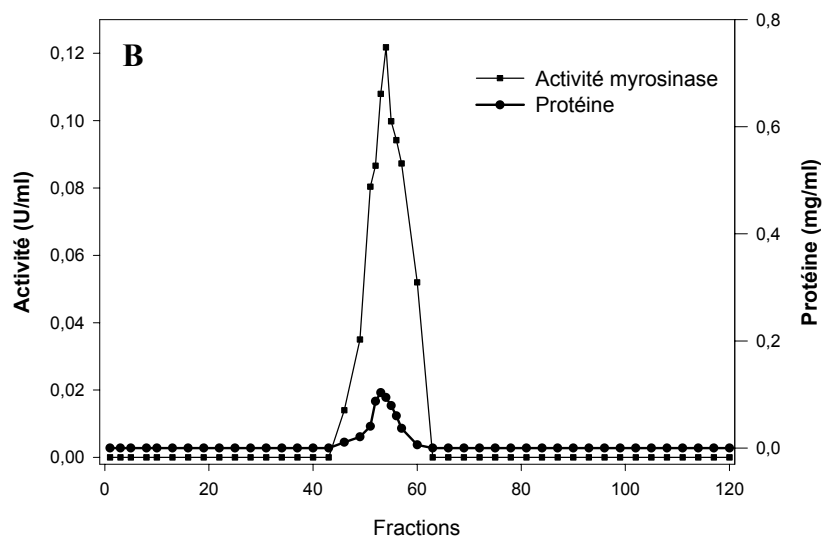
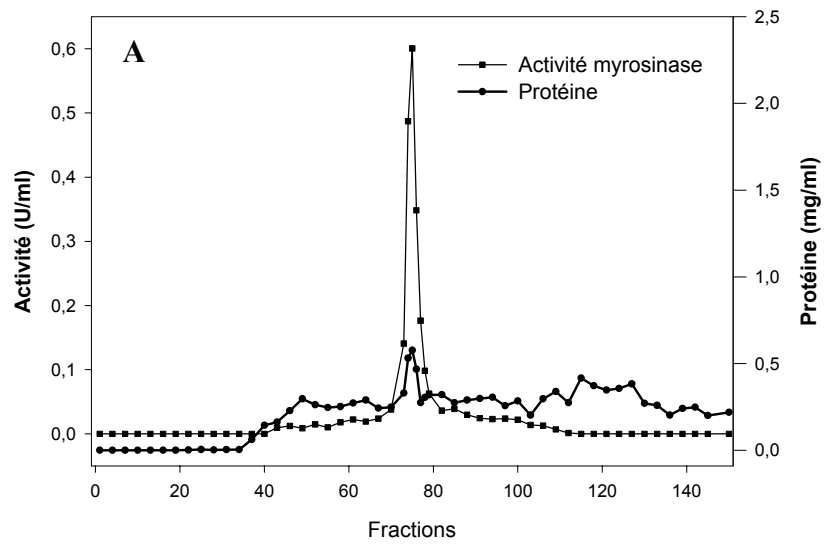


Figure 35 : Profils d'élution de la myrosinase de *Brevicoryne brassicae* sur une colonne DEAE (A) suivi par l'élution sur une colonne Superdex 200 (B).

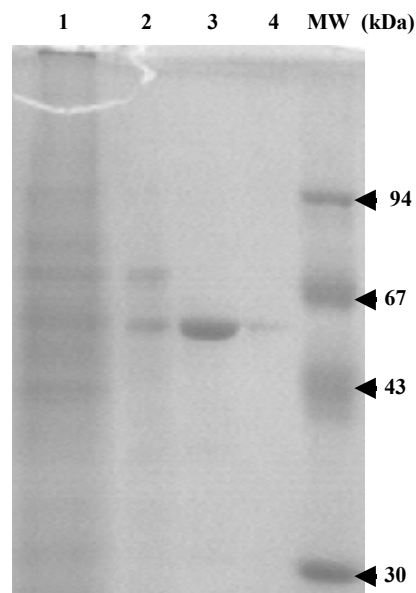


Figure 36 : gel SDS-PAGE de la myrosinase purifiée de *Brevicoryne brassicae* après la chromatographie sur DEAE

Les fractions actives après sulfate d'ammonium et dialyse (ligne 1) sont suivies par les fractions actives après DEAE (fractions 74, 76 et 77 respectivement aux lignes 2-4) et le marqueur moléculaire.

### Détermination des paramètres cinétiques vis-à-vis de différents glucosinolates

Les constantes cinétiques et les activités spécifiques de la myrosinase purifiée chez le puceron sont présentées au Tableau 13. Les taux d'hydrolyse de chaque glucosinolate sont présentés à la Figure 37 comme déterminés par la méthode de Lineweaver-Burk. L'enzyme purifié hydrolyse la gluconapine, la glucoraphénine et la sinigrine avec un  $V_{\max}$  de l'ordre de 1 U/mg de protéine. Seul le  $V_{\max}$  de la glucoérucine est supérieur (facteur 1,5). Les quatre autres substrats, la progoitrine, la glucotropaéoline, la sinalbine et l'épiprogoitrine, correspondent à des  $V_{\max}$  bien inférieurs (facteurs 3 à 50). Les constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) sont aussi très variables en

fonction du glucosinolate testé. La valeur de  $K_m$  pour la sinigrine est de 0,359 mM et est de deux à sept fois supérieure à celle des autres substrats. Seule la constante de la glucoraphénine est supérieure (facteur 1,5).

Tableau 13 : Paramètres cinétiques et activités spécifiques correspondant à huit glucosinolates, déterminés avec la myrosinase purifiée de *Brevicoryne brassicae*

<i>Substrat Glucosinolate</i>	<i>V<sub>m</sub> (U/mg)</i>	<i>K<sub>m</sub> (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Activité spécifique (U/ mg)</i>	<i>Activité relative (%)</i>
Sinigrine	1,038	0,359	0,267 $\pm$ 0,041	100,0
Progoitrine	0,316	0,271	0,114 $\pm$ 0,008	42,7
Glucoérucine	1,471	0,198	0,535 $\pm$ 0,029	200,4
Gluconapine	0,963	0,246	0,294 $\pm$ 0,017	110,1
Epiprogoitrine	0,021	0,164	0,027 $\pm$ 0,002	10,1
Glucotropaéoline	0,212	0,161	0,091 $\pm$ 0,008	34,1
Sinalbine	0,389	0,053	0,224 $\pm$ 0,032	84,0
Glucoraphénine	0,943	0,573	0,135 $\pm$ 0,011	50,6

Les activités relatives (en %) ont été calculées pour chaque glucosinolate pur en se référant à l'activité spécifique relative à la sinigrine. D'importantes différences ont été observées en fonction du substrat hydrolysé : les activités les plus élevées ont été obtenues avec la glucoérucine, la gluconapine et la sinalbine. Un résultat intéressant est la différence de spécificité envers les isomères (R) et (S) de l'hydroxybutényle-glucosinolate. La progoitrine correspond à une activité quatre fois supérieure par rapport à son isomère, l'épiprogoitrine. La glucoraphénine et la glucotropaéoline sont lentement hydrolysées par la myrosinase purifiée de puceron, avec une activité spécifique deux et trois fois plus faible que celle correspondant à la référence.

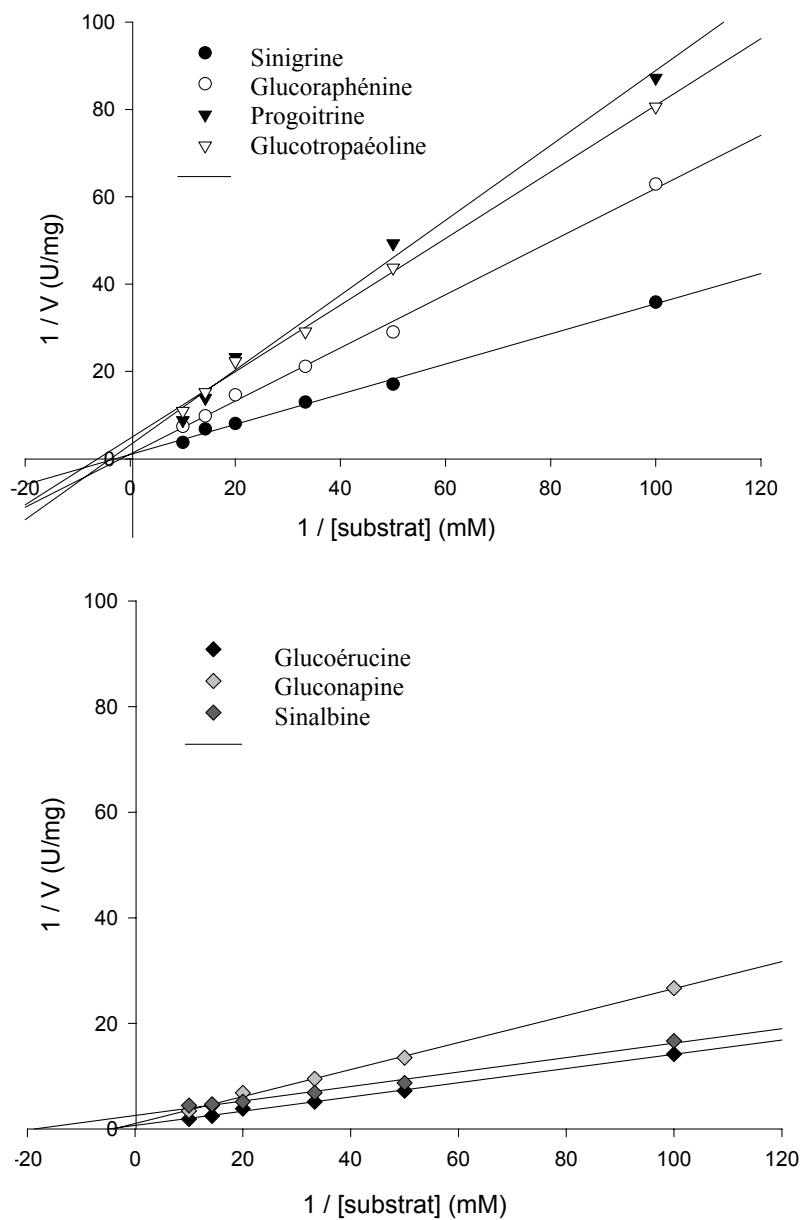


Figure 37 : Régressions linéaires de l'hydrolyse de huit glucosinolates déterminées avec la myrosinase de *Brevicoryne brassicae* suivant Lineweaver-Burk. La régression relative à l'épiprogoitrine n'a pas été représentée vu les trop faibles activités enzymatiques.

**Quantification des produits de dégradation des substrats utilisés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

Pour compléter l'étude de la spécificité de la myrosinase de puceron, les produits de dégradation de 8 glucosinolates purs ont été identifiés par GC-MS (Tableau 14). La plupart des molécules identifiées appartiennent à la famille des ITC, produits communs de l'hydrolyse des glucosinolates. Néanmoins, trois substrats ont engendré des résultats particuliers quant à la nature des produits de dégradation.

Tableau 14 : Quantification des produits de dégradation de huit glucosinolates en présence de la myrosinase purifiée à partir de *Brevicoryne brassicae*

<i>Substrat glucosinolate</i>	<i>Radical du glucosinolate</i>	<i>Produits de dégradation</i>	<i>Rt</i> <sup>(1)</sup>	<i>Quantités (µg)</i>
Sinigrine	allyle-	allyle-ITC	9,77	734 ± 14
Progoitrine	(2R)-2-hydroxybut-3-ényle-	3-butényle-ITC	12,74	146 ± 21
Glucoréucine	4-méthylethiobutyle-but-3-ényle-	butane-4-méthylthio-1-ITC	24,23	39 ± 1
Gluconapine	(2S)-2-hydroxybut-3-ényle-	3-butényle-ITC	12,74	608 ± 31
Epiprogoitrine	(2S)-2-hydroxybut-3-ényle-	L-5-vinyle-2-oxazolidinethione	26,09	30 ± 9
Glucotropaéoline	benzyle-	benzyle-ITC	22,69	1523 ± 44
Sinalbine	4-hydroxybenzyle-	benzyle-ITC	27,50	102 ± 23
Glucoraphénine	4-méthylesulfinylbut-3-ényle-	4-méthylesulfinylbut-3-ényle-ITC	28,16	14 ± 2

<sup>(1)</sup> Rt = temps de rétention.

Comme lors de l'étude des paramètres cinétiques, des différences importantes entre les isomères (R) et (S) de l'hydroxybutényle-glucosinolate, la progoitrine et l'épiprogoitrine, ont été mises en évidence. L'hydrolyse de l'épiprogoitrine ne produit pas



d'isothiocyanate mais une oxazolidinethione. De plus, les deux hydroxy-glucosinolates, la sinalbine et la progoitrine, sont dégradés par la myrosinase de puceron en benzyle-ITC et en butényle-ITC. Dans les deux cas, un groupe hydroxyle est manquant. Afin d'investiguer la raison de la perte de ce groupe hydroxyle, des essais complémentaires ont également été réalisés en utilisant un homogénat de pucerons du chou et une myrosinase végétale, purifiée à partir de *S. alba*. Alors que l'enzyme végétal produit les isothiocyanates hydroxylés conventionnels, la perte de l'hydroxyle a également été observée avec l'homogénat de pucerons. Comme l'implication du bagage enzymatique du puceron dans ce phénomène n'est pas précisée, d'autres réactions ont été effectuées en faisant varier les conditions réactionnelles.

Comme l'acide ascorbique est un activateur de l'activité myrosinase (Othuru et Hata, 1973), vingt milligrammes de cet acide ont été ajoutés au tampon réactionnel et les isothiocyanates hydroxylés ont été produits à partir de l'extrait de pucerons et de la myrosinase aphidienne purifiée. Si les différences des produits de dégradation ont été déterminées, d'importantes variations de quantités de molécules produites ont aussi été observées (dans nos conditions expérimentales, de 14 à 1523  $\mu\text{g}$  d'isothiocyanate ou d'oxazolidinethione en fonction du substrat glucosinolate considéré).

## **Discussions**

La première partie de ce chapitre était consacrée à la purification de la myrosinase aphidienne. La procédure en trois étapes nous a permis d'obtenir l'enzyme purifié avec un rendement de purification de plus de 40%. La majorité des myrosinases purifiées jusqu'à présent proviennent d'espèces végétales appartenant à différentes familles de l'ordre des Capparales (Björkman, 1976) mais certaines thioglucosidases ont été obtenues à partir de champignons (Ohtsuru et Hata, 1973), de bactéries (Tani et al., 1974) et de pucerons spécialistes de crucifères, *B. brassicae* et *Lipaphis erisimi* (MacGibbon et Beuzenberg, 1978). Une seule myrosinase d'insecte a été récemment purifiée (Jones et al., 2001). La purification (de l'ordre de 40 fois) utilise une procédure en cinq étapes (précipitation au sulfate d'ammonium, filtration sur gel Séphacryle, Concanavaline, deux fois échange d'ions). La méthode utilisée ici est plus efficace et plus simple. A titre d'exemple, la myrosinase d'un homogénat de graines de *S. alba* a été purifiée par la méthode citée précédemment à un facteur de purification de 25 à 36 (Pessina et al., 1990).

La masse moléculaire native de la myrosinase purifiée par FPLC a été estimée à 120 kDa. La bande de 60 kDa obtenue sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE indique que l'enzyme est constitué de deux sous-unités de masse moléculaire identique. Les myrosinases purifiées de *B. napus* et de *S. alba* ont des masses moléculaires comprises entre 135 et 154 kDa et sont constituées respectivement de 2 unités de 62-77 kDa (Bones et Rossiter, 1996). Si deux sous-unités

sont souvent présentes, de multiples unités de myrosinase ont été détectées chez certaines plantes comme *Wasabia japonica* (Ohtsuru et Kawatani, 1979). Généralement, le nombre de bandes visualisables varie de 1 à 4 (MacGibbon et Allison, 1970).

Peu d'études ont été réalisées sur la spécificité de substrat des isoenzymes de myrosinase. La majorité des travaux consacrés aux thioglucosidases ne sont basés que sur l'utilisation de la sinigrine comme substrat. Un tampon phosphate, pH 7,0, a été utilisé lors des mesures d'activité enzymatique. L'activité optimale de la myrosinase purifiée de colza a été obtenue à ce pH en tampon phosphate (Henderson et McEwen, 1972). De plus, les variations de pH de 5,0 à 7,0 ne produisent aucun effet important sur la stabilité des thioglucosidases à des températures sous 40°C (Tani et al., 1974). Huit glucosinolates purs ont été testés pour déterminer l'activité spécifique et les paramètres cinétiques de l'enzyme purifié. D'importantes différences ont été observées en fonction du glucosinolate considéré. L'activité de la myrosinase aphidienne est plus faible que celles de diverses plantes de Brassicaceae (choux, brocoli, radis, choux-fleurs) variant de 2,0 à 22,6  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Yen et Wei, 1993). Alors que la myrosinase purifiée de pucerons présente des efficacités supérieures envers la sinigrine, la gluconapine et la sinigrine, les autres substrats comme la progoitrine, l'épiprogoitrine, la glucotropaéoline et la glucoraphénine correspondent à des activités enzymatiques plus faibles. L'activité spécifique relative à la glucoérucine est deux fois plus élevée que celle obtenue avec la référence sinigrine. Les différences d'efficacité de la

myrosinase sont généralement liées à la nature du glucosinolate : les GLS aliphatiques sont plus rapidement dégradés, et en plus grande quantité. Une activité moindre a été observée envers les GLS indoliques. Nous avons démontré dans ce chapitre que d'importantes différences d'activité peuvent être observées dans le même groupe de glucosinolates. L'activité thioglucosidase envers certains substrats tels que la progoitrine a déjà été démontrée comme étant variable en fonction de l'enzyme myrosinase (issus de différentes espèces végétales) mais très peu d'études ont été réalisées sur la spécificité de myrosinase purifiée envers une large gamme de glucosinolates.

Les constantes cinétiques calculées sont également très différentes en fonction du substrat. La valeur la plus faible de  $V_{\max}$  est 50 et 80 fois inférieure respectivement à celle de la référence (sinigrine) et à celle de la glucoérucine. La  $V_{\max}$  de la myrosinase aphidienne purifiée envers la sinigrine est trois fois plus faible que la valeur de  $V_{\max}$  de l'enzyme issu de *L. sativum* ( $1,34 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) envers le même substrat (Durham et Poulton, 1989). La constante de Michaelis varie sur une échelle de 1 à 10 en fonction du glucosinolate testé mais est en concordance avec les valeurs relatives aux enzymes purifiés d'*Enterobacter cloacae* (0,37 mM) (Tani et al., 1974), *B. napus* et *S. alba* (respectivement 0,03 et 0,17 mM) (Bones et Rossiter, 1996) et *Wasabia japonica* (0,47 mM) (Ohtsuru et Kawatani, 1979). Les valeurs de  $K_m$  disponibles dans la littérature ont été calculées uniquement pour la sinigrine. Dans ce chapitre, l'utilisation de plusieurs substrats fournit une gamme utile de constantes cinétiques

pour les futures recherches sur la caractérisation biochimique du système glucosinolate-myrosinase.

A côté de l'approche cinétique de la dégradation des glucosinolates par la myrosinase aphidienne, les produits d'hydrolyse des huit glucosinolates ont été identifiés et quantifiés. Si on compare les résultats des tableaux 13 et 14, les activités relatives les plus élevées vis-à-vis de certains substrats ne correspondent pas systématiquement à la production plus importante d'ITC. Si la répétabilité des analyses ne peut être mise en cause, plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette observation. Tout d'abord, la volatilité des différents ITC identifiés n'est pas identique. Aussi, les solubilités de ces molécules dans l'éther diéthylique ne sont pas équivalentes. Dès lors, une proportion variable de l'ITC considéré a pu être perdu lors de l'extraction précédant l'analyse. De plus, l'hydrolyse des glucosinolates engendre différents produits de dégradation en fonction de la nature du substrat. Des proportions variables d'ITC et notamment de nitriles et d'oxazolidinethiones sont produits suivant le glucosinolate hydrolysé. Des quantités importantes de ces derniers peuvent être produites et expliquer la plus faible présence de l'ITC résultant de la dégradation du glucosinolate par la myrosinase aphidienne.

Sept des huit substrats ont été dégradés en isothiocyanates qui sont généralement produits à des pH neutres alors que la production de nitriles a lieu à de plus faibles pH (Benn, 1977). Seule l'épiprogoitrine a été dégradée en oxazolidinethione. Cette observation n'est pas

surprenante, les isothiocyanates avec un hydroxyle en position 2 se cyclisent spontanément en oxazolidine-2-thiones. Un exemple est la glucoprogoitrine, dérivée du 2-hydroxy-but-3-énylglucosinolate (Bones et Rossiter, 1996). L'isothiocyanate issu de la progoitrine est différent de celui provenant du glucosinolate isomère, l'épiprogoitrine. La perte d'un groupe hydroxyle a été observée pour les deux derniers substrats et pour la sinalbine. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque des homogénats de pucerons ont été utilisés comme source de myrosinase. La thioglycosidase purifiée de *S. alba* a aussi été utilisée et catalyse la production d'hydroxy-isothiocyanates conventionnels. La différence de produits d'hydrolyse des glucosinolates est soit liée à l'activité de la myrosinase d'insecte soit liée aux conditions de réaction. Celles-ci sont très importantes. En effet, Wilkinson et ses collègues (1984) ont montré que des concentrations de 0,7 à 5,0 mM d'acide ascorbique induisent une activation maximale de la myrosinase d'extraits partiellement purifiés de six espèces de crucifères. L'acide ascorbique ne participe pas à la réaction catalysée par la myrosinase de moutarde (Ettlinger et al., 1961) et n'est pas impliqué dans l'association des sous-unités de l'enzyme. L'activation semble due à un changement de conformation dans la structure de la protéine, menant à un taux de réaction accru lorsque les sites de liaison sont occupés (Othsuru et Hata, 1973). L'acide ascorbique a été ajouté dans le tampon de réaction des nouvelles séries d'essais d'hydrolyse de la sinalbine. L'obtention du groupe hydroxy de l'isothiocyanate mène à la conclusion que l'acide ascorbique contribue à la libération du 4-hydroxybenzyle-ITC qui n'a jamais été observé avec les conditions préalablement mentionnées.

Suivant nos observations, nous supposons que l'acide ascorbique peut prévenir la dégradation du 4-hydroxybenzyle-ITC.

La quantification des produits de dégradation des glucosinolates a permis d'observer d'importantes différences entre les substrats testés. En effet, un facteur 100 a été calculé en comparant les quantités les plus faibles et les plus élevées d'isothiocyanates (respectivement issus de la glucoraphénine et la glucotropaéoline). Les molécules produites par les surnageants de solution aqueuse de macération de plante et de graines ont été extraites avec de l'éther diéthylique et analysées par chromatographie gazeuse. L'allyle-ITC (issu de la sinigrine) a été produit à partir de graines de choux-fleurs à un taux de  $1110 \mu\text{g.g}^{-1}$ . L'analyse des substances volatiles émises par les radis a révélé la production de  $85 \mu\text{g.g}^{-1}$  et de  $1200 \mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement de 4-méthylthiobutyle-ITC (issu de la glucoérucine) et 4-méthyle-sulfinylbut-3-ényle-ITC (de la glucoraphénine). Plus de  $240 \mu\text{g.g}^{-1}$  de but-3-ényle-ITC (issu de la gluconapine) ont été produits par des graines de choux chinois. Des graines de colza produisent  $843 \mu\text{g.g}^{-1}$  et  $576 \mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement de butényle-ITC et d'hydroxybutényle-ITC (Cole, 1980). Aucune relation directe entre la composition en glucosinolates de la plante hôte et la capacité accrue du puceron à hydrolyser certains d'entre-eux n'a été observée. *B. brassicae* est communément retrouvé sur des *Brassica*, *Lepidium*, *Sinapis*, *Rhaphanus* et plusieurs autres crucifères mais aussi sur les *Tropaeolum* (Heie, 1992) même si le puceron du chou n'utilise *T. majus* qu'en tant que plante hôte temporaire (Sones et al., 1984).

## **Conclusions**

La purification de la myrosinase aphidienne en trois étapes a permis d'obtenir l'enzyme purifié avec des rendements et des facteurs de purification élevés. Lors de l'étude des paramètres cinétiques et de la dégradation des glucosinolates, d'importantes différences ont été observées en fonction du substrat hydrolysé. Si l'efficacité des myrosinases est liée à la nature du glucosinolate (aliphatique ou indolique), d'importantes différences d'activité ont été observées avec des substrats appartenant à un même groupe. Le rôle de l'acide ascorbique sur l'activité myrosinase a également pu être mis en évidence. Enfin, aucune relation directe entre la préférence alimentaire de *B. brassicae* face aux plantes hôtes (considérant la composition en glucosinolates) et la capacité accrue du puceron à hydrolyser certaines substances secondaires des Brassicaceae ne peut être proposée.



## **Chapitre 11**

### **Caractérisation et purification des glutathion S-transférases du puceron *Myzus persicae***

#### ***Introduction***

L'adaptation aux métabolites secondaires végétaux est un aspect de l'écologie chimique des insectes phytophages (Pickett *et al.*, 1992). L'effet des substances allélochimiques de Brassicaceae sur les paramètres biologiques et la réponse des systèmes de détoxification des insectes ont été investigués dans ce qui précède. Deux mécanismes de défense ont été identifiés : la myrosinase chez le puceron spécialiste (*B. brassicae*) et les GST chez le puceron et le prédateur généralistes afin de faire face à la présence de substances toxiques d'origine végétale. La plupart des recherches menées sur les GST se sont focalisées sur les Lépidoptères (Yu, 1982, 1989) ou les Diptères (Clark et Shamaan, 1984; Fournier *et al.*, 1992; Prapanthadara *et al.*, 2000). Le système GST des Hémiptères et plus particulièrement celui des espèces aphidiennes a été peu étudié même si les pucerons sont économiquement dommageables et sont parfois difficilement contrôlés, notamment à cause de phénomènes de résistance aux insecticides utilisés (Devonshire *et al.*, 1998).

La résistance biochimique à des substances xénobiotiques est due soit à une modification du site cible de la molécule toxique, soit à une surproduction de l'enzyme de détoxification (Haubruge et Amichot, 1995). Des inductions d'activité GST ont été observées chez le puceron polyphage *M. persicae* pour faire face aux glucosinolates et aux isothiocyanates des plantes hôte Brassicaceae. Dans cette partie de

la recherche, la purification et la caractérisation des GST de *M. persicae* ont été entreprises. En effet, une explication potentielle de la variation de comportement alimentaire, généraliste et spécialiste, peut impliquer le pool d'enzymes de détoxification incluant les GST. Une relation entre la composition et la quantité des GST et le comportement alimentaire du puceron sera discutée.

## **Matériel et Méthodes**

### **Produits et réactifs**

Le glutathion réduit (GSH) est fourni par Janssen Chimica. Les matrices Sépharose 6B, 4B et Agarose ainsi que le polybuffer 74 et les colonnes PD10 contenant 10 ml de Sephadex G-25 proviennent de chez Pharmacia. Les autres réactifs ont été fournis par Fluka ou Merck.

### **Insectes**

Les pucerons *M. persicae* ont été élevés sur *V. faba*. Les conditions d'élevage sont identiques à celles décrites dans la partie matériel et méthodes du chapitre 6.

### **Préparation des homogénats d'insectes et élimination des colorants naturels**

Les pucerons ont été broyés à l'aide d'un ultraturax dans du tampon phosphate 20 mM, pH 7,0. L'homogénat est ensuite ultracentrifugé (1h à 100,000g) et le surnageant exempt de la couche lipidique superficielle est appliqué sur une colonne PD10 (Pharmacia) avant de réaliser la séparation par chromatographie d'affinité.

### ***Chromatographies d'affinité***

Plusieurs colonnes d'affinité ont été préparées : Sepharose 6B suivant la description de Simons et Vander jagt (1977), Sepahrose 4B et Agarose suivant les consignes décrites par le fournisseur (Biorad). Les colonnes sont éluées avec du tampon phosphate 20 mM, pH 7,0 jusqu'au moment où aucune protéine n'est plus détectée. Les GST sont ensuite éluées avec un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 9,6 contenant 15mM de GSH. Des fractions d'un millilitre sont collectées et l'activité GST est évaluée. Les fractions correspondant au pic d'activité enzymatique ont été utilisées pour réaliser les électrophorèses SDS-PAGE et les études cinétiques.

### **Dosage des protéines totales et mesure de l'activité glutathion S-transférases**

Le dosage des protéines et la mesure de l'activité GST ont été réalisés comme décrit précédemment au chapitre 9.

### **Electrophorèse PAGE en conditions dénaturantes**

Pour réaliser les électrophorèses en SDS-PAGE, les échantillons sont préparés comme décrits dans la partie « Matériel et Méthodes » du chapitre précédent. La description de la composition des gels et des tampons utilisés ainsi que la solution de Laemmli est identique à celle qui est présentée au chapitre 10. Les électrophorèses sont réalisées à 100 V et 50mA durant deux heures dans un système S-lab gel de chez BioRad.

Etant donné la faible quantité de protéines purifiées, la méthode traditionnelle du « bleu brillant » de Coomassie s'est avérée être trop peu sensible. Les gels ont été colorés au nitrate d'argent suivant le protocole du kit « Plus one Silver Staining kit » fourni par le fabricant (Biorad).

### **Détermination des paramètres cinétiques**

Les cinétiques enzymatiques des GST purifiées de *M. persicae* sont déterminées en mesurant l'activité envers une gamme de concentrations en substrats (variant de 0,5 à 0,05 mM de DNIB, CDNB ou DCNB et de 1,0 à 0,1 mM de GSH). Les valeurs de la vitesse maximale ( $V_{\max}$ ) et de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) pour chaque substrat sont calculées à partir des équations de Lineweaver-Burk.

### **Résultats**

#### **Chromatographies d'affinité (Agarose, Sepharose 4B et 6B)**

Les rendements de purification sont très variables en fonction de la colonne utilisée : le Sepharose 4B permet d'obtenir un rendement deux fois plus élevé qu'avec la colonne agarose (Tableau 15). Moins de 6% des GST ont été purifiées en utilisant la colonne Sepharose 6B. Etant donné l'activité réduite et la très faible teneur en protéines des fractions de GST obtenues avec la dernière colonne, la caractérisation enzymatique n'a été réalisée qu'avec les GST purifiées par les deux autres méthodes.

Tableau 15 : Purification des glutathion S-transférases de *Myzus persicae* en utilisant deux types de colonne (Agarose et Sepharose 4B)

	<i>Protéines</i> (mg / ml)	<i>Activité</i> <i>spécifique</i> ( $\mu\text{mol} / \text{min. mg}$ <i>protéines</i> )	<i>Rendement</i> (%)	<i>Facteur de</i> <i>purification</i>
<b>Agarose</b>				
Homogénat	1,63 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,06	100,0	1,00
PD10	0,72 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,12	114,1	2,33
Affinité	0,22 $\pm$ 0,03	6,32 $\pm$ 0,68	14,3	15,05
<b>Sepharose 4B</b>				
Homogénat	1,02 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,03	100,0	1,00
PD10	0,62 $\pm$ 0,08	0,76 $\pm$ 0,05	109,1	1,72
Affinité	0,07 $\pm$ 0,00	9,72 $\pm$ 1,01	38,3	22,1

Les profils d'élution des homogénats de *M. persicae* sur les colonnes d'affinités Agarose et Sepharose 4B sont présentés aux Figures 38 et 39.

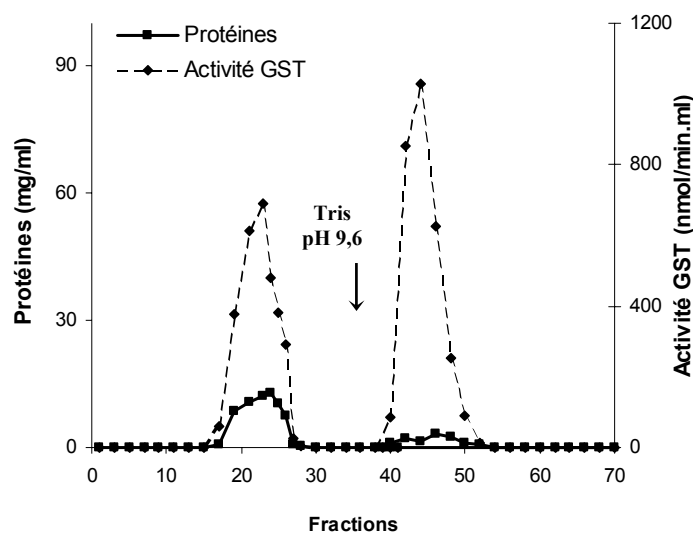


Figure 38 : Profil d'élution des glutathion S-transférases de *Myzus persicae* sur une colonne d'affinité Sepharose 4B.

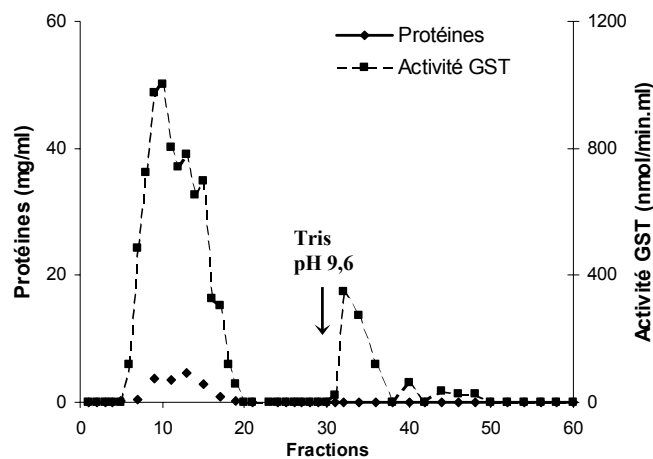


Figure 39 : Profile d'éluion des glutathion S-transférases de *Myzus persicae* sur une colonne d'affinité Agarose

### Mise en évidence des différentes glutathion S-transférases par électrophorèse

Les fractions de GST liées lors des chromatographies d'affinités ont été utilisées telles quelles lors de la réalisation des gels d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure 40). Aucune bande n'a pu être visualisée en utilisant la fraction de GST purifiée de *M. persicae* à partir de la colonne d'affinité Sepharose 6B. Les profils des GST purifiées sur les deux autres colonnes révèlent la présence d'une seule bande dont la masse moléculaire est estimée à environ 28 kDa.

### Paramètres cinétiques

Des différences entre les GST de *M. persicae* purifiées avec les colonnes Sepharose 4B et Agarose ont été observées lors de l'évaluation des paramètres cinétiques (Figure 41 et Tableau 16).

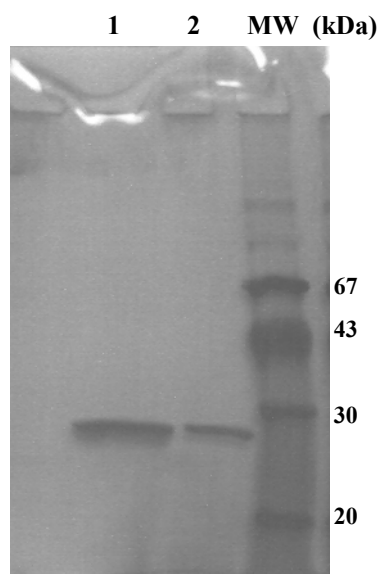


Figure 40 : Gel SDS - PAGE des glutathion S-transférases de *Myzus persicae* purifiées sur colonnes Sepharose 4B (ligne 1) et Agarose (ligne 2). Les tailles (kDa) des marqueurs moléculaires (MW) sont indiqués.

Tableau 16 : Quelques propriétés des GST du puceron *Myzus persicae* purifiées sur colonnes Sepharose 4B et Agarose <sup>a</sup>

<i>Propriétés</i>	<i>Substrat</i>	<i>Sepharose 4B</i>	<i>Agarose</i>
$K_m$ (mM)	CDNB	0,015	0,221
	DNIB	0,013	1,163
	DCNB	0,497	- *
	GSH	0,291	0,307
$V_{max}$ (nmol/min.mg)	CDNB	92,76	32,62
	DNIB	105,13	184,13
	DCNB	3,30	- *
	GSH	95,43	43,02

<sup>a</sup>  $V_{max}$  et  $K_m$  ont été mesurés avec une concentration constante de 1mM de GSH ou de substrat benzénique. \* les activités enzymatiques dès la première réduction de concentration étaient nulles, les paramètres cinétiques n'ont pas pu être calculés.

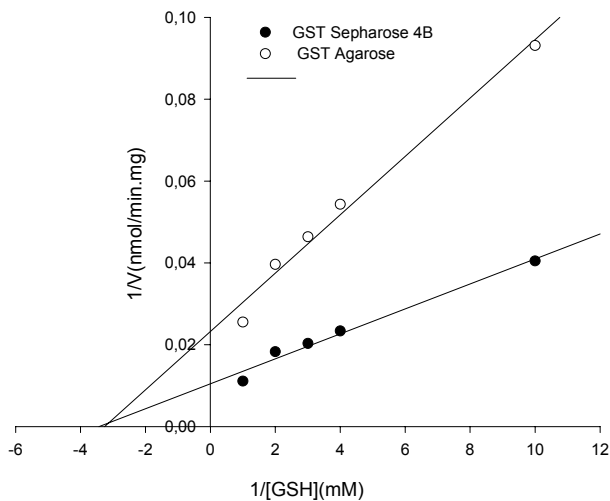
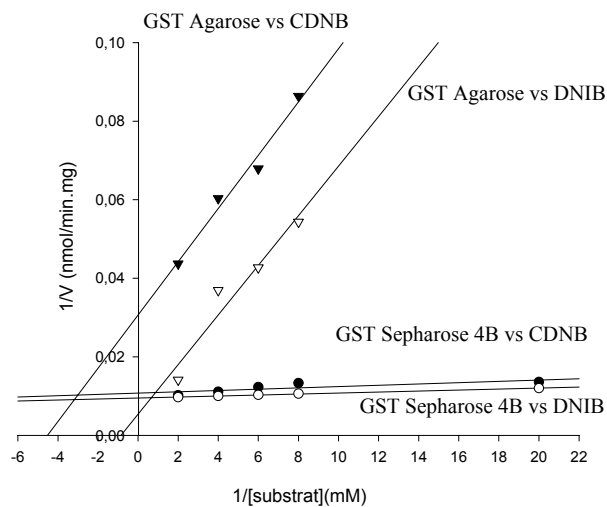


Figure 41 : Régressions suivant Lineweaver-Burk de la conjugaison du DNIB(a), CDNB(b) et du GSH (c) par les GST de *Myzus persicae* purifiées en utilisant les colonnes d'affinité Sepharose 4B et Agarose Pour mesurer l'activité enzymatique en variant la quantité de substrats (GSH ou substrat benzénique), la concentration de l'autre substrat reste constante à 0,5 mM ou 1 mM respectivement en CDNB ou en GSH.

La courbe relative à la variation de l'activité des GST purifiées à l'aide de la colonne Sepharose 4B en fonction de la teneur en DCNB n'est pas représentée vu la trop grande différence d'échelle de l'axe des ordonnées.



## ***Discussions***

Jusqu'à présent, peu d'études de purification de GST chez les Homoptères ont été décrites dans la littérature même si ces insectes présentent des intérêts écologiques et économiques (Egaas et al., 1991 ; Francis et al, 2001c). Après l'étape d'ultracentrifugation et avant l'élution de l'homogénat de pucerons sur les colonnes d'affinité, le surnageant a été élué sur une colonne PD10. En effet, des purifications préalables d'espèces de pucerons ont révélé la présence d'inhibiteurs d'activité GST endogènes de faible masse moléculaire dans les homogénats d'insectes (Francis et al, 2001c). Cette étape permet d'éliminer ces inhibiteurs, se traduisant par une augmentation de l'activité GST (de 5 à 14% par rapport à l'échantillon de départ). Des rendements de purification supérieurs à 100% ont déjà été observés dans les premières étapes de purification de GST d'insectes. Une relation a été établie entre l'inhibition de l'activité GST et la présence de quinones et de polyphénols dans les broyats bruts d'insectes (Motoyama et Dauterman, 1978).

Les chromatographies d'affinité ont permis de révéler des différences importantes entre les GST purifiées d'une espèce aphidienne en fonction du type de colonne utilisé. En effet, les quantités d'enzymes fixés varient très fortement suivant la colonne. L'efficacité de purification de la colonne est directement liée au type d'activation du support Sepharose ou Agarose afin de créer les sites réactionnels permettant l'établissement de liens covalents entre la matrice et les GST. L'enzyme fixé sur la colonne doit présenter des sites actifs

accessibles au substrat présent dans le tampon d'élution si on souhaite détacher l'enzyme du support. Une protéine immobilisée trop près du support risque de rester inaccessible. La longueur du bras espaceur fixé sur le support et sur lequel se greffe la GST joue un rôle important : trop court, la colonne est inopérante, trop long, il introduit des effets parasites (Pelmont, 1993). Les différentes caractéristiques des deux colonnes utilisées permettent d'expliquer les variations d'efficacité de purification en relation avec la conformation des GST de *M. persicae*.

La spécificité des GST purifiées de *M. persicae* en fonction du substrat est également très variable. Dans la plupart des travaux sur l'étude des GST d'insectes, le CDNB et le DCNB sont les substrats benzéniques les plus souvent utilisés (Franciosa et Bergé, 1995). Les GST de *M. persicae* purifiées sont peu ou pas sensibles à ce dernier substrat alors que l'utilisation du DNIB a engendré des résultats originaux. Les GST purifiées avec la colonne Sepharose 4B présentent des activités GST supérieures envers le CDNB par rapport aux activités des enzymes purifiés avec l'autre type de colonne. Une importante activité GST vis-à-vis du DNIB des GST issues de la chromatographie d'affinité au Sepharose 4B a également été observée. Les variations d'activité GST en fonction de plusieurs substrats benzéniques permettent de démontrer la présence de formes multiples de GST. En effet, les formes de GST les plus actives envers un substrat (comme le CDNB) ne sont pas, d'un point de vue fonctionnel, liées aux isoenzymes les plus actifs envers un autre substrat comme par exemple le DCNB (Mullin et al, 1984). De telles différences

d'activité GST envers les substrats ont été observées chez plusieurs souches de *Musca domestica*, sensibles ou résistantes aux insecticides (Clark et al, 1984). L'existence de deux classes de GST chez la mouche a été proposée notamment suite à l'observation de variations d'activités enzymatiques envers le CDNB, le DCNB et le NBC. En effet, certaines GST purifiées présentaient uniquement une forte activité envers le CDNB alors que des activités envers le CDNB mais aussi envers d'autres substrats ont été observées avec d'autres GST purifiées de la même espèce d'insecte (Clark et al, 1984). Suivant les gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes, l'ensemble de ces diverses GST sont des homodimères constitués de sous-unités de poids moléculaire similaire de 28 kDa quelle que soit la souche de *M. domestica* considérée. L'étude des activités spécifiques des GST de *M. persicae* purifiées sur les deux types de colonne envers les trois substrats benzéniques (CDNB, DCNB et DNIB) permet de conclure comme chez *M. domestica* (Clark et al, 1984) à l'existence chez le puceron d'au moins deux groupes d'enzymes présentant des propriétés catalytiques différentes. Des observations similaires ont également été réalisées en étudiant les GST purifiées de deux autres espèces aphidiennes, *Aulacorthum solani* et *Acyrtosiphon pisum* (Francis et al, 2001c). Si les GST d'*A. pisum* ne présentent une activité élevée qu'envers le substrat CDNB, les activités des GST purifiées à partir de l'autre espèce de puceron étaient également élevées envers le DNIB. Les enzymes de ces deux espèces phytophages présentent des différences importantes de propriétés catalytiques et ont été mises en relation avec la spécificité de leur comportement alimentaire.

D'importantes différences de paramètres cinétiques ont également été observées en fonction du substrat utilisé mais aussi en fonction des GST de *M. persicae*. Les  $K_m$  des GST issues des chromatographies avec le Sepharose 4B varient d'un facteur 1,1 à 38,2 en fonction des substrats considérés. Ces enzymes présentent une affinité élevée envers le CDNB et le DNIB par rapport au DCNB. Les valeurs de  $K_m$  observées avec les GST de *M. persicae* purifiées avec la colonne Sepharose sont du même ordre de grandeur que celles des GST de la majorité des espèces d'insectes étudiées ( $K_m$  (CDNB) de 0,025 à 0,294 mM, Prapanthadara et al, 1996).

Les  $K_m$  relatifs aux GST purifiées en utilisant la colonne Agarose sont plus stables (facteur maximum de variation de 5,3) quel que soit le substrat benzénique utilisé. Si les  $K_m$  (GSH) sont identiques pour les GST purifiées avec les deux types de colonne, il n'en est pas de même pour les trois substrats benzéniques. Les  $K_m$  envers le CDNB et le DNIB des GST purifiées avec la colonne Sepharose sont 14,7 et 89,6 fois inférieures aux valeurs calculées en utilisant les GST purifiées avec la colonne Agarose. Les variations de ces paramètres cinétiques traduisent les différences d'affinité envers les substrats des GST issues des deux méthodes de purification. Ces valeurs confirment la présence de différences qualitatives des GST, c'est à dire l'existence de plusieurs formes enzymatiques de GST chez *M. persicae*. De telles variations de  $K_m$  de GST purifiées de souches résistantes et sensibles de *M. domestica* ont été mises en évidence. De plus, les GST purifiées des souches résistantes aux insecticides présentaient des  $K_m$  inférieurs de l'ordre de 40% à ceux correspondant aux enzymes issus des

souches sensibles. La multiplicité des GST en fonction de la souche de *M. domestica* considérée a été confirmée par des analyses électrophorétiques (Ottea et Plapp, 1984).

Le  $V_{\max}$  envers le DCNB est nul ou très faible pour les GST purifiées sur les deux types de colonne. Si les valeurs de  $V_{\max}$  relatives aux GST de *M. persicae* obtenues par élution sur la colonne Sepharose 4B sont constantes, il n'en est pas de même pour les paramètres relatifs aux GST purifiées avec la colonne Agarose ( $V_{\max (CDNB)}$  et  $V_{\max (GSH)}$  sont 5,6 et 4,3 fois inférieures à la valeur obtenue avec le DNIB). Les valeurs de  $V_{\max}$  envers le CDNB des GST purifiées d'autres insectes varient de 40 à 218  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Prapanthadara et al, 1996). Lorsque les paramètres relatifs aux GST issues des deux méthodes de purification sont comparés par rapport au même substrat, des différences d'efficacité catalytique sont observées. Excepté la  $V_{\max (DNIB)}$  qui est 1,7 fois supérieure avec la GST éluée sur agarose, les autres paramètres sont inférieurs aux valeurs relatives à la GST purifiée à l'aide de la colonne Sepharose ( $V_{\max (CDNB)}$  et  $V_{\max (GSH)}$  respectivement 2,8 et 2,2 fois plus faibles pour les GST purifiées sur la colonne d'agarose).

L'estimation de la masse moléculaire des glutathion S-transférases de *M. persicae* sur les gels SDS-PAGE est en concordance avec les résultats de précédentes études. En effet, la taille des sous-unités de GST est comprise entre 20 et 30 kDa (Clark et Shamaan 1984; Grant et Matsumura, 1989; Fournier *et al.*, 1992). Une bande unique de 25 kDa correspondant aux GST purifiées de deux autres espèces de

pucerons, *A. pisum* (Francis et al, 2001) et *Myzus cerasi* (données non publiées) a été observée sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Chez *M. persicae*, une seule bande de 28kDa est observée sur gel quelle que soit la méthode de chromatographie d'affinité qui a été utilisée pour purifier les GST. Nous pouvons conclure que la forme native des protéines purifiées sur les deux types de colonne est homodimérique. Si la taille et la structure quaternaire des GST éluées sur les colonnes d'agarose et de Sepharose sont identiques, les sous-unités observées sont différentes. En effet, les différences de propriétés catalytiques qui ont été observées précédemment permettent de conclure à la multiplicité des sous-unités de GST chez *M. persicae* comme chez la mouche *M. domestica* (Clark et al, 1984).

La diminution de l'activité GST chez les pucerons transférés de plantes de Brassicaceae sur des plantes hôtes ne présentant pas le complexe glucosinolates / isothiocyanates a permis de mettre en évidence l'effet inducteur des substances allélochimiques végétales (Egaas *et al.*, 1991). Aussi, l'induction de l'activité GST chez *M. persicae* en fonction de la plante hôte de Brassicaceae mais aussi en relation avec la présence de substances allélochimiques dans des diètes artificielles a été déterminée au chapitre 9. Si l'évolution de l'activité GST chez le puceron a été suivie en utilisant deux substrats, les inductions d'activité enzymatique ont été principalement observées envers le CDNB. Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que les GST purifiées sur la colonne Sepharose présentent le plus d'affinité et d'efficacité envers le CDNB et sont certainement les formes

enzymatiques majoritairement impliquées dans la réponse de l'insecte face à la présence de substances secondaires dans la plante hôte. Les GST purifiées sur la colonne agarose présentent une activité supérieure envers le DNIB. Même si ces dernières sont influencées par la présence de substances allélochimiques dans le régime alimentaire de *M. persicae*, il semble que les GST éluées sur la colonne agarose soient moins impliquées dans l'adaptation de l'insecte phytophage aux plantes de Brassicaceae.

L'observation d'inductions de l'activité GST par la présence de substances allélochimiques dans des diètes artificielles en fonction du substrat benzénique utilisé a aussi été observé chez *S. frugiperda*. Si la xanthotoxine (0,02%) engendre une augmentation de l'activité GST envers le DCNB, l'effet d'autres molécules comme l'indole 3-acétonitrile et l'indole-3-carbinol est faible sur l'activité enzymatique envers le DCNB mais est très important sur l'activité GST envers le CDNB. Ces observations ont contribué à conclure à l'implication de différents isoenzymes de GST en fonction de la substance allélochimique à détoxifier par *S. frugiperda* (Yu, 1984).

La présence d'un nombre supérieur d'isoenzymes de GST chez les insectes polyphages est une théorie développée par plusieurs auteurs afin d'expliquer les adaptations des ravageurs généralistes par rapport aux spécialistes d'un nombre réduit de plantes hôtes. Des propositions divergentes viennent ensuite compléter cette théorie : soit un isoenzyme déjà présent est produit en plus grande quantité soit un nouvel isoenzyme spécifique est synthétisé par l'insecte qui est exposé

à la substance allélochimique. Jusqu'à présent, seule une étude de Yu (1999) a confirmé la seconde proposition en ayant observé une induction de nouveaux isoenzymes de GST dans les corps gras de larves de Lépidoptères en réponse à la présence de diverses molécules allélochimiques dans la diète. Les autres travaux ont démontré la production accrue de GST existantes. Sur base d'études cinétiques, les valeurs de  $K_m$  envers le DCNB des GST de *S. frugiperda* élevé sur différentes plantes hôtes de Brassicaceae ont très peu varié, preuve que les augmentations d'activités enzymatiques résultent de changements quantitatifs plutôt que qualitatifs (Clark, 1989). Aussi, l'augmentation de l'activité GST réalisée en ajoutant du phénobarbital dans la diète de *M. domestica* n'a engendré aucune modification des  $K_m$ . Les effets de la substance inductrice sur l'activité enzymatique sont purement quantitatifs, sans altération de la composition des isoenzymes de GST présents (Hayaoka et Dauterman, 1982). Des études électrophorétiques ont également confirmé les résultats des travaux cinétiques. Yu (1989) a démontré que les Lépidoptères polyphages (*Spodoptera frugiperda* et *Heliothis zea*) possèdent de multiples GST (respectivement 6 et 4 isoenzymes) tandis que les ravageurs plus spécialisés (*Heliothis virescens*, *Trichoplusia ni* et *Anticarsia gemmatilis*) ne présentent qu'une seule forme de l'enzyme. La multiplicité des GST joue un rôle important dans les stratégies de nutrition des ravageurs phytophages.

Si des variations qualitatives et quantitatives des GST ont été corrélées au comportement alimentaire des insectes (en relation avec la présence de substances allélochimiques), un autre système de



détoxication, les monooxygénases à cytochrome P-450, interviennent dans la métabolisation d'une large gamme de substances xénobiotiques et de métabolites secondaires de plantes hôtes d'insectes phytophages (Cohen et al, 1992). La pression de sélection issue de la présence de substances secondaires végétales est un des facteurs qui a conduit à la diversification de la superfamille des cytochrome P-450 (Nebert et Gonzalez, 1987; Nelson et Strobel, 1987). L'adaptation d'au moins deux espèces de Lépidoptères, *Papilio polyxenes* et *Depressaria pastinacella*, est due à la capacité des insectes à détoxifier les furanocoumarines présentes chez les plantes d'Apiaceae et des Rutaceae par l'activité cytochrome P-450 (Cohen et al, 1992). En effet, des analyses in vivo ont démontré que *P. polyxenes* métabolise les furanocoumarines, comme la xanthotoxine, dix fois plus rapidement que les Lépidoptères qui ne rencontrent pas ces substances secondaires dans leurs plantes hôtes (Berenbaum, 1991b). Cette détoxication des furanocoumarines chez *P. polyxenes* est réalisée par l'expression de multiples enzymes de monooxygénases à cytochrome P450 mais aussi de GST (Hung et al, 1995). D'une manière générale, les insectes généralistes expriment une large gamme d'enzymes capables d'assurer la détoxication de nombreuses substances xénobiotiques y compris les métabolites secondaires d'origine végétale (Li et al, 2000).

### **Conclusions**

Après purification des GST sur deux types de colonne d'affinité, une seule bande de 28kDa correspondant aux enzymes purifiés par les deux méthodes a été observée sur gel d'électrophorèses en conditions

dénaturantes. La forme native des protéines purifiées sur les deux types de colonne est homodimérique. Si la taille et la structure quaternaire des GST éluées sur les deux types de colonne semblent identiques, les sous-unités observées sur le gel d'acrylamide sont différentes. En effet, les variations de propriétés catalytiques (activités spécifiques,  $K_m$  et  $V_{max}$ ) qui ont été observées avec les GST purifiées sur les deux colonnes d'affinité en fonction des trois substrats benzéniques permettent de conclure à la multiplicité des sous-unités de GST chez *M. persicae*.

Suite aux résultats du chapitre 9 sur l'évolution de l'activité GST chez *M. persicae* en fonction de la présence de substances allélochimiques dans la plante hôte ou dans des diètes artificielles, les inductions d'activité enzymatique ont été principalement observées envers le CDNB. Nous pouvons conclure que les GST purifiées sur la colonne Sepharose présentent le plus d'affinité et d'efficacité envers le CDNB et sont certainement les formes enzymatiques majoritairement impliquées dans la réponse de l'insecte face à l'occurrence de substances secondaires dans la plante hôte. La présence de multiples isoenzymes de GST chez les insectes polyphages est décrite chez plusieurs espèces phytophages généralistes comme responsable de l'adaptation à une multitude de plantes hôtes. Chez *M. persicae*, même si une seule sous-unité semble avoir été observée, plusieurs formes enzymatiques sont présentes et certaines d'entre elles interviennent dans l'adaptation du puceron face aux métabolites secondaires de ses plantes hôtes.

## **Chapitre 12**

### **Caractérisation et purification des glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata***

#### ***Introduction***

Pour faire face à la présence des substances secondaires de Brassicaceae, l'espèce généraliste de puceron *M. persicae* présente des inductions du système de détoxification GST. Au niveau trophique supérieur, le prédateur aphidiphage *A. bipunctata* produit également des quantités accrues de glutathion S-transférases lorsqu'il ingère des glucosinolates et quand il est exposé à des isothiocyanates. Si les représentants des deux niveaux, les espèces phytophages et entomophages, développent la même adaptation pour contrer la présence de molécules allélochimiques chez la plante hôte ou chez la proie qui les a préalablement ingérées, plusieurs questions se posent. Les enzymes de détoxification impliqués sont-ils identiques chez le puceron et le prédateur ? Le nombre d'isoenzymes de GST chez l'insecte entomophage est-il supérieur à celui observé chez l'Homoptère ? L'activité GST est-elle fonction du stade de développement de l'auxiliaire et où est-elle localisée ?

Avant de caractériser les GST du prédateur, l'expression de l'activité enzymatique aux divers stades de développement et la localisation macroscopique de cette activité ont été investiguées chez *A. bipunctata*. La chromatographie d'affinité et une analyse par HPLC ont été réalisées pour purifier et déterminer le poids moléculaire des GST de coccinelle. Les techniques de chromatofocusing et d'électrophorèse ont été utilisées afin de compléter la purification et la

caractérisation des isoenzymes de GST. Les paramètres cinétiques de chaque isoenzyme ont été calculés en utilisant une gamme de concentrations de substrats benzéniques et de glutathion. Enfin, des anticorps polyclonaux anti-GST ont été produits et testés comme méthode sensible de détection. L'étude des GST de la coccinelle est discutée dans le cadre des interactions tritrophiques plantes hôtes - proies - prédateurs.

### ***Matériel et méthodes***

#### **Préparation des homogénats d'insectes**

Les coccinelles ont été individuellement broyées dans un tube eppendorf contenant du tampon phosphate, pH 7,0. Les homogénats ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 4°C et à 15000 g dans une centrifugeuse Rotor Sigma 2K15.

#### **Mesure de l'activité glutathion S-transférases et dosage des protéines totales**

Le dosage des protéines et la mesure de l'activité GST ont été réalisés comme décrit précédemment au chapitre 9.

#### **Purification**

##### ***Préparation des échantillons et élimination des colorants naturels***

Les insectes proviennent de l'élevage de masse du laboratoire. La méthode de production est décrite au chapitre 6. Les coccinelles adultes (150 individus) sont broyées à l'aide d'un ultraturax dans du tampon phosphate 20mM, pH 7,0. L'homogénat est ensuite

ultracentrifugé (1h à 100,000g) et le surnageant exempt de la couche lipidique superficielle est appliqué sur une colonne PD10 (Pharmacia) avant de réaliser la séparation par chromatographie d'affinité.

### ***Chromatographie d'affinité (Sépharose 6B)***

La colonne d'affinité de Sépharose 6B a été préparée suivant la description de Simons et Vander jagt (1977). La colonne est éluée avec du tampon phosphate 20mM, pH 7,0 jusqu'au moment où aucune protéine n'est plus détectée lors de la surveillance de l'absorbance à 280 nm. Les GST sont ensuite éluées avec un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 9,6 contenant 15mM de GSH. Les fractions qui présentent de l'activité GST sont regroupées, le volume total est réduit à 2,5 ml par ultrafiltration sur une membrane YM-10.

### ***Technique de chromatofocusing***

L'échantillon issu de la chromatographie d'affinité est équilibré avec un tampon 25 mM imidazole-HCl, pH 7,4, sur une colonne PD10 et appliqué sur une colonne de chromatofocusing anionique Polybuffer 94 (1,0 x 35 cm), préalablement équilibrée avec un tampon 25 mM imidazole-HCl, pH 7,4. L'élution est réalisée avec du tampon Polybuffer 74, dilué à 1/16, et dont le pH est ajusté à 4,0 avec du HCl. Des fractions de 3 ml sont collectées et le pH est suivi avec un moniteur Pharmacia.

### ***Chromatographie liquide***

La chromatographie liquide (HPLC Hewlett Packard, modèle 1050) est utilisée pour déterminer le poids moléculaire natif des GST

purifiées par chromatographie d'affinité. L'échantillon est appliqué sur deux colonnes Macrosphere assemblées (GPC 300A, 7 $\mu$ ), préalablement calibrées avec un standard de poids moléculaire (Biorad).

### ***Chromatographie de filtration sur gel (Superdex 75)***

Une fraction à forte activité GST issue de la chromatographie d'affinité est dialysée contre un tampon Tris-HCl pendant 24 h et est ensuite déposée sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex 75 (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le même tampon. L'élution a été réalisée en utilisant un système FPLC constitué d'un Chromatography Rack II (Pharmacia), d'un programmeur de gradient GP-250 Plus, d'un collecteur de fractions FRAC-200, de deux pompes P-500 et d'un moniteur UV-M. Un contrôleur de chromatographie LCC-500 Plus a été utilisé pour gérer le système FPLC réglé à un débit de 0,5 ml/min de 10 mM de tampon Tris pH 8,0. Des fractions de 1ml ont été collectées.

### **Détermination des paramètres cinétiques**

Les cinétiques enzymatiques des GST purifiées d'*A. bipunctata* sont déterminées en mesurant l'activité envers une gamme de concentrations en substrats (variant de 0,5 à 0,05 mM de DNIB, CDNB ou DCNB et 1,0 à 0,1 mM de GSH). Les valeurs de la vitesse maximal ( $V_m$ ) et de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) pour chaque substrat sont calculées à partir des équations de Lineweaver-Burk.

### **Technique d'électrophorèse (SDS-PAGE)**

La préparation des échantillons et les conditions de séparation des protéines sur les gels SDS-PAGE sont identiques à la description donnée dans la partie matériel et méthodes du chapitre 10.

### **Production d'anticorps polyclonaux**

La production d'anticorps a été réalisée par immunisation d'un lapin avec les glutathion S-transférases d'*A. bipunctata* purifiées après l'élution sur la colonne d'affinité. Les échantillons de protéines ont été fournis à l'Unité de Microbiologie et de Biologie animale de la FUSAGx en solution dans un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 9,6. Cinq injections de 50 µg de GST purifiées ont été réalisées aux jours 1, 14, 28, 147 et 168. L'antisérum produit a été prélevé aux jours 22, 35, 38, 42, 156, 160, 164 et 177, aliquoté et conservé à -20°C.

### **Détection immunologique des protéines immobilisées (Western blot)**

La présence d'anticorps anti-GST dans le sérum et la spécificité de ces derniers ont été mises en évidence après transfert des protéines d'un gel SDS-PAGE sur un support solide suivi d'une détection immunologique des protéines immobilisées. Différents échantillons protéiniques ont été utilisés :

- les GST purifiées d'*A. bipunctata*,
- des homogénats bruts d'*A. bipunctata* ainsi que de plusieurs espèces prédatrices de Coccinellidae et d'une espèce aphidiphage de Syrphidae,
- des homogénats bruts d'espèces de pucerons.

Les insectes sont broyés dans du tampon phosphate 20mM et pH 7,0. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 15000g pendant 15 minutes et à 4°C. Un aliquote du surnageant est déposé sur le gel SDS-PAGE. Après migration des échantillons protéiniques suivant le protocole décrit au chapitre 11 en utilisant un système S-lab gel (BioRad), les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène fluoride, Millipore) en présence de tampon 25mM Tris, 10mM glycine, 20% méthanol, pH 8,5 dans un système trans-Blot Biorad à 400 mA pendant 1 heure. La membrane PVDF est incubée successivement dans une solution de 10% de lait écrémé et dans un tampon PBS (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 150 mM NaCl, 15mM KOH) 0,2% Tween 80 contenant l'antisérum de lapin à 1/500<sup>ème</sup> pendant 1h30 à température ambiante et sous légère agitation. Après plusieurs rinçages dans le PBS/Tween 0,2% et dans un tampon TBST (10mM Tris-HCl pH 8,8, 150 mM NaCl) et 0,2% Tween 80, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (anticorps anti-lapin IgG(Fc) conjugué à la phosphatase, Promega) à 1/7500<sup>ème</sup> pendant 1h à température ambiante et sous légère agitation. Après plusieurs rinçages dans le TBST/Tween 0,2%, la révélation phosphatase est réalisée pendant quelques secondes. La membrane est finalement rincée dans de l'eau distillée avant d'être séchée pour conservation.

## **Résultats**

### **Etude de la spécificité des GST envers divers substrats benzéniques**

Les activités GST mesurées avec les trois substrats CDNB, DCNB et DNIB sont déterminées à chaque stade de développement (Figures 42



et 43). De très faibles activités ont été observées avec le DCNB, communément utilisé pour mesurer l'activité GST chez les insectes mais des niveaux supérieurs d'activité GST ont été observés avec le DNIB et le CDNB. Ces deux derniers substrats ont été utilisés pour les mesures enzymatiques suivantes.

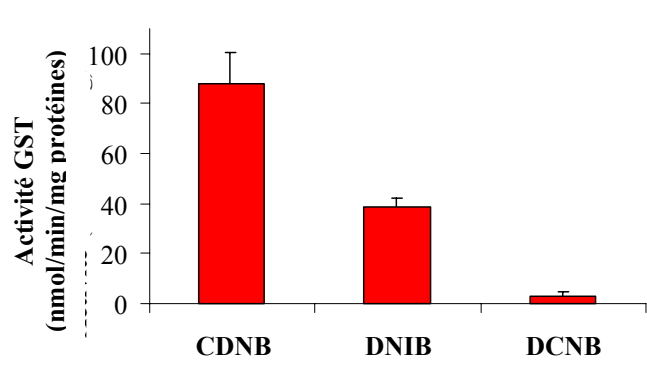


Figure 42 : Activités glutathion S-transférases d'adulte d'*Adalia bipunctata* en fonction de divers substrats benzéniques.

### **Expression de l'activité enzymatique aux différents stades de développement**

Les profils d'activité GST en fonction des stades de développement sont similaires pour les deux substrats. L'activité reste faible aux stades larvaires, augmente au stade de nymphe et atteint un maximum au stade adulte (Figure 43). Avec le CDNB, des activités GST doubles ont été observées chez les larves alors que les différences sont plus faibles aux stades nymphe et adulte. Ce dernier stade a été sélectionné pour étudier la localisation des GST dans l'organisme de l'insecte.

### **Localisation macroscopique des GST**

Au stade adulte, les individus ont été coupés en trois parties correspondant à la tête, le thorax et l'abdomen. Les élytres ont été

enlevées avant la dissection et ont été utilisées lors d'une série de mesures d'activité enzymatique. Plusieurs concentrations des deux substrats et de GSH ont été utilisées pour chaque partie d'insecte (Tableau 17).

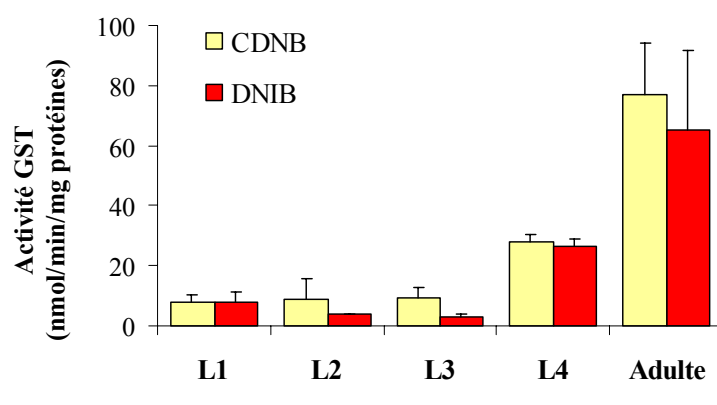


Figure 43 : Activités spécifiques des glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* envers le CDNB et le DNIB.

Des homogénats d'individus entiers ont été utilisés à chaque stade de développement. Les barres représentent l'écart type de la moyenne.

La plupart de l'activité GST a été localisée dans l'abdomen avec différentes concentrations de CDNB et de DNIB (respectivement 40-50% et 34-63%). Les valeurs correspondant à 1% d'activité GST au tableau 17 étaient de 0,83 à 1,37 et 0,45 à 0,06 nmol/min.mg pour des concentrations respectivement de 0,2 à 0,6 mM de CDNB et DNIB. Des niveaux significatifs d'activité GST ont été observés dans la tête et le thorax en fonction du substrat benzénique. Des activités supérieures ont été trouvées dans le thorax avec le DNIB (37-47%) en comparaison à celles obtenues avec le CDNB (13-19%). Près de 20% de l'activité GST totale ont été détectés dans les élytres avec 0,4 mM

et 0,6 mM de CDNB et avec 0,2 mM de DNIB. L'augmentation de la concentration de ce dernier substrat inhibe l'activité GST.

Tableau 17 : Localisation de l'activité glutathion S-transférases (en %) chez *Adalia bipunctata*<sup>a</sup>

Concentrations en substrat	Parties d'insecte			
	Tête	Thorax	Abdomen	Elytres
CDNB				
0,2 mM	28 ± 6 a	19 ± 3 c	50 ± 8 feg	3 ± 0 b
0,4 mM	23 ± 5 ac	16 ± 4 ac	40 ± 10 deg	21 ± 5 ac
0,6 mM	27 ± 8 a	13 ± 3 a	43 ± 7 deg	17 ± 3 a
DNIB				
0,2 mM	23 ± 7 ac	21 ± 4 c	34 ± 6 d	22 ± 2 c
0,4 mM	0 ± 0 b	37 ± 9 de	63 ± 13 f	0 ± 0 b
0,6 mM	0 ± 0 b	47 ± 11 deg	53 ± 9 fg	0 ± 0 b

<sup>a</sup> les mesures enzymatiques ont été réalisées avec une concentration constante de 1mM en GSH. Des différences significatives sont indiquées avec des lettres différentes. Les pourcentages ont été analysés par test d'égalité de proportions (après transformation angulaire) à  $\alpha = 0,05$

### Chromatographie d'affinité (Sepharose 6B)

Les GST des adultes d'*A. bipunctata* ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne Sepharose 6B. Le profil d'élution de l'enzyme est présenté à la Figure 44. Le protocole de purification est repris au Tableau 18. Plus de 77% de l'activité GST totale envers le CDNB ont été liés à la colonne.

Tableau 18 : Purification des glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata*

Étapes de purification	Protéines (mg/ml)	Activité ( $\mu\text{mol}/\text{min. mg}$ )	Rendement (%)	Facteur de purification
Homogénat de départ	3,94	0,093	100,0	1,00
Après PD10	2,59	0,261	98,5	2,79
Fraction liée par affinité	0,91	1,053	77,3	11,25

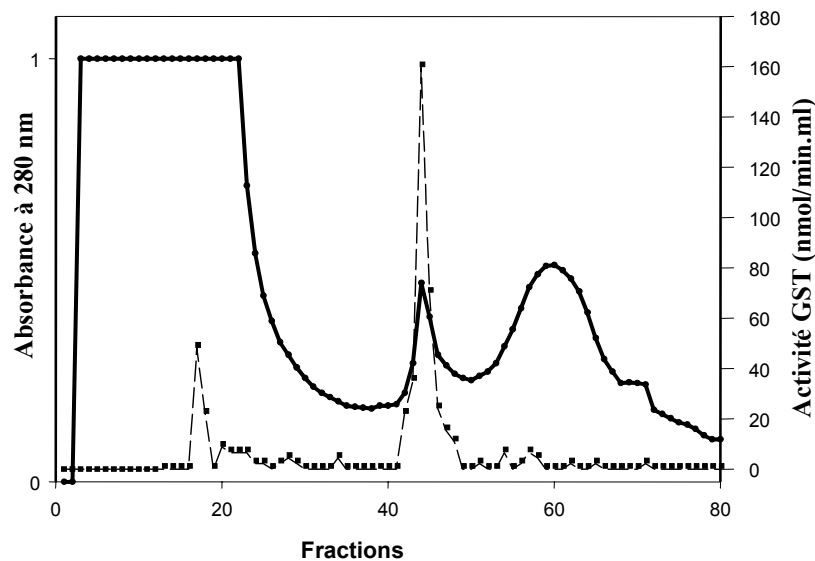


Figure 44 : Profil d'élution des glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* sur une colonne d'affinité Sepharose 6B.

### Technique d'électrophorèse (SDS-PAGE)

L'électrophorèse SDS-PAGE en utilisant les fractions de GST fixées lors de l'étape d'affinité révèle la présence de trois bandes de 25 à 28 kDa de masse moléculaire (Figure 45).

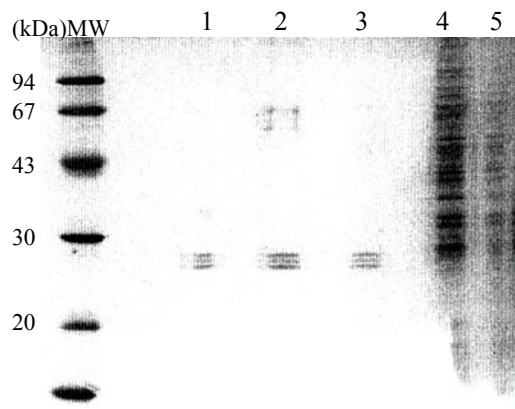


Figure 45 : Gel SDS-PAGE de la fraction liée des glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* après chromatographie d'affinité. MW : marqueur moléculaire, (1-3) : trois répétitions des GST purifiées, (4) homogénat après ultracentrifugation et (5) après élution sur colonne PD10.

## Chromatographie liquide

La masse moléculaire native des GSTs d'*A. bipunctata* a été estimée par HPLC à 69kDa (Figure 46).

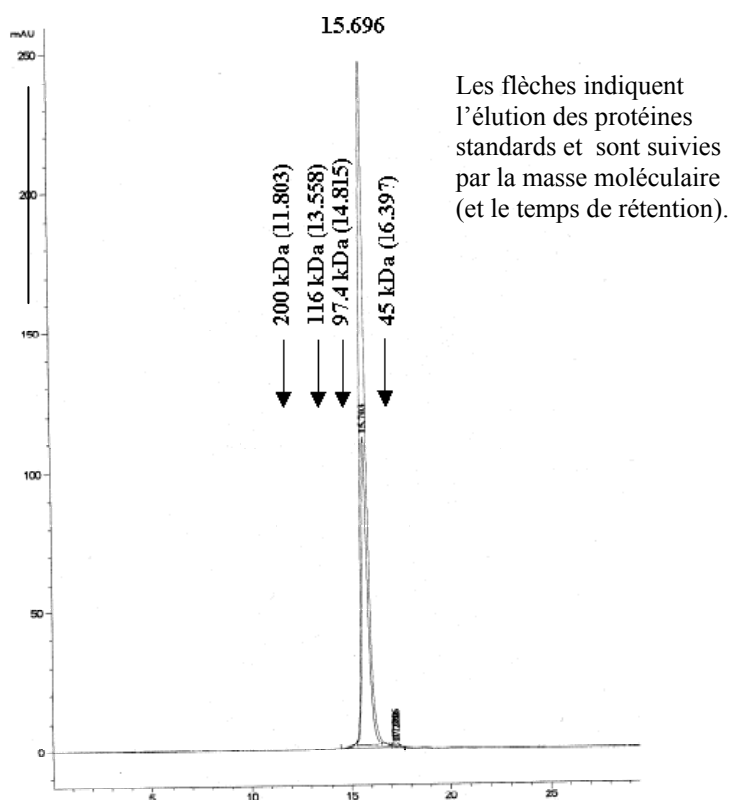


Figure 46 : Chromatogramme HPLC des glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* après la chromatographie d'affinité.

## Chromatographie de filtration sur gel (Superdex 75)

Un seul pic de protéines correspondant aux fractions présentant l'activité glutathion S-transférases a été observé lors de l'élution sur la colonne Superdex 75 de la fraction de GST d'*A. bipunctata* liée précédemment par chromatographie d'affinité (Figure 47).

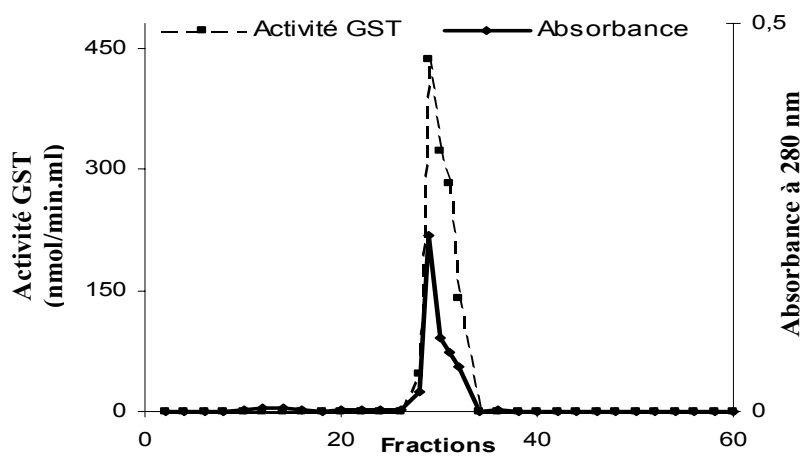


Figure 47 : Profil d'élution des glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* après la chromatographie d'affinité sur une colonne Superdex 75.

### Technique de chromatofocusing

Les fractions de GST purifiées ont été regroupées et éluées sur une colonne de chromatofocusing à une gamme de pH 7-4 (Figure 48).

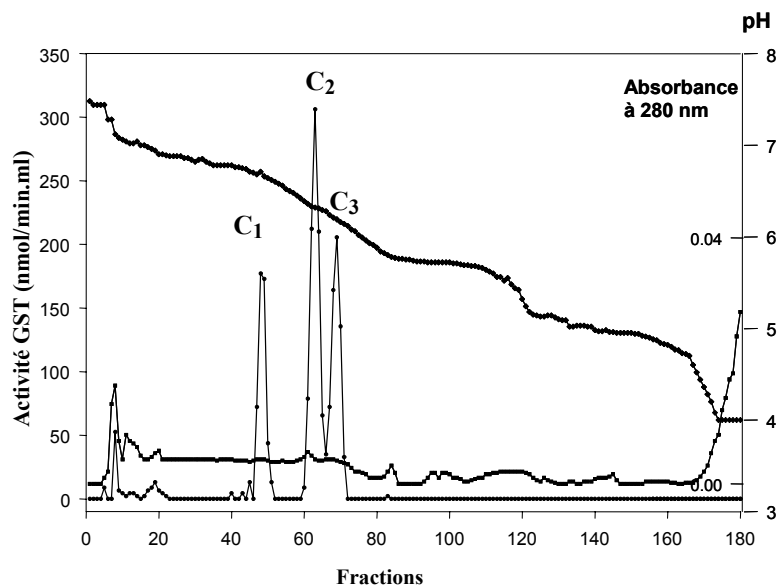


Figure 48 : Profil d'élution des isoenzymes de glutathion S-transférases d'*Adalia bipunctata* par chromatofocusing à une gamme de pH 7-4 en utilisant la fraction liée de l'étape d'affinité.

Trois isoenzymes ont été séparés et appelés C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> en fonction de leur pI décroissant. Ces résultats montrent l'existence de plusieurs isoenzymes de GST dans l'extrait cytosolique des coccinelles. Un pic supplémentaire de faible activité GST a été fixé sur la colonne. Aucune activité GST n'a été éluée lors du rinçage de la colonne avec du NaCl 1M après le chromatofocusing.

### Détermination des paramètres cinétiques des isoenzymes

L'activité des isoenzymes isolés lors du chromatofocusing a été étudiée avec le CDNB et le DNIB. Les paramètres cinétiques ont été déterminés pour chaque isoenzyme envers une large gamme de concentrations de CDNB ou de DNIB et de GSH (Tableau 19). L'activité spécifique de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> en utilisant 1mM de GSH et de CDNB est respectivement de 1,78, 1,65 et 1,83  $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ .

Tableau 19 : Quelques propriétés des isoenzymes de GST purifiés à partir de la coccinelle *Adalia bipunctata*<sup>a</sup>

<i>Propriétés</i>	<i>Isoenzymes</i>		
	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>
PI	6,66	6,36	6,21
K <sub>m</sub> (CDNB) en (mM)	0,154	2,550	1,556
V <sub>max</sub> (CDNB) en ( $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ )	0,285	0,841	0,249
K <sub>m</sub> (DNIB) en (mM)	-	-	0,682
V <sub>max</sub> (DNIB) en ( $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ )	-	-	0,026
K <sub>m</sub> (GSH) en (mM)	0,269	0,338	0,471
V <sub>max</sub> (GSH) en ( $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ )	0,413	0,051	0,005

<sup>a</sup> V<sub>max</sub> et K<sub>m</sub> ont été mesurées avec une concentration constante de 1mM de GSH ou de substrat benzénique.

## Détection immunologique des protéines immobilisées (Western blot)

La détection des GST purifiées ou en solution dans les homogénats d'insectes en utilisant les anticorps polyclonaux après électrophorèse et immobilisation des protéines par Western blot sur une membrane PVDF est présentée (Figures 49 et 50). La réponse du sérum sur les GST purifiées de la coccinelle est évidente. La détection de bandes correspondant à des protéines de mêmes masses moléculaires que les GST purifiées a également été observé dans l'extrait brut d'*A. bipunctata*. Des réactions croisées ont été détectées envers des protéines présentes dans l'homogénat de plusieurs espèces de coccinelles et envers le syrphé *E. balteatus*. Une faible bande a aussi été observée dans les extraits de pucerons.

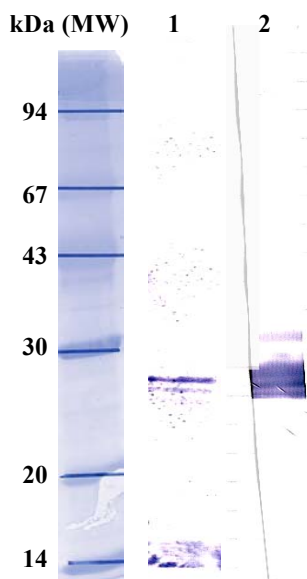


Figure 49 : Immuno-détection des GST d'un extrait d'enzymes purifiés (1) et d'un extrait brut d'*Adalia bipunctata*(2)

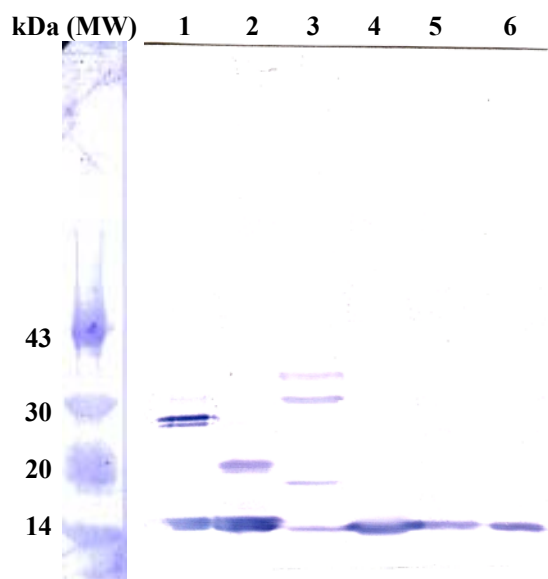


Figure 50 : Test de spécificité de l'anticorps anti-GST d'*A. bipunctata* envers des extraits bruts d'*A. bipunctata* (1), de *Coccinella 7-punctata* (2), *Episyrphus balteatus* (3), *Calvia 14-guttata* (4), de *Myzus persicae* (5) et d'*Aphis fabae* (6).



## **Discussion**

L'activité GST totale envers deux substrats a été étudiée à chaque stade de développement. Les niveaux les plus élevés d'activité GST ont été retrouvés dans les nymphes et les adultes d'*A. bipunctata*. Certaines espèces d'insecte, comme *Musca domestica*, ne présentent pas d'augmentation d'activité enzymatique du stade larvaire au stade nymphe (Saleh et al., 1978) mais d'autres études sur des Coléoptères sont en concordance avec les résultats de ce chapitre. *Tenebrio molitor* présente des activités GST supérieures au stade adulte plutôt qu'au stade nymphe, alors que les larves ne montrent que de faibles activités GST (Kostaropoulos et al., 1996). Gillott (1980) a suggéré que les niveaux croissants d'activité GST au stade nymphe fournissent une protection contre des xénobiotiques potentiels dans l'environnement palliant la vulnérabilité due à l'immobilisme de l'insecte à ce stade. En effet, les nymphes ne sont pas capables de se déplacer et d'éviter les substances toxiques comme l'application de pesticides. De plus, la production des tissus de l'adulte et le taux élevé de biosynthèse dans la nymphe sont impliqués dans la capacité accrue de l'insecte de détoxiquer les composés toxiques potentiels (Doctor et Fristrom, 1985).

Des différences importantes de distribution de l'activité GST ont été observées dans les diverses parties du corps des coccinelles. En fonction de la concentration et de la nature du substrat benzénique, de 40 à 63% de l'activité GST sont retrouvés dans l'abdomen. Chez *M. domestica*, plus de 60% de l'activité GST totale ont été détectés dans l'abdomen. De hauts niveaux de GST ont été observés dans les

corps gras et le tube digestif de diverses espèces d'insecte comme la mouche domestique (Konno et Shishido, 1992). La tête de la coccinelle à deux points présente aussi des activités élevées de GST envers le CDNB tandis que les élytres possèdent également de l'activité GST. Plus qu'une protection contre les stress physiques, cette partie du corps peut aussi constituer une barrière efficace de détoxification de substances chimiques. Le thorax contient des enzymes GST mais démontre de plus faibles activités que dans la tête lorsque le substrat CDNB a été utilisé. Des changements de distribution des GST ont été observés lorsque le dernier substrat a été remplacé par le DNIB. En effet, des activités supérieures ont été retrouvées dans le thorax et aucune activité n'a été observée dans la tête. Les différences de spécificité de substrat suggèrent qu'au moins deux isoenzymes de GST sont présents chez *A. bipunctata*. De plus, des changements de réponse des GST en relation avec le substrat benzénique en fonction de la partie du corps considérée suggèrent que les isoenzymes sont différemment distribués dans l'insecte Coléoptère. L'hétérogénéité de la spécificité de substrat entre les isoformes de GST a une importance physiologique significative dans la détoxification de composés endogènes et exogènes (Beckett et Hayes, 1993).

Pour identifier le nombre d'isoenzymes, des adultes d'*A. bipunctata* ont été utilisés pour purifier les GST par chromatographie d'affinité et par chromatofocusing. En utilisant une colonne Sepharose 6B, la majorité de l'activité GST envers le CDNB a été liée à la colonne d'affinité. Le rendement de purification obtenu (>77%) est assez élevé comparé à d'autres purifications de GST d'insecte (de 3 à 26 % chez plusieurs espèces de Lépidoptères (Yu, 1989); 34% chez *T. molitor*

(Kostaropoulos et Papadopoulos, 1998). Un facteur de purification de 11,25 a été obtenu par chromatographie d'affinité. Même si c'est assez faible, ce facteur est en concordance avec ceux d'autres procédures de purification de GST d'insectes. Les GST de *Trichoplusia ni* (Hübner), *Spodoptera frugiperda* (Smith) et *T. molitor* ont été purifiées avec un facteur de 9 à 15 (Yu, 1989; Kostaropoulos et al., 1996). Après la première étape, les GST liées par affinité ont été étudiées par électrophorèse en conditions dénaturantes et trois bandes ont été révélées sur le gel. Yu (1989) a démontré qu'une procédure en deux étapes (précipitation au sulfate d'ammonium suivie par une chromatographie d'affinité) a déjà permis de purifier des glutathion S-transférases. De multiples GST ont été observées chez la blatte (Usui et al., 1977), la mouche domestique (Clark et al., 1984; Fournier et al., 1992) et chez plusieurs espèces de moustique (Prapanthadara et al., 2000). La masse moléculaire des sous-unités de GST retrouvées chez cinq espèces phytophages de Lépidoptère varie de 27 à 32 kDa (Yu, 1989). Comme chez *A. bipunctata*, *Heliothis virescens* (Fabricius) présente trois sous-unités sur un gel SDS-PAGE. Comme les GST sont des dimères (homo- ou hétérodimères, Grant et Matsumura, 1988), la présence de trois sous-unités de GST chez *A. bipunctata* pouvait engendrer un maximum de 6 isoenzymes. Trois formes enzymatiques ont été observées lors du chromatofocusing. La masse moléculaire de l'enzyme natif a été estimée par HPLC à 69 kDa. Ce résultat est légèrement supérieur à ceux de travaux précédents, où la taille de ces enzymes purifiés à partir d'insectes a été estimée à 50-60 kDa par filtration sur gel et par électrophorèse (Fournier et al., 1992).

Les activités spécifiques des isoenzymes de GST issus du chromatofocusing, appelés C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub>, sont similaires et correspondent à des facteurs de purification de 17,7 à 19,7. Les paramètres cinétiques ont été calculés pour les trois isoenzymes isolés de GST. De faibles variations ont été observées lorsque les valeurs de K<sub>m</sub> envers le GSH de chaque isoenzyme ont été comparées. La comparaison des K<sub>m</sub> d'une cinquantaine de GST envers le GSH avait démontré la plus grande stabilité de ces constantes cinétiques (entre 0,19 et 0,79 mM) par rapport à la variabilité élevée des K<sub>m</sub> vis-à-vis des substrats benzéniques (Saleh et al, 1978). Aussi, d'importantes différences de K<sub>m</sub> envers le CDNB ont été observées en fonction de l'isoenzyme de GST d'*A. bipunctata*. Le K<sub>m</sub> de C<sub>1</sub> est plus faible que ceux des deux autres formes (10 et 16 fois respectivement comparées à C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>) et traduit la plus grande affinité de cet isoenzyme envers le CDNB. Ces résultats complètent l'étude de l'induction de l'activité GST chez *A. bipunctata* en fonction de la présence de substances allélochimiques dans la proie, émises par la plante hôte de Brassicaceae et dans des diètes artificielles (chapitre 9). Si l'évolution de l'activité GST chez la coccinelle prédatrice a été suivie en utilisant deux substrats, les inductions d'activité enzymatique ont été principalement observées envers le CDNB. Nous pouvons conclure que les isoenzymes C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> qui présentent respectivement le plus d'affinité et le plus d'activité envers le CDNB sont certainement les formes enzymatiques majoritairement impliqués dans la réponse de l'insecte face à la présence de substances secondaires dans la plante hôte. Néanmoins, une activité supérieure envers le DNIB a été

observée lorsque les coccinelles ont été exposées à des ITC. L'isoenzyme C<sub>3</sub> métabolise le plus efficacement le DNIB. Cette forme enzymatique est la moins influencée par la présence de substances allélochimiques dans le régime alimentaire de *A. bipunctata* et semble être peu impliquée dans l'adaptation du prédateur aux métabolites secondaires des plantes de Brassicaceae. Des efficacités catalytiques supérieures (variation d'un facteur 3) de la conjugaison au glutathion avec le CDNB ont également été observées avec les isoenzymes de GST d'*Anopheles dirus* (Prapanthadara et al., 2000).

Lorsqu'on s'intéresse aux valeurs de V<sub>max</sub> des GST d'*A. bipunctata*, une forme diffère des autres avec le CDNB et le GSH quand leur concentration varie. Alors que la V<sub>max</sub> envers le CDNB pour C<sub>2</sub> est trois fois supérieur aux paramètres de C<sub>1</sub> et de C<sub>3</sub>, la V<sub>max</sub> envers le GSH de C<sub>1</sub> est 8 et 81 fois plus élevée que celles correspondant respectivement à C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>. L'activité conjuguée au CDNB d'une isoenzyme de *T. molitor* est 15 fois supérieure à celles d'autres isoenzymes (Kostaropoulos et Papadopoulos, 1998). Les paramètres cinétiques pour le DNIB ont été calculés uniquement pour C<sub>3</sub>. Le DNIB n'a pas été reconnu comme substrat ou a inhibé l'activité des isoenzymes C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>. Cette différence de spécificité de substrat doit être couplée aux résultats concernant la distribution des GST dans les différentes parties de l'insecte.

Dans le contexte multitrophique de l'étude, il est intéressant de comparer le bagage GST des pucerons et du prédateur. Ce dernier présente des activités totales GST quatre et deux fois supérieures respectivement à celles de *B. brassicae* et de *M. persicae*. Cette

observation démontre que les prédateurs entomophages ne produisent pas nécessairement une quantité et une diversité plus faibles d'enzymes de détoxification par rapport à leurs proies phytophages. En effet, Yu (1987) a observé que l'hémiptère prédateur *Podisus maculiventris* présente systématiquement des activités GST largement inférieures à celles de cinq espèces de proies phytophages. La théorie développée par Clark (1989) est infirmée par nos résultats. Selon cet auteur, les insectes entomophages se nourrissant d'insectes phytophages biochimiquement adaptés à des plantes hôtes contenant des métabolites secondaires ne doivent pas posséder d'adaptions enzymatiques particulières puisque leurs proies ont déjà réalisé la détoxification des substances allélochimiques d'origine végétale.

L'électrophorèse en conditions dénaturantes des GST purifiées chez *M. persicae* n'a révélé la présence que d'une bande alors que trois sous-unités de GST ont été observées dans les mêmes conditions chez *A. bipunctata*. Les différences d'affinité des GST de puceron et de coccinelle en fonction de la colonne de chromatographie utilisée confirme la variabilité des GST en fonction de l'espèce d'insecte considérée. L'interprétation de la variation du nombre d'isoenzymes de GST chez les représentants des deux niveaux trophiques considérés doit cependant être prudente. En effet, les rendements de purification ne sont pas identiques (environ 50% chez *M. persicae* en couplant les résultats relatifs aux colonnes d'affinité utilisées et plus de 75% chez *A. bipunctata*). D'autres isoenzymes de GST pourraient être présents dans les fractions non liées de l'étape d'affinité et présentant de

l'activité GST. Jusqu'à présent, aucune étude approfondie des GST sur plusieurs niveaux trophiques n'avait été réalisée.

Les tests de spécificité des anticorps anti-GST de coccinelle ont permis d'observer des profils différents en fonction de l'espèce entomologique source des protéines immobilisées sur les membranes. Des réactions croisées ont été observées avec les homogénats des diverses espèces de prédateurs testées, coccinelles et syrphe, mais aussi avec les taxa aphidiens. Si les sous-unités de GST d'*A. bipunctata* sont révélées par l'utilisation des anticorps produits, la bande de 28kDa correspondant aux GST dénaturées de *M. persicae* n'est pas visualisée. Cette absence de réactivité permet de confirmer que les GST du puceron généraliste et de son prédateur n'appartiennent pas à la même classe (Mannervik, 1985). Aussi, l'adaptation accrue du prédateur *E. balteatus* pour faire face à la présence de métabolites secondaires de Brassicaceae dans les proies aphidiennes (Vanhaelen et al, 2001) semble liée à la multiplicité des sous-unités de GST démontrée lors de nos expérimentations. Cependant, nos observations permettent de conclure à la présence de GST appartenant à la même classe chez l'espèce de syrphe et chez la coccinelle à deux points.

### **Conclusions**

L'activité GST spécifique totale augmente en fonction du stade de développement de la coccinelle. Chez l'imago, cette activité est principalement localisée dans l'abdomen mais est aussi présente dans les élytres. Les variations d'activités spécifiques des GST de

coccinelle envers plusieurs substrats benzéniques dans les différentes parties du corps de l'insecte traduisent la distribution de plusieurs isoenzymes de GST présentant des propriétés catalytiques différentes. Trois isoformes de GST d'*A. bipunctata* ont été purifiées et caractérisées par méthodes chromatographiques et électrophorétiques. Les masses moléculaires des trois isoenzymes obtenus ont été estimées entre 26 et 28kDa. Deux des formes enzymatiques sont principalement impliquées dans la métabolisation des glucosinolates alors que la troisième isoenzyme, présentant une affinité accrue envers le DNIB participe à la détoxification des isothiocyanates.

Si l'induction des GST est une adaptation des insectes face à la présence des substances secondaires végétales, le profil de ces enzymes diffère en fonction du niveau trophique considéré dans le modèle étudié, puceron ou prédateur généralistes. L'utilisation des anticorps anti-GST d'*A. bipunctata* a permis de confirmer les différences observées précédemment des GST de *M. persicae* et de la coccinelle. Un nombre plus élevé de sous-unités de GST a été observé chez *E. balteatus* et peut être corrélé à l'adaptation accrue de cette espèce prédatrice pour faire face aux substances allélochimiques de Brassicaceae.



## Conclusions générales

Plusieurs approches ont été envisagées pour comprendre l'écologie chimique des interactions tritrophiques entre les Brassicaceae, les pucerons (spécialiste ou généraliste) et la coccinelle prédatrice *Adalia bipunctata*.

- (1) Etudes comportementales : la sélection des proies aphidiennes par la coccinelle aux stades larvaire et adulte est significativement influencée par la présence de substances volatiles émises par certains pucerons lorsqu'ils sont broyés. L'effet attractif du (E)- $\beta$ -farnésène, phéromone d'alarme de pucerons, émis par deux espèces aphidiennes a été confirmé. Aucune attraction du prédateur n'a été observée avec le puceron spécialiste *B. brassicae* (seul ou en association avec la plante hôte) ni en présence de segments de tige de Brassicaceae. Même si *A. bipunctata* est polyphage, les proies potentielles de ce prédateur ne sont pas toutes perçues de manière identique. La présence de substances allélochimiques produites par la plante hôte de la proie semble être impliquée dans ces variations comportementales chez la coccinelle aphidiphage.
  
- (2) Analyses chimiques : des substances secondaires (glucosinolates et isothiocyanates) ont été identifiées dans les deux premiers niveaux trophiques, les espèces de Brassicaceae et le puceron *B. brassicae* élevé sur ces plantes hôtes. L'absence d'effet attractif des crucifères et du puceron

spécialiste lorsqu'ils ont été utilisés comme sources d'odeurs dans la première partie de l'étude n'est pas directement liée à la présence des molécules allélochimiques volatiles (les isothiocyanates). Le (E)- $\beta$ -farnésène a été identifié comme seule molécule volatile émise par les pucerons broyés et attractive pour le prédateur.

(3) Observations biologiques : le taux de reproduction des pucerons, spécialiste et généraliste varie avec la teneur en glucosinolates de la plante. L'influence des substances végétales secondaires ingérées ou émises par les pucerons a été démontrée en observant les paramètres de développement et de reproduction de la coccinelle prédatrice. Plus la teneur en glucosinolates dans le puceron (directement liée aux taux de GLS dans la plante) est élevée, plus les paramètres biologiques sont perturbés. L'effet négatif plus marqué du puceron *B. brassicae* est lié à l'émission accrue d'isothiocyanates. Un effet environnemental maternel de la qualité de la proie a été observé.

(4) Etudes biochimiques : le puceron spécialiste *B. brassicae* produit une myrosinase endogène pour dégrader les substances secondaires végétales. Ce système myrosinase-glucosinolate fournit un moyen de défense efficace contre le prédateur. Ce dernier et l'espèce aphidienne généraliste ont développé le système glutathion S-tranférases pour détoxifier les molécules allélochimiques de plantes hôtes, les glucosinolates et leurs produits de dégradation. Un modèle de co-évolution

tritrophique plantes - pucerons (spécialiste et généraliste) - coccinelle a été proposé sur base de ces études biochimiques. La purification et la caractérisation de la myrosinase de *B. brassicae* et des glutathion S-transférases de *M. persicae* et de la coccinelle *A. bipunctata* ont été réalisées. La présence de plusieurs isoenzymes de GST a été démontrée chez les espèces polyphages, le puceron *M. persicae* et la coccinelle prédatrice *A. bipunctata*.

- (5) Approche moléculaire : la caractérisation de la myrosinase du puceron spécialiste et des GST de l'Homoptère et du prédateur généralistes a été poursuivie par méthode électrophorétique. Les profils GST des représentants des deux niveaux trophiques étudiés ont été différenciés. Un nombre plus élevé d'isoenzymes de GST a été observé chez le prédateur.
- (6) Etudes immunologiques : des anticorps anti-GST de coccinelles ont été produits et ont permis de détecter les GST en solution dans les homogénats d'*A. bipunctata*. Des réactions croisées ont été observées envers les homogénats d'autres espèces prédatrices de coccinelles et de syrphes mais aussi de pucerons. Ces anticorps seront utilisés comme outil de détection dans diverses manipulations présentées dans les perspectives de recherches.

Pour conclure, les substances secondaires de Brassicaceae comme celles de bons nombres de taxa végétaux régissent les relations entre les plantes et l'entomofaune phytophage qui leur est associée.

L'accumulation de substances secondaires dans le ravageur phytophage représente une protection efficace contre les auxiliaires entomophages, soit en modifiant les paramètres biologiques de l'insecte soit en provoquant une mortalité importante dès le stade larvaire. Avant de mettre en œuvre des programmes de lutte biologique basés sur l'utilisation d'auxiliaires entomophages, il est primordial de déterminer les facteurs biotiques influençant la biologie des organismes impliqués : les plantes, les ravageurs phytophages et les insectes utiles. La compréhension de l'écologie chimique régissant les relations existant entre niveaux trophiques constitue l'étape clé de l'efficacité et de la réussite des méthodes de lutte biologique envisagées.

## **Perspectives**

La détermination des profils en GST chez *M. persicae* et chez la coccinelle a été réalisée par méthodes chromatographiques et électrophorétiques à une dimension. Afin d'obtenir une information globale en une seule manipulation, la technique d'électrophorèse à deux dimensions des échantillons purifiés sera mise en œuvre pour s'assurer du nombre d'isoenzymes de GST dans les deux niveaux trophiques étudiés.

Sur base du modèle co-évolutif plantes - insectes étudié, une relation entre l'activité et le profil en GST et la polyphagie des pucerons a été proposée. Afin de confirmer cette hypothèse, les GST de plusieurs espèces de pucerons (spécialistes de Brassicaceae et d'autres familles botaniques ainsi que d'autres généralistes) seront purifiées et

caractérisées par électrophorèses à deux dimensions, suivies par des analyses spectrométriques ciblées comme le SM-Maldi-Tof. Après avoir été immobilisées sur membrane par Western blot, les isoformes de GST pourront être séquencées. L'étude comparative de ces séquences permettra de différencier et de classer les GST qui auront été isolées.

L'utilisation des anticorps polyclonaux anti-GST de coccinelle s'est révélée être un outil sensible de détection des GST d'*A. bipunctata*. Plusieurs approches supplémentaires à celles qui ont été entreprises vont être envisagées. D'abord, l'étude de l'induction des GST par les substances allélochimiques de Brassicaceae. En effet, si une augmentation significative de l'activité GST totale a été démontrée lorsque les prédateurs sont exposés aux substances secondaires végétales, les informations disponibles sur l'implication prépondérante d'une des isoformes dans ce phénomène sont encore trop lacunaires. Afin d'identifier précisément le (ou les) isoenzyme(s) induit(s) et responsable(s) de l'adaptation du prédateur face aux substances allélochimiques, des coccinelles seront nourries avec diverses combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes. Le système enzymatique GST des prédateurs sera ensuite étudié en électrophorèse à deux dimensions et les anticorps seront utilisés comme moyen d'immuno-détection des GST. Ensuite, l'utilisation des anticorps anti-GST sera également envisagée comme méthode de criblage d'une banque d'ADNc une fois que celle-ci sera construite. Une approche similaire sera entreprise pour les pucerons.

## Liste bibliographique

- Agelopoulos N.G., Hooper A.M., Maniar S.P., Pickett J.A., Wadhams L.J. 1999. A novel approach for isolation of volatile chemicals released by individual leaves of a plant in situ. *J. Chem. Ecol.* 25, 1411-1425.
- Ahman I. 1982. Toxicities of host secondary compounds to eggs of *Brassica* specialist *Dasineura brassicae*. *J. Chem. Ecol.* 12, 1481-1488.
- Aliabadi A., Whitman D.W. 2001. Semiochemistry of crucifers and their herbivores. In: *Insects and Plant Defence Dynamics*, Ananthakrishnan T.N., Science Publishers, Enfield, USA, 71-94.
- Altieri M.A., Lewis W.J., Nordlund D.A., Gueldner R.C., Todd J.W. 1981. Chemical interactions between plants and *Trichogramma* wasps in Georgia soybean fields. *Protection Ecology* 3, 259-263.
- Barbosa P., Letourneau D.K. 1988. *Novel Aspects of Insect-Plant Interactions*. New York, John Wiley and sons, pp. 362.
- Bargen H., Saudhof K., Poehling H-M. 1998. Prey finding by larvae and adult females of *Episyrphus balteatus*. *Ent. Exp. & Appl.* 87, 245-254.
- Barnes M.M., James S.P., Wood P .B. 1959. *Biochem. J.* 71, 680-692. In: Chasseaud, L.F. 1973. The nature and distribution of enzymes catalising the conjugation of glutathione with foreign compounds. *Drug Metab. Rev.*, 2, 185-220.
- Bartlett RJ, Mikolajczak KL. 1989. Toxicity of compounds derived from *Limnanthes alba* seed to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82, 1054-1060.
- Bartlett E. 1996. Chemical cues to host-plant selection by insect pests of oilseed rape. *Agric. Zoo. Rev.* 7, 89-116.
- Baudet J.J., Burghart P., Evrard J. 1988. Tourteau à basse teneur en glucosinolates. "Cahier technique Colza", Ed. CETIOM, Paris.

- Beckett G.J., Hayes J.D. 1993. Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.* 30, 281-380.
- Benn M. 1977. Glucosinolates. *Pure Appl. Chem.* 49, 197-210.
- Berenbaum M.R. 1995. The chemistry of defense: theory and practice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2-8.
- Bernasconi M.L., Turlings T.C.J., Ambrosetti L., Bassetti P., Dorn S. 1998. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Ent. Exp. & Appl.* 87, 133-142.
- Birch A.N.E., Griffiths D.W., Mac Farlane Smith W.H. 1990. Changes in forage and oilseed rape (*B. napus*). Root glucosinolates in response to attack by turnip root fly (*Delia floralis*). *J. Sci. Food Agric.* 51, 309-320.
- Björkman R., Janson J.C. 1972. Studies on myrosinase. I. Purification and characterization of a myrosinase from a white mustard seed (*Sinapis alba* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 276, 508-518.
- Björkman R. 1976. Plant myrosinase. In: Vaughan JG, MacLeod AJ and Jones BMG, editors. *The Biology and Chemistry of Cruciferae*. London: Academic Press. p 191-205.
- Blackman R.L. 1965. Studies on specificity in Coccinellidae. *Ann. Appl. Biol.* 56, 336-338.
- Blackman R.L. 1967a. The effects of different aphid foods on *Adalia bipunctata* L. and *Coccinella 7-punctata* L. *Ann. Appl. Biol.* 59, 207-219.
- Blackman R.L. 1967b. Selection of aphid prey by *Adalia bipunctata* L. and *Coccinella 7-punctata* L. *Ann. Appl. Biol.* 59, 331-338.
- Blackman R.L., Eastop V.F. 1985. *Aphids on the world trees, an identification and information guide*. CAB International, London, 986 p.

- Blau P.A., Feeny P., Contardo L., Robson D.S. 1978. Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars : a contrast in toxicity and tolerance. *Science* 200, 1296-1298.
- Board P.G., Baker R.T., Chelvanayagam G., Jermin L.S. 1998. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to human. *Biochem. J.* 328, 929-939.
- Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermin L.S., Schulte G.K., Danley D.E., Hoth L.R., Griffor M.C., Kamath A.V. 2000. Identification, characterisation and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798-24806.
- Bodenheimer F.S., Swirski E. 1957. *The Aphidoidea of the middle east*. Weizman Science Press of Israel, Jerusalem, pp. 378.
- Bogaards J.J.P., Van Ommen B., Falke H.E., Willems M.I., Van Bladeren P.J., 1990. Glutathione S-transferases subunit induction patterns of Brussels sprouts, allyl isothiocyanate and goitrin in rat liver and small intestinal mucosa: a new approach for the identification of inducing xenobiotics. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 81-88.
- Bones A.M., Rossiter J.T. 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.* 97, 194-208.
- Bonner J.T. 1974. *On development*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Boo K.S., Chung I.B., Han K.S., Pickett J.A., Wadhams L.J. 1998. Response of the lacewing *Chrysopa cognata* to pheromones of its aphid prey. *J. Chem. Ecology* 24, 631-639.
- Booth J., Boyland E., Sims P. 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugation with glutathione. *Biochem. J.* 104, 95-102.
- Borg-Karlson A.K., Valterova I., Nilsson L.A. 1994. Volatile compounds from flowers of six species in the family Apiaceae: bouquets for different pollinators ? *Phytochemistry* 35, 111-119.



- Bottrell D.G., Barbosa P., Gould F. 1998. Manipulating natural enemies by plant variety selection and modification: a realistic strategy ? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 347-367.
- Boyland, E., Chasseaud, L.F., 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.* 32, 173-219.
- Bradfield C.A., Bjeldanes L.F. 1984. Effect of dietary indole-3-carbinol on intestinal and hepatic monooxygenase, glutathione S-transferase and epoxidehydrolase activities in the rat. *Fd. Chem. Toxic.* 22, 977-982.
- Branquart E., Bagnée J.Y., Mairesse J.L., Gaspar C., 1999. Inventaire de la faune des coccinelles de région wallonne, Rapport FUSAGx, Gembloux, 37 p.
- Brattsen L.B. 1979. Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals. In : Rosenthal G.A. & Janzen D.H., *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites.* Academic Press, New York, 190-270.
- Brattsten L.B. 1988. Enzymatic adaptations in leaf-feeding insects to host plant allelochemicals. *J. Chem. Ecology* 14, 10, 1919-1928.
- Bray H.G., Franklin T.J., James S.P. 1959. The formation of mercapturic acid. The possible role of glutathionase. *Biochem. J.* 71, 690-696.
- Brown W.L. 1968. An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in ants. *Am. Nat.* 102, 188-191.
- Bryant J.P., Chapin F.S., Klein D.R. 1983. *Oikos* 40, 357-368.
- Buetler T.M., Eaton D.L. 1992. Glutathione S-transferases: amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. *Env. Carcino. Ecotox. Rev.* C10, 181-203.
- Bull D.L., Whitten C.J. 1972. Factors influencing organophosphorus insecticide resistance in tobacco budworms. *J. Agr. Food Chem.* 20, 561-564.

- Camara M.D. 1997. Predator responses to sequestered plant toxins in buckeye caterpillars : are tritrophic interactions locally variable ? *J. Chem. Ecology* 23, 2093-2106.
- Carter M.C., Dixon A.F.G. 1984. Honeydew : an arrestant stimulus for coccinellids. *Ecol. Entomol.* 9, 383-387.
- Chasseaud L.F. 1973. The nature and distribution of enzymes catalysing the conjugation of glutathione with foreign compounds. *Drug Metab. Reviews* 2, 185-220.
- Chasseaud L.F. 1979. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.* 29, 175-192.
- Chien C., Dauterman W.C. 1991. Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa zea*. *Insect Biochem.* 21, 857-864.
- Clark A.G. 1989. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non vertebrate organisms. *Comp. Biochem Physiol.* 92B, 3, 419-446.
- Clark A.G. 1990. The glutathione S-transferases and resistance to insecticides. In : *Glutathione S-transferases and drug resistance*, Hayes J.D., Pickett C.B. and Mantle T.J. (Eds.), Taylor & Francis, London, pp. 369-378.
- Clark A.G., Shamaan N.A. 1984. Evidence that DDT-Dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 249-261.
- Clark A.G., Shamaan N.A., Dauterman W.C., Hayaoka T. 1984. Characterisation of multiple glutathione S-transferases from the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 51-59.
- Cochrane B.J., Morrissey J.J., LeBlanc G.A. 1987. The genetics of xenobiotic metabolism in *Drosophila* IV. Purification and characterisation of the major glutathione S-transferase. *Insect Biochem.* 17, 731-738.

- Cohen A.J., Smith J.N., Trubert H. 1964. Comparative detoxication 10. The enzymatic conjugation of chloro compounds by conjugation with glutathione in the locusts. *Biochem. J.* 90, 449-464.
- Cohen E., Gamliel A., Katan J. 1986. Glutathione S-transferase in Fungi: effect of pentachloronitrobenzene and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; purification and characterization of the transferase from *Fusarium*. *Pest. Biochem. Physiol.* 26, 1-9.
- Cohen M.B., Schuler, M.A., Berenbaum M.R. 1992. A host inducible cytochrome P-450 from a host specific caterpillar: molecular cloning and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10920-10924.
- Cole R. 1980. Volatile components produced during ontogeny of some cultivated crucifers. *J. Sci. Food Agric.* 31, 549-557.
- Cole R.A. 1997a. The relative importance of glucosinolates and amino acids to the development of two aphid pests *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild and cultivated brassica species. *Ent. Exp. & Appl.* 85, 121-133.
- Cole R.A. 1997b. Comparison of feeding behaviour of two Brassica pests *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild and cultivated brassica species. *Ent. Exp. & Applic.* 85, 135-143.
- Coley P.D., Bryant J.P., Chapin F.S. 1985. *Science* 230, 895-899.
- Dagnelie P. 1973. Théories et méthodes statistiques, tome 2, Presses agronomiques, Gembloux, Belgium.
- Dauterman W.C., 1989. The role of glutathione S-transferases in herbicide tolerance and resistance. In : *Glutathione S-transferases and drug resistance*, Hayes J.D., Pickett C.B. and Mantle T.J. (Eds.), Taylor & Francis, London, pp. 347-357.
- David W.A.L, Garnier B.O.C. 1966. In: McCloskey, M.B. Isman 1993. Influence of foliar glucosinolates in oilseed rape and mustard on feeding and growth of Bertha armyworm, *Mamestra configurata* Walker. *J. Chem. Ecology* 19, 249-265.

- Dawson G.W., Doughty K.J., Hick A.J., Pickett J.A., Pye B.J., Smart L.E., Wadhams L.J. 1993. Chemical precursors for studying the effects of glucosinolate catabolites on diseases and pests of oilseed rape (*Brassica napus*) or related plants. *Pest Sci.* 39:271-278.
- Dawson G.W., Griffiths D.C., Pickett J.A., Wadhams L.J., Woodcock C.M. 1987. Plant-derived synergists of alarm pheromone from turnip aphid, *Lipaphis (Hyadaphis) erysimi* (Homoptera, Aphididae). *J. Chem. Ecol.* 13, 1663-1671.
- Daxenbichler M.E., Spencer G.F., Carlson D.G., Rose G.B., Brinker A.M., Powell R.G. 1991. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry* 30, 2623-2638.
- De Langhe J.E., Delvosalle L., Duvigneaud J. Lambinon J., Vanden Berghen C. 1978. *Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines*, 2<sup>ème</sup> édition, Edition du Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique, Meise, 899 p.
- Dethier V.G. 1972. Chemical interactions between plants and insects. In : Sondheimer E., Simeone J.B., *Chemical ecology*. Academic press, New York, 83-102
- Dethier V.G. 1982. Mechanism of host-plant recognition. *Ent. Exp. & App.* 31, 49-56.
- Devine G.J., Harling Z.K., Scarr A.W., Devonshire A.L. 1996. Lethal and sublethal effects of imidacloprid on nicotine-tolerant *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. *Pest. Sci.* 48, 57-62.
- Devonshire R.L., Field L.M., Foster S.P., Moores G.D., Williamson M.S., Blackman R.L., 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353, 1677-1684.
- Dewar A.M., Read L.A., Thornhill W.A., Smith S.D.J., Devonshire A.L. 1992. Effect of established and novel aphicides on resistant *Myzus persicae* (Sulz.) on sugar beet under field cages. *Crop-Protection*, 11, 21-26.

- Dicke M. 2000. Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective, *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 601-617.
- Dicke M., Sabelis M.W. 1989. Does it pay plants to advertise for bodyguards ? Towards a cost-benefit analysis of induced synomone production. *In: Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants.* Lambers, H., Cambridge M.L., Connongs, H., Pons, T.H. (Eds), The Hague, SPB Acad., 351-368.
- Dicke M., Sabelies M.W., Takabayashi J., Bruin J., Posthumus M.A. 1990. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals : prospects for application in pest control. *J. Chem. Ecol.* 16, 3091-3118.
- Dierickx P.J. 1982a. Soluble glutathione S-transferases from rat testes: isoenzyme pattern and lack of inducibility by drug metabolizing enzyme inducers. *Toxicol. Eur. Res.* 4, 47-51.
- Dierickx P.J. 1982b. In vitro inhibition of the soluble glutathione S-transferases from rat liver by heavy metals. *Enzyme* 27, 25-32.
- Dierickx P.J. 1985. Anionic and neutral glutathione S-transferases in the fresh water worm *Tubifex tubifex* (O.F.M.). *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 93, 193-198.
- Dierickx P.J., Almar M.M., De Jonckheere J.F. 1990. Glutathione S-transferase activity in some flagellates and Amoebae, and purification of the soluble glutathione transferases from *Acanthamoeba*. *Biochem. Int.* 22, 593-600.
- Dixon A.F.G. 1985. *Aphid ecology*, 2<sup>nd</sup> edition, Chapman & Hall, London, 300 p.
- Dixon A.F.G. 1998. *Aphid Ecology : An optimization approach*, Chapman & Hall, London, 289 p.
- Dixon M., Webb E.C. 1979. *Enzymes*, third edition, Academic press, 1116 pages

- Doctor J.S., Fristrom J.W. 1985. *Macromolecular changes in discs during postembryonic development. I: Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, vol. 2, Postembryonic development (Kerkut G.A. and Gilbert L.I. Eds), Pergamon, Oxford, 201-238.
- Du Y.-J., Poppy G.M., Powell W. 1996. Relative importance of semiochemicals from first and second trophic levels in host foraging behaviour of *Aphidius ervi*. *J. Chem. Ecology* 22, 1591-1605.
- Du Y.-J., Poppy G.M., Powell W., Pickett J.A., Wadhams L.J., Woodcock C.M. 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *J. Chem. Ecol.* 24, 1355-1368.
- Durham P.L., Poulton J.E. 1989. Effect of castanospermine and related polyhydroxyalkaloids on purified myrosinase from *Lepidium sativum* seedlings. *Plant Physiol.* 90, 48-52.
- Egaas E., Svendsen N.O., Kobro S., Skaare J.U., Jensen E.G. 1991. Activities and properties of xenobiotic metabolizing enzymes in the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sultzer) feeding on paprika (*Capsicum annuum* L.) or swedes (*Brassica napus rapifera* Metzger). *Comp. Biochem. Physiol.* 99C, 105-110.
- Ehrlich P.R., Raven P.H. 1964. Butterflies and plants : a study in co-evolution. *Evolution* 18, 586-608.
- Eigenbrode S.D., Castagnola T., Roux M.B., Steljes L. 1996. Mobility of three generalist predators is greater on cabbage with glossy leaf wax than on cabbage with a wax bloom. *Ent. Exp. & Applic.* 81, 335-341.
- Eigenbrode S.D., Espelie K.E. 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 10, 171-194.
- Elzen G.W., Williams H.J., Vinson S.B. 1986. Wind tunnel flight responses by hymenopterous parasitoid *Campoplestis sonorensis* to cotton cultivars and lines. *Ent. Exp. & Appl.* 42, 285-289.

- Elzen G.W., Williams H.J., Bell A.A., Stipanovic R.D., Vinson S.B. 1985. Quantification of volatile terpenes of glanded and glandless *Gossypium hirsutum* L. cultivars and lines by gas chromatography. *J. Agr. Food Chem.* 33, 1079-1082.
- Erickson J.M., Feeny P. 1974. Sinigrin : a chemical barrier to the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*. *Ecology* 55, 103-111.
- Espelie K.E., Bernays E.A., Brown J.J. 1991. Plant and insect cuticular lipoids serve as behavioural cues for insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 17, 223-233.
- Ettlinger M.G., Kjaer A. 1968. Biosynthesis of glucosinolates. *Rev. Advan. Phytochem.* 1, 49-144.
- Ettlinger M.G., Lundeen A.J. 1957. First synthesis of a mustard oil glucoside : the enzymatic Lossen rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 1764-1765.
- Ettlinger M.G., Dateo M.G., Harrison B.W., Maboy T.J., Thompson C.P. 1961. Vitamin C as coenzyme : the hydrolysis of mustard oil glucosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 1875-1880.
- Fagerstrom T. 1989. *Am. Nat.* 133, 281-287.
- FAO 1995. Annuaire Commerce vol 50, Statistics series 138, 398 p.
- FAO 1997. Annuaire Production vol 51, Statistics series 142, 239 p.
- Feeny P. 1976. Plant apparency and chemical defense. *Recent Adv. Phytochem.* 10, 1-40.
- Fenwick G.R., Heaney R.K., Mullin W.J. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. CRC, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18, 123-201.
- Field L.M., Devonshire A.L., Ffrench-Constant R.H., Forde B.G. 1989. The combined use of immunoassay and a DNA diagnostic technique to identify insecticide-resistant genotypes in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 34, 174-178.

- Firn R.D., Jones C.G. 1995. Plants may talk, but can they hear ? *Trends Ecol. Evol.* 10, 371.
- Fleming I.A., Gross M.R. 1990. Latitudinal clines : a trade-off between egg number and size in pacific salmon. *Ecology* 71, 1-11.
- Flint H.M., Salter S.S., Walters S. 1979. Caryophyllene : an attractant for the green lacewing *Chrysopa carnea* Stephens. *Environ. Entomol.* 8, 1123-1125.
- Fournier D., Bride J.M., Poirié M., Bergé J.B., Plapp F.W., 1992. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* 267, 1840-1845.
- Fox C.W. 1993. Maternal and genetic influences on egg size and larval performance in a seed beetle (*Callosobruchus maculatus*) : multigenerational transmission of a maternal effect ? *Heredity* 73, 509-517.
- Fox C.W., Czesak M.E., Savalli U.M. 1999. Environmentally based maternal effects on development time in the seed beetle *Stator pruininus* (Coleoptera : Bruchidae) : consequences of larval density. *Environ. Entomol.* 28, 217-223.
- Fraenkel G.S. 1959. The raison d'être of secondary plant substances. *Science* 129, 1234-1237.
- Franciosa H., Bergé J.B., 1995. Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*) : location of GST-1 and GST-2 families. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 311-317.
- Francis F., Haubruge E., Gaspar C. 1999. Effects of isothiocyanates on the glutathione S-transferases activity from *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera : Coccinellidae). *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 64 / 3a, 297-303.
- Francis F., Haubruge E., Gaspar C. 2001a. Evaluation of aphidophagous ladybird populations in a vegetable crop and implications as biological agents. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 64, 297-303.



- Francis F. 2001b. Etude de la diversité et des plantes hôtes des Coccinellidae de Belgique. *Notes fauniques de Gembloux* 44, 3-12.
- Francis F., Haubruge E., Gaspar C., Dierickx P.J. 2001c. Glutathione S-transferases of *Aulacorthum solani* and *Acyrtosiphon pisum* : partial purification and characterization. *Comp. Biochem. Physio.* 129, 165-171.
- Fukami J., Shishido T. 1966. Nature of soluble glutathione-dependent enzyme system active in cleavage of methyl parathion to desmethyl parathion. *J. Econ. Ent.* 59, 1338-1346.
- Fukami J.I. 1980. Metabolism of several insecticides by Glutathione S-transferase. *Pharmac. Ther.* 10, 473-514.
- Georghiou G.P. 1991. *The occurrence of resistance to pesticides in arthropods*. FAO, Rome, 318 p.
- Giamoustaris A., Mithen R. 1996. Genetics of aliphatic glucosinolates. IV. Side chain modification in *Brassica oleraceae*. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1006-1020.
- Gillott C. 1980. *Entomology*. Plenum Press, New York, 214 p.
- Gladders D.W., Peters D. 1986. The effect of previous host plant on the fecundity of *Myzus persicae* and its ability to transmit beet yellow virus. *Ann. Appl. Biol.* 109, 499-507.
- Grant D.F., Dietze E.C., Hammock B.D. 1991. Glutathione S-transferase isoenzymes in *Aedes aegypti*: purification, characterisation and isozyme specific regulation. *Insect Biochem.* 21, 421-433.
- Grant D.F., Matsumura F. 1988. Glutathione S-transferase 1 in *Aedes aegypti* larvae: purification and properties. *Insect Biochem.* 18, 615-622.
- Grant D.F., Matsumura F., 1989. Glutathione S-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 33, 132-143.

- Grasswitz T.R., Paine T.D. 1992. Kairomonal effect of an aphid cornicle secretion on *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera : Aphididae). *J. Insect Behav.* 5, 447-457.
- Grob K., Matile P. 1979. Vacuolar location of glucosinolate in horseradish root cells. *Plant Sci. Lett.* 14, 327-335.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hagen K.S. 1987. Nutritional ecology of terrestrial insect predators. In: *Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates*. Slansky, F., Rodriguez J.G. (Eds). New York, Wiley, 533-577.
- Halkier B.A., Du L. 1997. The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Science* 2, 425-431.
- Hammock B.D. 1985. Regulation of juvenile hormone titer: degradation. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Gilbert L.I., Kerkut, G.A. Eds, Pergamon, New York, 431-472.
- Han, Baoyu, and Chen, Zongmao 2002. Behavioral and electrophysiological responses of natural enemies to synomones from tea shoots and kairomones from tea aphids, *Toxoptera aurantii*. *J. Chem. Ecol.* 28, 2203-2220.
- Harborne J.B. 1993. *Introduction to chemical ecology*, 4<sup>ème</sup> édition, Academic press, London, 317 p.
- Haubruge E., Amichot M., 1995. Les mécanismes responsable de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *BASE* 2, 161-174.
- Hauge M.S., Nielsen F.H., Toft S. 1998. The influence of three cereal aphid species and mixed diet on larval survival, development and adult weight of *Coccinella septempunctata*. *Ent. Exp. & Appl.* 89, 319-322.

- Hawkes O.A.M. 1920. Observations on the life-history, biology and genetics of the ladybird beetle *Adalia bipunctata*. In : Hodek I., Honek A. 1996. *Ecology of Coccinellidae*, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 464 p.
- Hayes J.D., Pickett C.B., Mantle T.J. 1990. The glutathione S-transferases and their contributions to drug resistance in nature. In : *Glutathione S-transferases and drug resistance. Proc. of 3rd Intern. GST Conf.*, Edinburgh, 28-30 August 1989, 3-15.
- Hayes J.D., Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family : regulation of the GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.
- He H., Chen A.C., Davey R.B., Wayne I.G., George J.E. 1999. Characterisation and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 737-743.
- Heaney R.K., Fenwick G.R. 1995. Natural toxins and protective factors in Brassica species, including rapeseed. *Natural Toxins* 3, 233-237.
- Heie O.E. 1980. Fauna Entomologica Scandinavica 9, *The Aphidoidea of Fennoscandia and Denmark. I.* Scandinavian Science Press Ltd., Leiden, 236 p.
- Heie O.E. 1992. Fauna Entomologica Scandinavica 25, *The Aphidoidea of Fennoscandia and Denmark. IV.* Scandinavian Science Press Ltd., Leiden, 189 p.
- Hemptinne J.L. 1989. Ecophysiologie d'*Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). Thèse de doctorat, Université libre de Bruxelles.
- Hemptinne J.L., Dixon A.F.G., Lognay, G. 1996. Searching behaviour and mate recognition by males of the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*. *Ecol. Entomol.* 21, 165-170.

- Henderson H.M., McEwen T.J. 1972. Effect of ascorbic acid on thioglycosidases from different crucifers. *Phytochem.* 11, 3127-3133.
- Herms D.A., Mattson W.J. 1992. *Q. Rev. Biol.* 67, 283-335. In : Harborne J.B. 1993. *Introduction to ecological biochemistry*, Academic Press, London, 318 p.
- Hernandez M.M., Sanz I., Adelantado M., Ballach S., Primo, E. 1996. Electro-antennogram activity from antennae of *Ceratitis capitata* (Wied.) to fresh orange airborne volatiles. *J. Chem. Ecol.* 22, 1607-1619.
- Heywood V.H. 1993. *Flowering Plant of the world* New York – Oxford Univ. Press, 336 p.
- Hicks K.L. 1974. Mustard oil glucosinolates : feeding stimulants for adult cabbage flea beetles, *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera : Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 67: 261-264.
- Hodek I. 1956. The influence of *Aphis sambuci* L. as prey of the ladybird beetle *Coccinella 7-punctata* L. *Vest. Csl. Spol. Zool.* 20, 62-74.
- Hodek I. 1959. The influence of aphid species as food for the ladybirds *Coccinella 7-punctata* L. and *Adalia bipunctata* L. In : *The Ontogeny of Insects*, Prague, 314-316.
- Hodek I. 1967. Bionomics and ecology of predaceous Coccinellidae. *Ann. Rev. Entomol.* 12, 79-104.
- Hodek I. 1973. *Biology of Coccinellidae*. Academia Presse, Praha.
- Hodek I., Honek A. 1996. *Ecology of Coccinellidae*, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 464 p.
- Hopkins R.J., Ekbom B., Henkow L. 1998. Glucosinolate content and susceptibility for insect attack of three populations of *Sinapis alba*. *J. Chem. Ecol.* 24, 1203-1216.

- Huang X., Renwick J.A.A. 1994. Relative activities of glucosinolates as oviposition stimulants for *Pieris rapae* and *P. napi oleracea*. *J. Chem. Ecol.* 20, 1025-1031.
- Hukusima S., Kamei M. 1970. Effects of various species of aphids as food on development, fecundity and longevity of *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae). In : Hodek I., Honek A. 1996. *Ecology of Coccinellidae*, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 464 p.
- Hung C.F., Prapaipong H., Berenbaum M.R., Schuler M.A. 1995. Differential induction of cytochrome P450 transcripts in *Papilio polyxenes* by linear and angular furanocoumarins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 89-99.
- Iablokoff-Khnzorian S.M. 1982. *Les coccinelles, Coléoptères-Coccinellidae*. Société Nouvelle des Editions Boubée, Paris, 568 p.
- Isaacs R., Hardie J., Hick A.J., Pye B.J., Smart L.E., Wadhams L.J., Woodcock C.M. 1993. Behavioural responses of *Aphis fabae* to isothiocyanates in the laboratory and field. *Pest. Sci.* 39: 349-355.
- Jakoby W.B., Habig W.H. 1980. In : *Enzymatic Basis of Detoxication*. Jacoby, W.B. (Ed), Academic Press, New York, vol 2, 63-94.
- Jakoby W.B. 1978. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* 46, 383-414.
- Jakoby W.B., Ketterer B., Mannervik B. 1984. Glutathione S-transferases: nomenclature. *Biochem. Pharmacol.* 16, 2539-2540.
- Jansson R.K., Smilowitz Z. 1986. Influence of nitrogen on population parameters of potato insects : abundance, population growth, and within plant distribution of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera : Aphididae). *Environ. Ent.* 15, 49-55.
- Jenkins N.L., Hoffman A.A. 1994. Genetic and maternal variation for heat resistance in *Drosophila* from the field. *Genetics* 137, 783-789.

- Jones B.R., Bancroft H.T. 1986. Distribution and probable physiological role of esterase in reproductive, digestive and fat-body tissues of adult cotton boll weevil. *Biochem. Genet.* 24, 499-508.
- Jones A.M.E., Bridges M., Bones A.M., Cole R., Rossiter J.T. 2001. Purification and characterisation of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 1-5.
- Jones C.G., Firm R.D. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 333, 273-280.
- Jouliau D., König W. 1998. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E.B-Verlag, Hamburg.
- Kahn M.A., Bradshaw A.D. 1976. Adaptation to heterogeneous environments. II. Phenotypic plasticity in response to spacing. *Aust. J. Agr. Res.* 27, 519-531.
- Kapin M.A., Ahmad S. 1980. Esterase in larval tissue of Gypsy moth: optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.* 10, 331-334.
- Kennedy J.S., Booth C.O., Kershaw W.J.S. 1959. Host finding by aphids in the field I. *Gynoparae. Appl. Biol.* 47, 410-423.
- Kielty J.P., Allen-Williams L.J., Underwood N., Eastwood E.A. 1996. Behavioral responses of three species of ground beetle (Coleoptera, Carabidae) to olfactory cues associated with prey and habitat. *J. Insect Behav.* 9, 237-250.
- Kimman Z.B., Yeargan K.V. 1985. Development and reproduction of the predator *Orius insidiosus* reared on diets of selected plants material and arthropod prey. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78, 464-467.
- Kirkland D.L., Evans K.A., Lola-Luz T. 1998. Manipulating the behaviour of beneficial insects in cereal crops to enhance control of aphids. *Proc. Brighton Crop Protect. Conf.* 2, 663-668.

- Kjaer A. 1976. Glucosinolates in the Cruciferae. In: Vaughan J.G., MacLeod A.J., Jones B.M.G. (Eds). *The Biology of Cruciferae*. London, Academic Press, 207-219.
- Kogan M. 1976. The role of chemical factors in insect/plant relationships. *Proc. XV Congr. Entomol.*, 211-227.
- Konno Y., Shishido T. 1992. Distribution of glutathione S-transferase activity in insect tissues. *Appl. Entomol. Zool.* 27, 391-397.
- Kostaropoulos I., Mantzari A.E., Papadopoulos A.I. 1996. Alterations of some glutathione S-transferase characteristics during the development of *Tenebrio molitor* (Insecta : Coleoptera). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 963-969.
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A.I. 1998. Glutathione S-transferase isoenzymes expressed in the three developmental stages of the insect *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28, 901-909.
- Kotze A.C., Rose H.A. 1987. Purification and properties of glutathione S-transferases from the larvae of the Australian sheep blow fly, *Lucilia cuprina* (Wiedmann). *Insect Biochem.* 19, 703-713
- Krammer G., Winterhalter P., Schwab M., Schreier P. 1991. Glycosidally bound aroma compounds in the fruits of Prunus species : apricot (*P. armeniaca*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L.). *J. Agr. Fd Chem.* 39, 778-781.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-695.
- Lamb R.J. 1989. Entomology of oilseed Brassica crops. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 211-229.
- Law J.H., Regnier F.E. 1971. Pheromones. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 533-548.
- Lazard D., Zupko K., Poria Y., Nef P., Lazarovtis S.H., Khen M., Lancet D. 1991. Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature* 349, 790-793.

- Lee X.J., Strausfeld N.J. 1990. Structure, distribution and the number of surface sensilla and their receptor cells on the olfactory appendage of the male moth *Manduca sexta*. *J. Neurocytol.* 19, 519-538.
- Lerin J. 1980. Influence des substances allélochimiques des crucifères sur les insectes. *Acta Oecologica* 1, 215-235.
- Lewis W.J., Martin W.R. 1990. Semiochemicals for use with parasitoids : status and future. *J. Chem. Ecol.* 90, 415-421.
- Lewis W.J., Takasu K. 1990. Use of learned odours by a parasitic wasp in accordance with host and food needs. *Nature* 348, 635-636.
- Lewis W.J., Tumlinson J.H. 1988. Host detection by chemically mediated associative learning in parasitic wasp. *Nature* 331, 257-259.
- Li X., Berenbaum M.R., Schuler M.A. 2000. Molecular cloning and expression of CYP6B8: a xanthotoxin inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30, 75-84.
- Lindroth R.L. 1989. Differential esterase activity in *Papilio glaucus* subspecies : absence of cross-resistance between allelochemicals and insecticides. *Pest. Biochem. Physiol.* 35, 185-191.
- Litwack G., Ketterer B., Arias I.M. 1971. Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234, 466-467.
- Lois R., Dietrich A., Hahlbrock K., Schulz W. 1989. *EMBO J.* 8, 1641-1648. In: Berenbaum, M.R. 1995. The chemistry of defense: theory and practice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2-8.
- Longo V., Mazzaccaro A., Naldi F., Gervasi P.G. 1991. Drug metabolising enzymes in liver, olfactory and respiratory epithelium of cattle. *J. Biochem. Toxicol.* 6, 123-128.
- Lonnerdal B., Janson J.C. 1972. Studies on myrosinases. II. Purification and characterization of a myrosinase from a rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 315, 421-429.



- Loughrin J.H., Potter D.A., Hamilton-Kemp T.R., Byers M.E. 1996. Volatile compounds from crabapple (*Malus* sp) cultivars differing in susceptibility to the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newman). *J. Chem. Ecol.* 22, 1295-1305.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mac Gibbon D.B., Allison R.M. 1968. Glucosinolate system in the aphid *Brevicoryne brassicae*. *N.Z.J. Sci.* 11, 444-446.
- Mac Gibbon D.B., Allison R.M. 1970. A method for the separation and detection of plant glucosinolases (myrosinases). *Phytochemistry* 9, 541-544.
- Mac Gibbon D.B., Beuzenberg E.J. 1978. Location of glucosinolate in *Brevicoryne brassicae* and *Lypaphis erysimi* (Aphididae). *N.Z.J. Sci.* 21 : 389-392.
- Majerus M.E.N. 1994. *Ladybirds*. The New Naturalist, London, 367 p.
- Majerus M.E.N., Kearns P. 1989. Ladybirds, Naturalist Handbook 10, Richmond, Slough, UK, 103 p.
- Malcolm S.B. 1992. Prey defence and predator foraging. In : M.J. Crawley (ed.), *The population Biology of Predators, Parasites and Diseases*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Mangold J.R. 1978. Attraction of *Euphasiopteryx ochracea*, *Corethrella* sp and gryllids to broadcast songs of the southern male cricket. *Florida Entomol.* 61, 57-61.
- Mannervik B. 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Molec. Biol.* 57, 357-417.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jensson H., Tahir M.K., Warholm M., Jörnvall H. 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione S-transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7202-7206.

- Mannervik B., Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., Di Illio C., Ketterer B., Listowsky I., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W.R., Pickett C.B., Sato K., Widersten M., Wolf C.R. 1992. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282, 305-306.
- Mannervik B., Danielson U.H. 1988. Glutathione S-transferases – structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283-337.
- Mannervik B., Jansson H. 1982. Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 257, 9909-9912.
- Matsumo Y. 1970. *In* : Barbier M. (Ed.) Introduction to Chemical Ecology, Longman, London, UK.
- Mattheis J.P., Buchanan D.A., Fellman J.K. 1992. Volatile compounds emitted by sweet cherries (*Prunus avium*) during fruit development and ripening. *J. Agr. Fd Chem.* 40, 471-474.
- McCloskey C., Isman M.B. 1993. Influence of foliar glucosinolates in oilseed rape and mustard on feeding and growth of the Bertha armyworm, *Mamestra configurata* Walker. *J. Chem. Ecol.* 19, 249-265.
- McGraw J.B., Caswell H. 1996. Estimation of individual fitness from life-history data. *American Naturalist* 147, 47-64.
- McKey D. 1979. *In: Herbivores: Their interaction with secondary Plant Metabolites.* Rosenthal, G., Janzen, D. (Eds), Academic, New York, 55-133.
- Merritt S.Z. 1996. Within-plant variation in concentrations of amino acids, sugar and sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra*. Koch. *J. Chem. Ecol.* 22, 1133-1137.
- Meyer D.J., Cole B., Pembe S.E., Gilmore K.S., Fraser G.M., Ketterer B. 1991. Theta, a new class of glutathione S-transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* 274, 409-414.

- Minitab. 1998. Version 11.2, Minitab Inc, State College, PA, USA.
- Mithen R. 1995. Genetics of aliphatic glucosinolates. III. Side chain structure of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 74, 210-215.
- Mithen R.F., Lewis B.G., Heaney R.K., Fenwick G.R. 1987. Glucosinolates of wild and cultivated *Brassica* species. *Phytochemistry* 26, 1969-1973.
- Monge J.P., Cortesero A.M. 1996. Tritrophic interactions among larval parasitoids, bruchids and Leguminosae seeds; influence of pre- and post-emergence learning on parasitoids response. *Ent. Exp. & Appl.* 80, 293-296.
- Morgenstern R., Guthenberg C., Depierre J.W. 1982. Microsomal glutathione S-transferase. Purification, initial characterization and demonstration that it is not identical to the cytosolic glutathione S-transferases. *Eur. J. Biochem.* 128, 243-248.
- Morgenstern R., Lundqvist G., Andersson G., Balk L., DePierre J.W. 1984. The distribution of microsomal glutathione transferase among different organelles, different organs, and different organisms. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3609-3614.
- Morgenstern R., DePierre J.W., Jornvall H. 1985. Microsomal glutathione transferase. Primary structure. *J. Biol. Chem.* 260, 13976-83.
- Motoyama N., Dauterman W.C., 1975. Interstrain comparison of glutathione-dependent reactions in susceptible and resistant houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 5, 489-495.
- Motoyama N., Dauterman W.C. 1978. Multiple forms of rat liver glutathione S-transferases: specificity for conjugation of O-alkyl and O-aryl groups of organophosphorus insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1296-1301.
- Müller H.J. 1964. Über die Ursachen der unterschiedlichen Resistenz von *Vicia faba* L. gegenüber der Bohnenblattlaus *Aphis fabae* Scopoli. VIII. Das Verhalten geflügelter Bohnenlaus nach der

- Landung auf Wirten und Nichtwirten. *Ent. Exp. & Appl.* 7, 189-210.
- Müller H.J. 1965. Das Beziehungsgefüge zwischen Blattläusen und Kulturpflanzen als Beispiel eines Zyklus autökologischer Phasen. *Der Züchter* 35, 14-24.
- Mullin C.A., Matsumura F., Croft B.A. 1984. Epoxide forming and degrading enzymes in the spider mite, *Tetranychus urticae*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79, 85-92.
- Naranjo S.E., Stimac J.L. 1985. Development, survival and reproduction of *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae): effects of plant feeding on soybean and associated weeds. *Environ. Entomol.* 14, 523-530.
- Nault L.R., Stayer W.E. 1972a. Effects of sinigrin on host selection by aphids. *Ent. Exp. & Appl.* 15, 423-437.
- Nault L.R., Stayer W.E. 1972b. In : Pickett J.A., Wadhams L.J. and Woodcock (1992). The chemical ecology of aphids. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 67-90.
- Nault L.R., Montgomery M.E. 1977. *Aphid pheromones*. In: K., Harris, K., Maramorosch (Eds.). *Aphid as virus vectors*. Academic Press, New York, 527-545.
- Nehlin G., Valterova I., Borg-Karlson A.K. 1996. Monoterpenes released from Apiaceae and the egg-laying preferences of the carrot Psyllid, *Trioza apicalis*. *Ent. Exp. & Applic.* 80, 83-86.
- Nielsen J.K., Dalgaard L., Larsen L.M., Sorensen H. 1979. Host plant selection of the horse-radish flea beetle, *Entomoscelis americana*. *J. Comp. Physiol.* 132, 167-178.
- Nieto Nafria J.M., Lateur G., Mier Durante M.P., Tahon J., Perez Hidalgo N., Nicolas J. 1999. Les pucerons de Belgique (Hemiptera: Aphididae). *Parasitica* 55, 5-38.
- Nordlund D.A., Lewis W.J. 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.* 2, 211-220.

- Nordlund D.A. 1981. Semiochemicals : a review of terminology. *In* : Nordlund D.A., Jones R.L., Lewis W.J. *Semiochemicals, Their role in pest control*, J. Wiley & sons, New York, 13-30.
- Obrycki J.J. 1986. The influence of foliar pubescence on entomophagous insects. *In: Interactions of plant resistance and parasitoids and predators of insects*. Boethel D.J., Eikenbary R.D. (Eds). Chichester, Ellis Horwood, 124-142.
- Obrycki J.J., Tauber M.J. 1984. Natural enemy activity on glandular pubescent potato plants in the greenhouse: an unreliable predictor of effects in the field. *Environ. Entomol.* 13, 679-683.
- Oginsky E.L., Stein A.E., Greer M.A. 1965. Myrosinase activity in bacteria as demonstrated by the conversion of progoitrin to goitrin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119, 360.
- Ohtsuru M., Kawatani H. 1979. Studies of the myrosinase from *Wasabia japonica*: purification and some properties of wasabi myrosinase. *Agric. Biol. Chem.* 43, 2249-2255.
- Oppenoorth F.J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. *In* : *Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol 12, Insect control, Kerkut G.A. and Gilbert L.I. Ed., 731-773.
- Oppenoorth F.J., van der Pas L.J.T., Houx N.W.H. 1979. Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos resistant strain of house fly and their influence on resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 11, 176-183.
- Ohtsuru M., Hata T. 1973. Studies on the activation mechanism of the myrosinase by L-ascorbic acid. *Agr. Biol. Chem.* 37: 2543-2548.
- Ottea J.A., Plapp F.W. 1984. Glutathione S-transferase in the house fly : biochemical and genetic changes associated with induction and insecticide resistance. *Pest. Biochem. Physiol.* 22, 203-208.
- Palmieri S., Iori R., Leoni O. 1986. Myrosinase from *Sinapis alba* L.: A new method of Purification for glucosinolate analyses. *J. Agric. Food Chem.* 34, 138-140.

- Papaj D.R., Snellen H., Swaans K., Vet L.E.M. 1994. Unrewarding experiences and their effect on foraging in the parasite wasp *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Eucolidae). *J. Insect Behav.* 7, 465-481.
- Pelmont J. 1993. Enzymes. 2<sup>ème</sup> édition, Presses universitaires de Grenoble, 605 p.
- Pemble S.E., Wardle A.F., Taylor J.B. 1996. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319, 749-754.
- Pessina A., Thomas R., Palmieri S., Luisi P.L. 1990. An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 383-389.
- Peterson J.K., Horvat R.J., Elsey K.D. 1994. Squash leaf glandular trichome volatiles : identification and influence on behaviour of female pickleworm moth (*Diaphania nitidalis* (Stoll.)) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Chem. Ecol.* 20, 2099-2109.
- Pickett J.A., Butt T.M., Doughty K.J., Wallsgrave R.M., Williams I.H. 1995. Minimising pesticide input in oilseed rape by exploiting natural regulatory processes. 9<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Cambridge, 4-7<sup>th</sup> July 1995, vol 2, 565-571.
- Pickett J.A., Wadhams L.J., Woodcock C.M. 1992. The chemical ecology of aphids. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 67-90.
- Pickett J.A., Griffith D.C. 1980. Composition of aphid alarm pheromones. *J. Chem. Ecol.* 6, 349-360.
- Poppy G.M. 1997. Tritrophic interactions : improving ecological understanding and biological control ? *Endeavour* 21, 61-65.
- Porter J.R., Morton A.M., Kiddle G., Doughty K.J., Wallsgrave R.M. 1991. Variation in the glucosinolates content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. Effect of leaf age and position. *Ann. Appl. Biol.* 118, 461-467.

- Pospischil R., Szomm K., Londershausen M., Schröder I., Turberg A., Fuchs R. 1996. Multiple resistance in the larger house fly *Musca domestica* in Germany. *Pest. Biochem. Physiol.* 48, 333-341.
- Poulton J.E., Moller B.L. 1993. Glucosinolates. In : *Methods in plant biochemistry*, vol 9, Lea P.J. (ed), Academic Press, 209-237.
- Prapantadara L., Hemingway J., Ketterman A.J. 1993. Partial purification and characterization of glutathione S-transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 47, 119-133.
- Prapantadara L., Koottathep S., Promtet N., Hemingway J., Ketterman, A.J. 1996. Purification and characterization of a major glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* (species B). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 277-285.
- Prapantadara L., Promtete N., Koottathep S., Somboon P., Ketterman A.J. 2000. Isoenzymes of glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* species B : the purification, partial characterization and interaction with various insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 395-403.
- Price P. W. 1975. Evolutionary strategies of parasitic insects and mites. In : Nordlund D.A., Jones R.L. & Lewis W.J. 1981. *Semiochemicals, Their role in pest control*, J. Wiley & sons, New York, 306 pages.
- Price P.W., Bouton C.E., Gross P., McPherson B.A., Thompson J.N., Weis A.E. 1981. *Annu. Rev. Ecol. Sys.* 11, 41-65. In : Poppy G.M. (1997). Tritrophic interactions : improving ecological understanding and biological control ? *Endeavour* 21, 61-65.
- Prokopy R.J., Owens E.D. 1983. Visual detection of plants by herbivorous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 28, 337-364.
- Quaglia F., Rossi E., Petacchi R., Taylor C.E. 1993. Observations on an infestation by green peach aphids (Homoptera : Aphididae) on greenhouse tomatoes in Italy, *J. Econ. Entomol.* 86, 1019-1025.
- Ramachandran R., Norris D.M., Phillips J.K., Phillips T.W. 1990. *J. Agr. Food Chem.* 39, 2310-2317. In : Harborne J.B. 1993.

*Introduction to ecological biochemistry*, Academic Press, London, 318 pages.

- Ranson H., Rossiter L., Ortelli F., Jensen B., Wang X., Roth C.W., Collins F., Hemingway J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 359, 295-304.
- Rapusas H.R., Bottrell D.G., Coll M. 1996. Intraspecific variation in chemical attraction of rice to insect predators. *Biol. Control* 6, 394-400.
- Reed D.W., Pivnick K.A., Underhill E.W. 1989. Identification of oviposition stimulants for the diamondback moth, *Plutella xylostella*, present in three species of Brassicaceae. *Entomol. Exp Appl.* 53, 277-286.
- Reed H.C., Tan S.H., Haapanen K., Killmon M., Reed D.K., Elliot N.C. 1995. Olfactory responses of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera : Aphididae) to odor plants, aphids and plant-aphid complexes. *J. Chem. Ecol.* 21, 407-415.
- Rees C.J.C. 1969. Chemoreceptor specificity associated with choice of feeding site by the beetle, *Chrysolina brunsvicensis* on its food plant *Hypericum hirsutum*. *Ent. Exp. & Appl.* 12, 565-583.
- Reichardt P.B., Chapin F.S., Bryant J.P., Mattes B.R., Clausen T.P. 1991. *Oecologia* 88, 401-406.
- Reitz S.R., Trumble J.T. 1996. Tritrophic interactions among linear furanocoumarins, the herbivore *Trichoplusia ni* (Lepidoptera : Noctuidae), and the polyembryonic parasitoid *Copidosoma floridanum* (Hymenoptera : Encyrtidae). *Env. Entomol.* 25, 1391-1397.
- Remaudière G., Remaudière M. 1997. *Catalogue des Aphididae du monde*. Paris, INRA Edition, 473 p.
- Rhoades D.F., Cates R.G. 1976. *Rec. Adv. Phytochem.* 10, 168-213. In: Berenbaum M.R. 1995. The chemistry of defense: theory and practice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2-8.



- Rhoades D.F. 1979. In: Herbivores: Their interaction with secondary Plant Metabolites. Rosenthal, G., Janzen, D. (Eds), Academic, New York, 3-54.
- Rigdway R.L., Jones S.L. 1968. Plant feeding by *Geocoris pallens* and *Nabis americanoferus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61, 232-233.
- Rogers M.E., Jani M.K., Vogt R.G. 1999. An olfactory specific glutathion S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 202, 1625-1637.
- Rojas J.C. 1999. Electrophysiological and behavioural responses of the cabbage moth to plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 25, 1867-1883.
- Rossiter M.C. 1991. Maternal effects generate variation in life history : consequences of egg weight plasticity in the gypsy moth. *Funct. Ecol.* 5, 386-393
- Ryan C.A., Bishop P.D., Graham J.S., Broadway R.M., Duffey S.S. 1986. *J. Chem. Ecol.* 12, 1025-1036.
- Sadeghi H., Gilbert F. 2000. Aphid suitability and its relationship to oviposition preference in predatory hoverflies. *J. Anim. Ecol.* 69, 771-784.
- Salas-Aguilar J., Ehler L.E. 1977. Feeding habits of *Orius tristicolor*. *Ann. Entomol. Am.* 70, 60-62.
- Saleh M.A., Motoyama N., Dauterman W.C. 1978. Reduced glutathione in the housefly : concentration during development and variation in strains. *Insect Biochem.* 8, 311-316.
- Sauls C.E., Nordlund D.A., Lewis W.J. 1979. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. VIII. Effect of diet on the kairomonal activity of frass from *Heliothis zea* (Boddie) larvae for *Microplitis croceipes* (Cresson). *J. Chem. Ecol.* 5, 363-369.
- Schoknecht U. 1992. Isoenzymes of glutathione S-transferase in insects. In : *Insecticides: mechanisms of action and resistance*, 327-333.

- Schoonhoven L.M., Derksen-Koppers I. 1976. Effects of some allelochemicals on food uptake and survival of a polyphagous aphid, *Myzus persicae*. *Ent. Exp. & Appl.* 19, 52-56.
- Schoonhoven L.M. 1981. Chemical mediators between plants and phytophagous insects. In : Nordlund D.A., Jones R.L., Lewis W.J. *Semiochemicals, Their role in pest control*, J. Wiley & sons, New York, 31-50.
- Shikita M., Fahey J.W., Golden T.R., Holtzclaw W.D., Talalay P. 1999. An unusual case of uncompetitive activation by ascorbic acid : purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochem. J.* 41, 725-732.
- Shimabukuro R.H., Frear D.S., Swanson H.R., Walsh W.C. 1971. Plant Physiol. 47, 10-21. In: Chasseaud, L.F. 1973. The nature and distribution of enzymes catalising the conjugation of glutathione with foreign compounds. *Drug Metab. Rev.*, 2, 185-220.
- Simons P.C., Vander jagt D.L., 1977. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 82, 334-341.
- Simpson B.B., Ogorzaly M.C. 1995. Economic Botany. New York, Mc Graw Hill, pp. 742.
- Sones K., Heaney R.K., Fenwick G.R. 1984. The glucosinolate content of UK vegetables-cabbage (*Brassica oleracea*), swede (*B. napus*) and turnip (*B. campestris*). *Food Addit. Contam.* 1, 289-296.
- Souissi R., Nénon J.P., Le Rü B., 1998. Olfactory responses of parasitoid, *Apoanagyrus lopezi* to odor plants, mealybugs, and plant-mealybug complexes. *J. Chem. Ecol.* 24, 37-48.
- Stadler E. 1976. Sensory aspects of insect plant interactions. *Proc. XV Int. Congr. Entomol.*, 228-248.
- Tani N., Othuru M., Hata T. 1974. Isolation of myrosinase producing microorganism. *Agr. Biol. Chem.* 38, 1617-1622.
- Taylor R.M., Foster W.A. 1996. Spider nectarivory. *Am. Entomol.* 42, 82-86.

- Traynier R.M.M., Truscott R.J.W. 1991. Potent natural egg-laying stimulant for cabbage butterfly *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.* 17, 1371-1379.
- Tsukamoto M., Casida J.E. 1967. Metabolism of methylcarbamates insecticides by the NADPH<sub>2</sub> requiring system from houseflies. *Nature* 213, 49-51.
- Tumlinson J.H., Turlings T.C.J., Lewis W.J. 1992. The semiochemical complexes that mediate insect parasitoid foraging. *Agric. Zool. Rev.* 5, 221-252.
- Turlings T.C.J., Tumlinson J.H. 1992. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8399-8402.
- Turlings T.C.J., Tumlinson J.H., Eller F.J., Lewis, W.J. 1990. Exploitation of herbivore induced plant odors by host seeking parasitic wasps. *Science* 250, 1251-1253.
- Udayagiri S., Jones R.L. 1992. Flight behaviour of *Macrocentrus grandii* Goidanich (Hymenoptera: Braconidae) a specialist parasitoid of european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): factors influencing response to corn volatiles. *Environ. Entomol.* 21, 1448-1456.
- Underhill E.W. 1980. Glucosinolates. In : Quinsac A. (1993). Les glucosinolates et leurs dérivés dans les crucifères. Analyses par chromatographie en phase liquide et perspectives d'utilisation de l'électrophorèse capillaire. Thèse de doctorat, Université d'Orléans, pp. 143.
- Underhill E.W., Wetter L.R., Chisholm M.D. 1973. Biosynthesis of glucosinolates. In : Goodwin T.W., Smellie R.M.S. *Nitrogen metabolism in plants*. Biochemistry Society Symposium, vol 38, 303-326.
- Usui K., Fukami J.-I., Shishido T. 1977. Insect glutathione S-transferase: separation of transferases from the bodies of American cockroaches active on organophosphate triesters. *Pest. Biochem. Physiol.* 7, 249-260.

- van Bladeren P.J. 1988. Formation of toxic metabolites from drugs and other xenobiotics by glutathione conjugation. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 295-299.
- van Bladeren P.J., van Ommen B. 1991. The inhibition of glutathione S-transferases: Mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits, *Pharmacol. Therap.* 51, 35-46.
- van Emden H.F. 1972. Aphids as phytochemists. In : Harborne J.B., *Phytochemical Ecology*, Academic Press, London, 25-44.
- van Emden H.F. 1989. Pest control. In : Ververk R.H.J., Leather S.R., Wright D.J. 1998. The potential for manipulating crop-pest-natural enemy interactions for improved insect pest management. *Bull. Entomol. Res.* 88, 493-501.
- van Emden H.F. 1990. The interaction of host plant resistance to insects with other control measures. In : *Proc. Brighton Conf.*, Pests and diseases, British Crop Protection Council publications, 939-948
- van Emden H.F. 1991. The role of host plant resistance in insect pest mis-management. *Bull. Entomol. Res.* 81, 123-126.
- van Emden H.F. 1995. Host plant-Aphidophaga interactions. *Agr. Ecosys. Environ.* 52, 3-11.
- Vanhaelen N., Haubruge E., Francis F. 2001. Effects of Brassicaceae secondary metabolites on the glutathione S-transferase activity from *Episyrphus balteatus* De Geer (Diptera: Syrphidae). *Pest. Biochem. Physiol.* 71, 170-177.
- Vanhaelen N., Gaspar C., Francis F. 2002. Influence of prey host plant on development and reproduction of two aphidophagous predators, *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae) and *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 99, 561-564.
- Venzon M., Janssen A., Sabelis W., 1999. Attraction of a generalist predator towards herbivore-infested plants. *Ent. Exp. & Appl.* 93, 305-314.

- Ververk R.H.J., Leather S.R., Wright D.J. 1998. The potential for manipulating crop pest-natural enemy interactions for improved insect pest management. *Bull. Entomol. Res.* 88, 493-501.
- Vet L.E.M., van Lenteren J.C., Heymans M., Meelis E. 1983. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiol. Entomol.* 8, 97-106.
- Vet L.E.M., Dicke M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 141-172.
- Vet L.E.M., Groenwold A.W. 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids. *J. Chem. Ecol.* 16, 1119-1135.
- Vinson S.B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 31, 109-133.
- Vinson S.B., Barfield C.S., Henson R.D. 1977. Oviposition behaviour of *Bracon mellitor*, a parasitoid of the boll weevil (*Anthonomus grandis*). II Associative learning. *Physiol. Entomol.* 2, 157-164.
- Vinson S.B. 1981. Habitat location. In : Nordlund D.A., Jones R.L., Lewis W.J. *Semiochemicals, Their role in pest control*, J. Wiley & sons, New York, 51-78.
- Visentin M., Tava A., Iori R., Palmieri S. 1992. Isolation and identification of *trans*-4(methylthio)-3-butenyl glucosinolate from radish root (*Raphanus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 40, 1687-1691.
- Visser J.H., Piron P.G.M. 1995. Olfactory antennal responses to plant volatiles in apterous virginoparae of the vetch aphid *Megoura viciae*. *Ent. Exp. & Appl.* 77, 37-46.
- Visser J.H., Yan F.S. 1995. Electroantennogram responses of the grain aphids *Sitobion avenae* (F.) and *Metopolophium dirhodum* (Walk.) (Homoptera, Aphididae) to plant odour components. *J. Appl. Entomol.* 119, 539-542.

- Vogt R.G., Prestwich G.D., Lerner M.R. 1991a. Odorant binding protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol.* 22, 74-84.
- Vogt R.G., Prestwich G.D., Lerner M.R. 1991b. Molecular cloning and sequencing of general odor binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.* 11, 2972-2984.
- Vos R.M.E., van Bladeren P.J. 1990. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Inter.* 75, 241-265.
- Vos R.M.E., Snoek M.C., Van Berkel W.J.H., Muller F., van Bladeren P.J. 1988. Differential induction of rat hepatic glutathione S-transferase isoenzymes by hexachlorobenzene and benzyl isothiocyanate. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 1077-1082.
- Wadleigh R.W., Yu S.J. 1988. Metabolism of an organothiocyanate allelochemical by glutathione transferase in three lepidopterous insects. *J. Econom. Entomol.* 81, 776-780.
- Waelsch P. 1930. In: Franciosa, H., Bergé, J.B., 1995. Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*) : location of GST-1 and GST-2 families. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25,3, 311-317.
- Weber B., Martin D., Otto D. 1992. Novel insecticidal effects of isothiocyanate compounds. In : *Insecticides : mechanisms of action and resistance.* 63-73.
- Weber G., Oswald S., Zollner U. 1986. Suitability of rape cultivars with different glucosinolate content for *Brevicoryne brassicae* (L.) and *Myzus persicae* (Sultzer) (Hemiptera, Aphididae). *J. plant Dis. Prot.* 93, 113-124.
- Weibull J., Melin G. 1990. Free amino acid content of phloem sap from *Brassica* plants in relation to performance of *Lipaphis erysimi* (Hemiptera : Aphididae). *Ann. Appl. Biol.* 116, 417-423.

- Weinhold L.C., Ahmad S., Pardini R.S., 1990. Insect glutathione-S-transferase : a predictor of allelochemical and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 95 B, 355-363.
- Weinstein R.S., Hass J.D. 1977. Early stress and later reproductive performance under conditions of malnutrition and high altitude hypoxia. *Med. Anthropol.* 1, 25-54.
- Weissbecker B., van Loon J.J.A., Dicke M. 1999. Electroantennogram responses of a predator, *Perillus bioculatus*, and its prey, *Leptinotarsa decemlineata*, to plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 25, 2313-2325.
- White A.J., Wratten S.D., Berry N.A., Weigmann U. 1995. Habitat manipulation to enhance biological control of *Brassica* pests by hover flies (Diptera : Syrphidae). *J. Econom. Entomol.* 88, 1171-1176.
- Whitman D.C. 1988. Plant natural products as parasitoid cueing agents. *In: Biological active products Potential use in agriculture.* Cutler H.G., (Ed). Washington, AM. Chem. Soc. 386-396.
- Whitman D.W., Eller F.J. 1990. *Chemoecology* 1, 69-75. *In : Harborne J.B. (1993), Introduction to ecological biochemistry*, Academic Press, London, 318 p.
- Whitman D.W. 1988. Allelochemical interactions among plants, herbivores and predators. *In : Barbosa P., Letourneau D.K., Novel aspects of insect-plant interactions*, Academic Press, New-York, 11-64.
- Whittaker R.H. 1970. The biochemical ecology of higher plants. *In : Sondheimer E., Simeone J.B., Chemical Ecology.* Academic Press, New York, 43-70.
- Wilkinson A.P., Rhodes M.J.C., Fenwick R.G. 1984. Myrosinase activity of cruciferous vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 35, 543-552.
- Yen G.C., Wei Q.K. 1993. Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan. *J. Sci. Food Agric.* 61, 471-475.

- Yu S.J. 1982. Host plant induction of glutathione S-transferase in the fall armyworm. *Pest. Biochem. Physiol.* 18, 101-106.
- Yu S.J. 1984. Interactions of allelochemicals with detoxification enzymes of insect-susceptible and resistant armyworm. *Pest. Biochem. Physiol.* 22, 60-68.
- Yu S.J. 1989. Purification and characterization of glutathione S-transferases from five phytophagous Lepidoptera. *Pest. Biochem. Physiol.* 35, 97-105.
- Yu S.J., Hsu E.L. 1993. Induction of detoxification enzymes in phytophagous insects : roles of insecticide synergists, larval age and species. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 24, 21-32.
- Yu S.J. 1999. Induction of new glutathione S-transferase isozymes by allelochemicals in the fall armyworm. *Pest. Biochem. Physiol.* 63, 163-171.
- Zhu J., Cossé A.A., Obrycki J.J., Boo K.S., Baker T.C., 1999. Olfactory reactions of the twelve-spotted lady beetle, *Coleomegilla maculata* and the green lacewing, *Chrysoperla carnea* to semiochemicals released from their prey and host plant : electroantennogram and behavioral responses. *J. Chem. Ecol.* 25, 1163-1177.



## Résumé - Summary

## Remerciements

## Table des Figures

## Table des Tableaux

## Table des matières

### CHAPITRE 1

#### L'ÉCOLOGIE CHIMIQUE DES RELATIONS PLANTES –

#### INSECTES ..... 1

INTRODUCTION.....	1
<i>Définition des sémiouchimiques</i> .....	4
IMPLICATIONS DES SUBSTANCES SÉMIOCHIMIQUES DANS	
L'INTERACTION PLANTES – INSECTES .....	6
LES INTERACTIONS MULTITROPHIQUES .....	10
<i>Application à la lutte biologique</i> .....	15
EFFETS DES SUBSTANCES ALLÉLOCHIMIQUES.....	17
<i>Attractifs</i> .....	18
<i>Répulsifs</i> .....	19
<i>Stimulants de ponte</i> .....	20
<i>Stimulants de nutrition</i> .....	21
<i>Antiappétents</i> .....	22
<i>Effet toxique</i> .....	23

### CHAPITRE 2

#### LES SYSTÈMES DE DÉTOXICATION CHEZ

#### LES INSECTES..... 25

INTRODUCTION.....	25
MÉCANISMES GÉNÉRAUX .....	26
<i>Les systèmes enzymatiques de la phase I</i> .....	26
<i>Les systèmes enzymatiques de la phase II</i> .....	27
LES GLUTATHION S-TRANSFÉRASES (GST).....	28
<i>Généralités</i> .....	28
<i>Les mécanismes de conjugaison des Glutathion S-transférases</i> .....	30
<i>Rôles des GST</i> .....	31
<i>Localisation et fonctions physiologiques chez les insectes</i> .....	34
<i>Classification des GST</i> .....	35

### CHAPITRE 3

#### GÉNÉRALITÉS SUR LA FAMILLE DES BRASSICACEAE... 40

POSITION SYSTÉMATIQUE ET IMPORTANCE AGRONOMIQUE .....	40
CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES : LES GLUCOSINOLATES.....	41
<i>Les glucosinolates dans la plante</i> .....	42
<i>Biosynthèse des glucosinolates</i> .....	44
<i>Hydrolyse enzymatique des glucosinolates</i> .....	46
<i>Ecologie chimique des glucosinolates</i> .....	48

### CHAPITRE 4

#### BIOLOGIE, ÉCOLOGIE ET IMPORTANCE DE L'ENTOMOFAUNE ÉTUDIÉE ..... 54

INTRODUCTION.....	54
LES PUCERONS.....	55
<i>Caractéristiques générales</i> .....	55
<i>Localisation des plantes hôtes</i> .....	56
<i>Plantes hôtes et comportement alimentaire</i> .....	56
<i>Evolution de la spécificité</i> .....	58
<i>Description et biologie de Myzus persicae SULZER</i> .....	58
<i>Description et biologie de Brevicoryne brassicae L.</i> .....	60
LES AUXILIAIRES ENTOMOPHAGES .....	60
<i>Description et biologie d'Adalia bipunctata (L.)</i> .....	61

### CHAPITRE 5

#### CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET BUTS DES EXPÉRIMENTATIONS ..... 64

### CHAPITRE 6

#### ÉTUDE DE LA LOCALISATION DES PROIES EN FONCTION DE LA PLANTE HÔTE ..... 67

INTRODUCTION.....	67
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	69
<i>Choix et description de l'olfactomètre</i> .....	69
<i>Description et préparation du matériel biologique</i> .....	72
<i>Sources d'odeurs comme médiateurs chimiques potentiels</i> .....	74

RÉSULTATS .....	74
DISCUSSIONS .....	80
CONCLUSIONS .....	84

## CHAPITRE 7

### ETUDE DES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES ET DES MOLÉCULES ÉMISES PAR DES PROIES ÉLEVÉES SUR DIVERSES PLANTES HÔTES..... 85

INTRODUCTION.....	85
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	86
<i>Description et préparation du matériel biologique.....</i>	86
<i>Analyses des glucosinolates par chromatographie liquide (HPLC).....</i>	87
<i>Analyse des produits volatils par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....</i>	87
RÉSULTATS .....	89
<i>Analyse des glucosinolates par chromatographie liquide (HPLC).....</i>	89
<i>Analyse des produits volatiles par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....</i>	91
DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS .....	94
CONCLUSION .....	99

## CHAPITRE 8

### ETUDE DES PARAMÈTRES BIOLOGIQUES EN FONCTION DE LA PLANTE HÔTE ..... 100

INTRODUCTION.....	100
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	101
<i>Description du matériel biologique et des techniques d'élevage .....</i>	101
<i>Taux d'accroissement des pucerons.....</i>	102
<i>Paramètres de développement des coccinelles .....</i>	102
<i>Estimation de la fécondité et de la viabilité des œufs de coccinelles .....</i>	103
<i>Détermination des valeurs adaptatives des coccinelles.....</i>	103
<i>Etude de l'effet environnemental de la proie des coccinelles ..</i>	104
<i>Evaluation de l'effet maternel lié à la qualité de la proie des coccinelles .....</i>	105

<i>Analyses statistiques</i> .....	106
RÉSULTATS .....	107
<i>Taux d'accroissement des pucerons selon la plante hôte</i> .....	107
<i>Paramètres de développement des coccinelles</i> .....	108
<i>Paramètres de reproduction des coccinelles</i> .....	114
<i>Etude de l'effet environnemental de la plante hôte de la proie des coccinelles</i> .....	118
<i>Evaluation de l'effet maternel lié à la qualité de la proie</i> .....	120
DISCUSSIONS .....	124
CONCLUSIONS .....	136

## CHAPITRE 9

### EVOLUTION DES SYSTÈMES DE DÉTOXICATION CHEZ LES PUCERONS ET LE PRÉDATEUR EN PRÉSENCE DE SUBSTANCES ALLÉLOCHIMIQUES ..... 137

INTRODUCTION.....	137
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	138
<i>Description et préparation du matériel biologique</i> .....	138
<i>Mesure de l'activité myrosinase</i> .....	139
<i>Mesure de l'activité glutathion S-transférases et dosage des protéines totales</i> .....	140
<i>Tests biologiques sur diètes artificielles</i> .....	141
<i>Expositions des coccinelles aux substances volatiles pures</i> .....	142
<i>Mise en évidence du rôle inducteur de l'activité glutathion S-transférase des substances allélochimiques</i> .....	142
<i>Traitements statistiques</i> .....	142
RÉSULTATS .....	143
<i>Mise en évidence de l'activité myrosinase chez les pucerons et la coccinelle</i> .....	143
<i>Etude de l'activité glutathion S-transférase chez les pucerons</i> .....	144
<i>Détermination de l'activité glutathion S-transférase chez Adalia bipunctata</i> .....	145
<i>Exposition des coccinelles aux substances allélochimiques pures</i> .....	146
<i>Détermination du rôle inducteur des substances allélochimiques pour l'activité glutathion S-transférase des coccinelles</i> .....	148
<i>Tests biologiques sur diètes artificielles</i> .....	149
DISCUSSIONS .....	150
CONCLUSIONS : EBAUCHE D'UN MODÈLE ÉVOLUTIF.....	152

<b>CHAPITRE 10</b>	
<b>PURIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UNE</b>	
<b>MYROSINASE CHEZ LE PUCERON</b>	
<b><i>BREVICORYNE BRASSICAE</i></b> .....	<b>156</b>
INTRODUCTION.....	156
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	157
<i>Produits et réactifs</i> .....	157
<i>Culture des plantes et élevage des pucerons</i> .....	158
<i>Purification d'enzyme</i> .....	158
<i>Mesure de l'activité myrosinase et dosage des protéines</i>	
<i>totales</i> .....	159
<i>Détermination des paramètres cinétiques envers différents</i>	
<i>substrats</i> .....	160
<i>Electrophorèse PAGE en conditions dénaturantes</i> .....	160
<i>Quantification des produits de dégradation des substrats</i>	
<i>utilisés par chromatographie gazeuse couplée à la</i>	
<i>spectrométrie de masse (GC-MS)</i> .....	161
<i>Précipitation des protéines au moyen de sulfate d'ammonium</i>	162
<i>Chromatographies de filtration sur gel</i> .....	163
<i>Technique d'électrophorèse PAGE</i> .....	163
<i>Détermination des paramètres cinétiques vis-à-vis de</i>	
<i>différents glucosinolates</i> .....	165
<i>Quantification des produits de dégradation des substrats</i>	
<i>utilisés par chromatographie gazeuse couplée à la</i>	
<i>spectrométrie de masse (GC-MS)</i> .....	168
DISCUSSIONS .....	170
CONCLUSIONS .....	176

<b>CHAPITRE 11</b>	
<b>CARACTÉRISATION ET PURIFICATION DES</b>	
<b>GLUTATHION S-TRANSFÉRASES DU PUCERON</b>	
<b><i>MYZUS PERSICAE</i></b> .....	<b>177</b>
INTRODUCTION.....	177
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	178
<i>Produits et réactifs</i> .....	178
<i>Insectes</i> .....	178
<i>Préparation des homogénats d'insectes et élimination des</i>	
<i>colorants naturels</i> .....	178

<i>Dosage des protéines totales et mesure de l'activité glutathion S-transférase</i> .....	179
<i>Electrophorèse PAGE en conditions dénaturantes</i> .....	179
<i>Détermination des paramètres cinétiques</i> .....	180
RÉSULTATS .....	180
<i>Chromatographies d'affinité (Agarose, Sepharose 4B et 6B)</i> ..	180
<i>Mise en évidence des différentes glutathion S-transférases par electrophorèse</i> .....	182
<i>Paramètres cinétiques</i> .....	182
DISCUSSIONS .....	185
CONCLUSIONS .....	193

## CHAPITRE 12

### CARACTÉRISATION ET PURIFICATION DES GLUTATHION S-TRANSFÉRASES D'*ADALIA*

<b><i>BIPUNCTATA</i></b> .....	<b>195</b>
INTRODUCTION .....	195
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	196
<i>Préparation des homogénats d'insectes</i> .....	196
<i>Mesure de l'activité glutathion S-transférase et dosage des protéines totales</i> .....	196
<i>Purification</i> .....	196
<i>Détermination des paramètres cinétiques</i> .....	198
<i>Technique d'électrophorèse (SDS-PAGE)</i> .....	199
<i>Production d'anticorps polyclonaux</i> .....	199
<i>Détection immunologique des protéines immobilisées (Western blot)</i> .....	199
RÉSULTATS .....	200
<i>Etude de la spécificité des GST envers divers substrats benzéniques</i> .....	200
<i>Expression de l'activité enzymatique aux différents stades de développement</i> .....	201
<i>Localisation macroscopique des GST</i> .....	201
<i>Chromatographie d'affinité (Sepharose 6B)</i> .....	203
<i>Technique d'électrophorèse (SDS-PAGE)</i> .....	204
<i>Chromatographie liquide</i> .....	205
<i>Chromatographie de filtration sur gel (Superdex 75)</i> .....	205
<i>Technique de chromatofocusing</i> .....	206
<i>Détermination des paramètres cinétiques des isoenzymes</i> .....	207

<i>Détection immunologique des protéines immobilisées</i> <i>(Western blot)</i> .....	208
DISCUSSIONS .....	209
CONCLUSIONS .....	215
<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES</b> .....	<b>217</b>
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>220</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>2ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>

## Table des Figures

Figure 1 : Schéma représentant les différentes catégories de médiateurs chimiques .....	5
Figure 2 : Présentation des relations plantes – insectes et interventions des molécules informatives en tant que médiateurs chimiques .....	12
Figure 3 : Dendrogramme illustrant la relations entre les séquences de GST d’insectes.....	37
Figure 4 : Classification des GST de divers organismes et relations phylogénétiques.....	38
Figure 5 : Structure générale d’un glucosinolate.....	41
Figure 6 : Dégradation enzymatique des glucosinolates .....	48
Figure 7 : Description de l’olfactomètre à 4 voies .....	71
Figure 8 : Illustration des champs olfactifs (1 à 4) créés dans la chambre de manipulation par quatre flux indépendants.....	72
Figure 9 : Chromatogrammes en GC-MS des substances volatiles émises par les extraits de <i>Myzus persicae</i> quelle que soit la plante hôte et <i>Brevicoryne brassicae</i> élevé sur <i>Sinapis alba</i> ....	93
Figure 10 : Taux de reproduction de <i>Myzus persicae</i> et <i>Brevicoryne brassicae</i> en fonction de diverses plantes hôtes .....	108
Figure 11 : Durées de développement larvaire, de nymphose et de cycle œuf - adulte d’ <i>Adalia bipunctata</i> nourrie avec les combinaisons d’espèces de pucerons et de plantes hôtes.....	109
Figure 12 : Taux de mortalité totale d’ <i>Adalia bipunctata</i> nourrie avec différentes combinaisons d’espèces de plantes hôtes et de pucerons.....	112
Figure 13 : Effet de la plante hôte de la proie sur la mortalité larvaire d’ <i>Adalia bipunctata</i> nourrie avec <i>Myzus persicae</i> et <i>Brevicoryne brassicae</i> élevés sur <i>Brassica napus</i> ou <i>Sinapis alba</i> .....	113
Figure 14 : Poids des adultes d’ <i>Adalia bipunctata</i> nourris avec une des différentes combinaisons d’espèces de pucerons et de plantes hôtes .....	114
Figure 15 : Evolution de la fécondité d’ <i>Adalia bipunctata</i> nourries avec <i>Myzus persicae</i> en fonction de la plante hôte ( <i>Vicia faba</i> , <i>Brassica napus</i> et <i>Sinapis alba</i> ). .....	116
Figure 16 : Evolution de la fertilité d’ <i>Adalia bipunctata</i> nourries avec <i>Myzus persicae</i> en fonction de la plante hôte ( <i>Vicia faba</i> , <i>Brassica napus</i> et <i>Sinapis alba</i> ). .....	117



Figure 17: Effet d'un transfert de proie pendant 6 jours sur la fécondité d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	119
Figure 18 : Effet d'un transfert de proie pendant 6 jours sur la viabilité des oeufs d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	120
Figure 19 : Effet maternel de l'espèce de puceron ( <i>Aphis fabae</i> ou <i>Acyrtosiphon pisum</i> ) sur la fécondité d' <i>Adalia bipunctata</i> ....	121
Figure 20 : Effet maternel de l'espèce de puceron ( <i>Aphis fabae</i> ou <i>Acyrtosiphon pisum</i> ) sur le nombre de pontes déposées par <i>Adalia bipunctata</i> .....	122
Figure 21 : Effet maternel de l'espèce de puceron ( <i>Aphis fabae</i> ou <i>Acyrtosiphon pisum</i> ) sur la viabilité des oeufs d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	122
Figure 22 : Effet maternel de la plante hôte de <i>Myzus persicae</i> sur le nombre de pontes déposées par <i>Adalia bipunctata</i> .....	123
Figure 23 : Effet maternel de la plante hôte de <i>Myzus persicae</i> sur la fécondité d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	124
Figure 24 : Effet maternel de la plante hôte de <i>Myzus persicae</i> sur la viabilité des oeufs d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	124
Figure 26 : Variation de l'activité glutathion S-transférases des espèces de pucerons, <i>Myzus persicae</i> et <i>Brevicoryne brassicae</i> en fonction de la plante hôte .....	144
Figure 27 : Activités glutathion S-transférases de <i>Myzus persicae</i> nourri avec des diètes artificielles contenant de la sinigrine....	145
Figure 28 : Variation de l'activité glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> en fonction des combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes .....	146
Figure 29 : Activités glutathion S-transférases d'adultes d' <i>Adalia bipunctata</i> exposés à une série de concentrations en MITC et AITC.....	147
Figure 30 : Variation de l'activité GST d' <i>Adalia bipunctata</i> en présence de substances allélochimiques dans le tampon de réaction.....	148
Figure 31: Activités glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> nourrie avec des diètes artificielles incluant 0.2% de sinigrine, allyle- ou benzyle-ITC.....	149
Figure 32 : Activités glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> nourrie avec des diètes artificielles incluant le benzyle-ITC ...	150
Figure 33 : Schéma du modèle présentant la co-évolution de la plante, des pucerons <i>Myzus persicae</i> et <i>Brevicoryne brassicae</i> et de la coccinelle <i>Adalia bipunctata</i> .....	153

Figure 34 : Précipitation des protéines d'un homogénat de <i>Brevicoryne brassicae</i> en utilisant une concentration croissante en sulfate d'ammonium. ....	162
Figure 35 : Profils d'élution de la myrosinase de <i>Brevicoryne brassicae</i> sur une colonne DEAE suivi par l'élution sur une colonne Superdex 200. ....	164
Figure 36 : Gel SDS-PAGE de la myrosinase purifiée de <i>Brevicoryne brassicae</i> après la chromatographie sur DEAE ...	165
Figure 37 : Régressions linéaires de l'hydrolyse de 8 glucosinolates déterminées avec la myrosinase de <i>Brevicoryne brassicae</i> suivant Lineweaver-Burk. ....	167
Figure 38 : Profil d'élution des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> sur une colonne d'affinité Sepharose 4B.....	181
Figure 39 : Profil d'élution des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> sur une colonne d'affinité Agarose .....	182
Figure 40 : Gel SDS - PAGE des glutathion S-transférases de <i>Myzus persicae</i> purifiées sur colonnes Sepharose 4B et Agarose .....	183
Figure 41 : Régressions suivant Lineweaver-Burk de la conjugaison du DNIB, CDNB et du GSH par les GST de <i>Myzus persicae</i> purifiées en utilisant les colonnes d'affinité Sepharose 4B et Agarose .....	184
Figure 42 : Activités glutathion S-transférase d'adulte d' <i>Adalia bipunctata</i> en fonction de divers substrats benzéniques. ....	201
Figure 43 : Activités spécifiques des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> envers le CDNB et le DNIB.....	202
Figure 44 : Profil d'élution des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> sur une colonne d'affinité Sepharose 6B.....	204
Figure 45 : SDS-PAGE de la fraction liée des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> après chromatographie d'affinité .....	204
Figure 46 : Chromatogramme HPLC des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> après la chromatographie d'affinité.....	205
Figure 47 : Profil d'élution des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> après la chromatographie d'affinité sur une colonne Superdex 75.....	206
Figure 48 : Profil d'élution des isoenzymes de glutathion S-transférase d' <i>Adalia bipunctata</i> par chromatofocusing à une gamme de pH 7-4 en utilisant la fraction liée de l'étape d'affinité. ....	206
Figure 49 : Immuno-détection des GST d'un extrait d'enzymes purifiés et d'un extrait brut d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	208

Figure 50 : Test de spécificité de l'anticorps anti-GST  
*d'A. bipunctata* envers des extraits bruts *d'A. bipunctata*,  
de *Coccinella 7-punctata*, *Episyrphus balteatus*, *Calvia*  
*14-guttata*, de *Myzus persicae* et d'*Aphis fabae*.....208

## Table des Tableaux

Tableau 1 : Classes de métabolites secondaires retrouvés dans divers organismes .....	2
Tableau 2 : Concentrations moyennes en glucosinolates ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ poids sec) d'échantillons de feuilles de diverses espèces de Brassicaceae .....	44
Tableau 3 : Liste des espèces d'insectes phytophages inféodées aux plantes de Brassicaceae .....	50
Tableau 4 : Réponses d' <i>Adalia bipunctata</i> au stade adulte et au deuxième stade larvaire à divers stimuli olfactifs .....	75
Tableau 5 : Durée relative (en %) de résidence d' <i>Adalia bipunctata</i> au stade adulte et au deuxième stade larvaire en réponse à divers stimuli olfactifs.....	78
Tableau 6 : Liste des glucosinolates identifiés dans les échantillons de plantes hôtes et de pucerons .....	90
Tableau 7 : Teneurs en glucosinolates des espèces végétales et des pucerons en fonction de leurs plantes hôtes (en $\mu\text{mol} / \text{g}$ de poids frais).....	91
Tableau 8 : Combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes utilisées comme proies d' <i>Adalia bipunctata</i> . .....	102
Tableau 9 : Liste des croisements réalisés lors de l'étude de l'effet maternel en fonction des différentes combinaisons d'espèces de pucerons et de plante hôte utilisées proies d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	106
Tableau 10: Equations de régression linéaire calculées pour les deux espèces de pucerons selon la plante hôte.....	108
Tableau 11: Résultats récapitulatifs des performances reproductives d' <i>Adalia bipunctata</i> nourrie avec <i>Myzus persicae</i> en fonction de la plante hôte.....	117
Tableau 12 : Purification de la myrosinase du puceron <i>Brevicoryne brassicae</i> .....	163
Tableau 13 : Paramètres cinétiques et activités spécifiques correspondant à huit glucosinolates, déterminés avec la myrosinase purifiée de <i>Brevicoryne brassicae</i> .....	166
Tableau 14 : Quantification des produits de dégradation de huit glucosinolates en présence de la myrosinase purifiée à partir de <i>Brevicoryne brassicae</i> .....	168

Tableau 15 : Purification des glutathion S-transférases de <i>Myzus persicae</i> en utilisant deux types de colonne (Agarose et Sepharose 4B).....	181
Tableau 16 : Quelques propriétés des GST du puceron <i>Myzus persicae</i> purifiées sur colonnes Sepharose 4B et Agarose .....	183
Tableau 17 : Localisation de l'activité glutathion S-transférase (en %) chez <i>Adalia bipunctata</i> .....	203
Tableau 18 : Purification des glutathion S-transférases d' <i>Adalia bipunctata</i> .....	203
Tableau 19 : Quelques propriétés des isoenzymes de GST purifiés à partir de la coccinelle <i>Adalia bipunctata</i> .....	207

**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES  
AGRONOMIQUES DE GEMBLoux  
(Belgique)**

**Unité de Zoologie générale et appliquée**

**Interactions tritrophiques :  
étude du modèle Brassicaceae -  
Pucerons - Coccinelle prédatrice**

Frédéric FRANCIS

Dissertation originale présentée  
en vue de l'obtention du grade de  
docteur en sciences agronomiques et  
ingénierie biologique

Promoteur : Professeur Charles GASPAR

2003

*Copyright.* Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous une autre forme est donc faite en violation de la loi.

**FRANCIS Frédéric (2003). Interactions tritrophiques : étude du modèle Brassicaceae – Pucerons – Coccinelle prédatrice (thèse de doctorat). Gembloux, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, 255 p., 50 fig., 18 tab.**

**Résumé :** Plusieurs combinaisons d'espèces de pucerons et de plantes hôtes ont été testées comme stimuli olfactifs vis-à-vis du prédateur *Adalia bipunctata*. Les larves et les adultes de coccinelle ne sont attirés que par deux espèces de pucerons lorsqu'ils sont broyés, quelle que soit la plante hôte. Les analyses chimiques ont permis de démontrer la présence du (E)- $\beta$ -farnésène en tant qu'unique molécule volatile attractive pour le prédateur. Les effets biologiques des substances allélochimiques végétales identifiées ont été déterminés sur les pucerons mais aussi sur l'auxiliaire aphidiphage. La séquestration des glucosinolates (GLS) et l'émission d'isothiocyanates (ITC) par les pucerons leur procurent une protection vis-à-vis de leurs prédateurs. Les paramètres de développement et de reproduction de la coccinelle prédatrice sont fortement influencés par la plante hôte de leurs proies. Suite à l'étude des systèmes de détoxification chez les pucerons et le prédateur en présence de substances allélochimiques, un modèle co-évolutif des différents protagonistes est proposé. Les Brassicaceae développent le système GLS/myrosinase comme moyen de défense vis-à-vis des pucerons. Deux types de réponses ont été développés par ces derniers. D'un côté, l'espèce généraliste *Myzus persicae* présente des inductions du système glutathion S-transférases (GST), de l'autre, le spécialiste *Brevicoryne brassicae* possède le système myrosinase. Le prédateur *A. bipunctata* produit également des quantités accrues de GST lorsqu'il ingère ou est en présence de substances secondaires. La purification et la caractérisation de la myrosinase aphidienne a été réalisée. L'enzyme purifié présente d'importantes différences de paramètres cinétiques en fonction du substrat GLS. La forme native des GST purifiées chez *M. persicae* par chromatographies d'affinité est homodimérique. L'étude des propriétés catalytiques de ces enzymes purifiés a permis de conclure à la multiplicité des sous-unités de GST chez *M. persicae*. Certaines formes enzymatiques de GST sont majoritairement impliquées dans la réponse de l'insecte face à la présence de substances secondaires dans la plante hôte. Trois isoformes de GST d'*A. bipunctata* ont été purifiées et caractérisées par méthodes chromatographiques et électrophorétiques. Deux des trois formes enzymatiques sont principalement impliquées dans la métabolisation des GLS. La troisième isoenzyme, participe à la détoxification des ITC. Si l'induction des GST est une adaptation des insectes généralistes face à la présence des substances secondaires végétales, le profil de ces enzymes diffère en fonction du niveau trophique considéré dans le modèle étudié, puceron ou prédateur polyphages.



**FRANCIS Frédéric (2003). Tritrophic interactions : study of the Brassicaceae – Aphids – Predatory ladybird model (PhD thesis). Gembloux Agricultural University, 255 p., 50 fig., 18 tab.**

**Summary :** Several combinations of aphid and host plant species were first tested as chemical cues for the *Adalia bipunctata* predator. Both ladybird larvae and adults were only attracted by two aphid species when the latter were crushed, whatever the host plant species. Chemical analysis demonstrated the presence of only (E)- $\beta$ -farnesene as attractive volatile molecule for the predator. The biological effects of the identified plant allelochemicals were determined on both the aphids and the aphidophagous ladybird. The glucosinolates (GLS) sequestration and the isothiocyanates (ITC) release by the aphids constitute an effective protection toward their predators. The development and reproduction of the predatory ladybird were strongly modified by the prey host plant species. According to the study of the detoxification systems of the aphids and the predator in the presence of allelochemicals, a co-evolutionary model was proposed between the three trophic levels. Brassicaceae plants have the GLS/myrosinase system as defence against aphids. Two kinds of biochemical responses were developed by the latter. Either, the polyphagous *Myzus persicae* presents inductions of the glutathione S-transferases (GST), or the specialist *Brevicoryne brassicae* has the myrosinase system. At the third trophic level, the *A. bipunctata* predator also produced higher amounts of GST when the ladybird was in contact with allelochemicals. The aphid myrosinase was purified and characterised. It showed important differences of catalytic parameters depending on the GLS substrate. The native form of the GST purified from *M. persicae* by affinity chromatography is homodimeric. The kinetic study, however, allowed to conclude that multiple GST sub-units occur in *M. persicae*. Some GST isoenzymes are mainly involved in the insect response toward secondary plant substances. Three GST isoforms were purified from *A. bipunctata* and were characterised by chromatographic and electrophoretic methods. Two of them were mainly involved in the GLS metabolism and the third contributes to the ITC detoxication. Whether the GST induction is an insect adaptation to cope with plant secondary metabolites, the enzyme profiles of the latter change according to the trophic level which was considered in the co-evolutionary model, polyphagous aphid or ladybird.

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Charles Gaspar, responsable de l'Unité de Zoologie générale et appliquée et promoteur de cette thèse pour m'avoir permis de travailler à ses côtés dans son Unité. Durant ces quatre dernières années, j'ai eu le privilège de le côtoyer quotidiennement, de m'enquérir de ses connaissances mais aussi de sa personnalité et de ses qualités humaines. L'intérêt et le soutien qu'il m'a apporté dans la réalisation de cette thèse de doctorat et de la thèse annexe ont contribué à l'achèvement de cette étape importante de ma vie de chercheur mais aussi à mon épanouissement personnel.

Je voudrais également adresser mes plus vifs remerciements au Dr Eric Haubruge, chef de travaux à l'Unité de Zoologie générale. Au fils des années, j'ai eu l'occasion de profiter de ses conseils, de son approche intuitive et de ses qualités scientifiques. Si un réel travail combinant différents domaines de l'entomologie a pu être réalisé, il n'y est pas étranger. Son ouverture d'esprit et son goût pour l'innovation auront été à la base de nombreuses discussions et actions fructueuses. En plus des relations professionnelles, j'ai également apprécié sa personnalité.

Le Dr Paul Dierickx de l'Institut de Santé Publique à Bruxelles m'a fait bénéficier de son expérience dans le domaine de la biochimie. Je tiens à le remercier chaleureusement pour l'accueil, la gentillesse et les compétences scientifiques qu'il m'a réservés à de nombreuses reprises lors de mes visites dans son laboratoire. Je le remercie également d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, de l'intérêt et de l'examen minutieux qu'il a réservé à ce travail multidisciplinaire.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Georges Lognay de l'Unité de Chimie générale et organique pour les nombreuses discussions que nous avons partagées ainsi que pour la disponibilité qu'il m'a réservée afin de collaborer et de réaliser la partie chimique de cette thèse. Je le remercie également pour ses commentaires en tant que rapporteur de cette thèse. Je voudrais aussi remercier le Professeur Jean-Paul Wathelet de la même Unité pour sa collaboration concernant la partie relative à sa thématique de recherches, les glucosinolates.

J'adresse également mes sincères remerciements au Professeur Michel Marlier, responsable de l'Unité de Chimie Générale et Organique et membre du jury de cette thèse, pour ses remarques sur le présent document et pour l'intérêt qu'il a porté aux recherches que j'ai développées au sein de l'Unité de Zoologie et de Chimie organique. Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à Monsieur André Théwis, Recteur de notre Faculté et président du jury de cette thèse de doctorat.

Que les étudiants que j'ai eu l'occasion d'encadrer lors de leurs travaux de fins d'études ou autres stages de formation mais aussi les collègues participant quotidiennement depuis plusieurs années aux recherches en lutte biologique au sein de l'Unité de Zoologie soient ici remerciés.

Je m'en voudrais de ne pas remercier les membres de l'Unité de Zoologie pour l'ambiance et la bonne humeur constante qui règne dans l'Unité. C'est un réel plaisir de travailler avec eux. J'espère que les discussions animées que nous avons partagées jusqu'ici perdureront et continueront à créer la cohésion de l'Unité de Zoologie.

Je tiens également à remercier mon épouse et mes enfants pour la patience dont ils ont fait preuve durant la réalisation de cette thèse. J'espère qu'ils continueront à être compréhensifs, patients et qu'ils continueront de la sorte à contribuer à mon épanouissement personnel et professionnel.

Pour conclure, je voudrais dédier cette thèse de doctorat à mes oncle, plus familièrement Tonton, et marraine. Depuis ma plus tendre enfance, ils m'ont offert une seconde cellule familiale et m'ont apporté durant toutes ces années un soutien affectif et matériel qui aura largement contribué à mon épanouissement personnel, scolaire puis professionnel. Honoré et Eva, bien que vous soyez toujours restés dans l'ombre, que votre gentillesse et votre dévouement envers moi soient pour une fois mis au grand jour. Trouvez ici toute la reconnaissance et les remerciements que vous méritez.

### ***Publications en rapport direct avec la thèse***

1. Francis F., Haubruge E. & Gaspar C. (1999). Effects of isothiocyanates on the glutathione S-transferases activity from *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera : Coccinellidae). *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 64 / 3a, 297-303.
2. Francis F., Broon D. & Haubruge E. (1999). Studies of the glutathione S-transferases activities and their localisation in *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera : Coccinellidae). *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 64 / 3a, 349-355.
3. Francis F., Haubruge E., Hastir P. & Gaspar C. (1999). Effect of host plants on Brassicaceae specialist/ generalist aphids and their natural predator *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera : Coccinellidae). *IOBC wprs Bulletin - OILB srop* 22 : 2, 17.
4. Francis F. (1999). Conséquences évolutives des relations entre le puceron et son prédateur en présence de substances allélochimiques chez les Brassicaceae. *5<sup>ème</sup> Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, Annales ANPP*, Tome II, 503-510.
5. Francis F., Haubruge E. & Gaspar C. (2000). Influence of host plants on the development of the specialist / generalist aphid and on their natural predator *Adalia bipunctata*. *European Journal of Entomology* 97, 481-485.
6. Francis F., Haubruge E., Defrance T. & Gaspar C. (2000). Environmentally based maternal effect on reproduction of *Adalia bipunctata* : impact of aphid prey species. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 65:2, 303-310.
7. Francis F., Haubruge E., Arnaud L. & Gaspar C. (2000). Induction of ladybird glutathione S-transferases as a response to allelochemical presence in the aphid prey. *17<sup>th</sup> meeting of the International Society of Chemical Ecology, August 15-19, Poços de Caldas, Brazil*, Abstract.
8. Francis F., Haubruge E. & Gaspar C. (2000). Aphid host plant and food suitability for aphidophagous larvae : impact on ladybird reproductive performances. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Council Conference* 3, 1025-1030.

9. Francis F., Lognay G., Wathelet J.P.& Haubruge E. (2001). Effects of allelochemicals from first (Brassicaceae) and second (*Myzus persicae* & *Brevicoryne brassicae*) trophic levels on *Adalia bipunctata*. *Journal of Chemical Ecology* 27, 243-256.
10. Francis F., Haubruge E., Hastir P. & Gaspar C. (2001). Influence of the aphid host plant on the development and reproduction of the third trophic level, the predator *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera : Coccinellidae). *Environmental Entomology* 30:5, 947-952.
11. Vanhaelen N., Francis F., Lognay G., Gaspar C. & Haubruge E. (2001). The use of plant allelochemicals by aphids as defence against two generalist predators. *The Ecology Special Interest Group Meeting 2001, The Ecology of Insect Herbivores*, 3 octobre 2001, Royal Entomological Society, Londres, Abstract.
12. Vanhaelen N., Gaspar C. & Francis F. (2002). Influence of prey host plant on development and reproduction of two aphidophagous predators, *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae) and *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *European journal of Entomology* 99:4, 561-564.
13. Francis F., Dierickx & Haubruge E. (2002). Isoenzymes of glutathione S-transferase from the two-spots ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 49:3, 158-166.
14. Lognay G., Francis F., Arnaud L., Vanhaelen N., Gaspar C., Marlier M., Haubruge E. (2002). Rapid headspace SPME-GCMS screening of semiochemicals from aphids and flour beetles. *7<sup>th</sup> Congress on Hyphenated Techniques in Chromatography*, Bruges, 6-8<sup>th</sup> February 2002, 1-2.
15. Vanhaelen N., Gaspar C., Hastir P. & Francis F. (2002). Aphid prey suitability as environmental effect on *Adalia bipunctata* reproduction. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* (sous presse).
16. Francis F., Wathelet J.P.& Lognay G. (2002). Differences in glucosinolate degradation products related to aphid and Brassicaceae host plant myrosinases, *Bulletin GCIRC* (sous presse).

17. Vanhaelen N., Haubruge E., Gaspar C. & Francis F. (2002). Responses and adaptations of *Episyrphus balteatus* and *Adalia bipunctata* to allelochemicals from Brassicaceae plant through their preys. 8<sup>th</sup> *International Symposium on Ecology of Aphidophaga, Azores 2002. Proceeding abstract* 68.
18. Francis F., Lognay G., Wathelet J.P. & Haubruge E. (2002). Characterisation of aphid myrosinase and degradation studies of glucosinolate. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 50:4, 173-182.

## **Partie bibliographique**

## **Partie expérimentale**