HAL
open science

Stockage et mobilisation de la tyrosine au cours du développement larvaire de Spodoptera littoralis (Lepidoptère; Noctuidae)

Yvan Rahbé

To cite this version:

Yvan Rahbé. Stockage et mobilisation de la tyrosine au cours du développement larvaire de Spodoptera littoralis (Lepidoptère; Noctuidae). Biochimie [q-bio.BM]. AgroParisTech, 1984. Français. NNT : . tel-00665092

HAL Id: tel-00665092

https://theses.hal.science/tel-00665092v1

Submitted on 1 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

PRESENTEE A L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
PARIS-GRIGNON

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGENIEUR

"SCIENCES AGRONOMIQUES"

STOCKAGE ET MOBILISATION DE LA TYROSINE AU COURS DU DEVELOPPEMENT LARVAIRE DE SPODOPTERA LITTORALIS

(Lépidoptère ; Noctuidae)

par

YVAN RAHBE

Ingenieur agronome de
l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Soutenue le 1984 devant la commission d'examen

Mr COSTES	Président
Mr ARNAL	Rapporteur
Mr BONNOT	Examinateurs
Mr CASSIER	
Mr PELLENARD	

Le travail présenté ici a été effectué entre DECEMBRE 82 et OCTOBRE 84 dans le laboratoire de biologie appliquée du professeur LAVIOLETTE, de l'INSA de LYON (laboratoire associé INRA, département de ZOOLOGIE).

La direction des travaux a été assurée par Mᵉ Guy BONNOT, maitre de recherches à l'INRA.

Je voudrais ici exprimer ma sincère reconnaissance à messieurs :

COSTES, professeur à l'INA-PG, directeur du jury

ARNAL, maitre de recherches à l'INRA de THEIX, rapporteur

BONNOT, maitre de recherche à l'INRA, LYON

CASSIER, professeur à l'université de PARIS VI

PELLENARD, ingénieur R. & D. à RHONE-POULENC AGROCHIMIE

pour avoir accepté de juger mes travaux et de participer à ce jury de thèse.

REMERCIER : (1360 ; de re-, et anc. fr.mercier)

1° Dire merci poliment, témoigner quelque reconnaissance (à qqn)

2° Renvoyer poliment

Toutes les personnes m'ayant permis de travailler dans les meilleures conditions sauront reconnaitre le sens de ma démarche!

et plus particulièrement:

Annie, Chaqué, Christianne, Colette, Françoise, Jacqueline, Jeanne et Josette.

mais aussi:

Bernard, Gilbert, Gilles, Gérard, Guy, François, Paul, Simon et Yves.

et évidemment monsieur le professeur LAVIOLETTE.

Je ne voudrais cependant pas oublier ERIC, dont le soutien moral et statistique a été des plus appréciés, ni VERONIQUE, dont la patience parisienne reste inestimable!

PLAN

Biochimie de la TYROSINE chez les lépidoptères :
formes de stockage et de mobilisation de la tyrosine au cours du développement larvaire de Spodoptera littoralis.

INTRODUCTION

A PRESENTATION DU SUJET

1 présentation des travaux

2 biochimie de la tyrosine chez les insectes
2.1 différentes formes et dérivés des acides aminés aromatiques chez les insectes
2.1.1 tyrosine et protéines
2.1.2 composés aromatiques et mélanisation
2.1.3 composés aromatiques et neurotransmission
2.1.4 quinones et stratégies de défense
2.1.5 composés aromatiques divers
-peptides
-glucosides
-esters
2.1.6 tyrosine et sclérotisation
2.2 métabolisme général des acides aminés aromatiques
2.2.1 métabolisme de la chaîne latérale
2.2.2 oxydations du cycle aromatique
2.3 catabolisme du noyau aromatique

3 modèle pour la physiologie du "système tyrosine" chez les insectes

B MATERIEL ET METHODES

1 élevage et détermination des paramètres biologiques de S.littoralis
1.1 élevage
1.2 détermination des paramètres biologiques de S.littoralis
1.2.1 expérience
1.2.2 développement et mortalité
1.2.3 capsules céphaliques
1.2.4 croissance
1.2.5 sexage
1.3 détermination des paramètres nutritionnels
1.3.1 expérience sur les gels conditionnés
1.3.2 expérience sur l'assimilation des acides aminés
1.4 récolte d'hémolymphe de chenilles de lépidoptères
1.4.1 élevage ou origine des chenilles
1.4.2 prélèvements d'hémolymphe

2 compartiment de faible poids moléculaire: acides aminés et peptides.
2.1 préparation des échantillons; extractions; stockage
2.2 méthodes analytiques
2.2.1 autoanalyse d'acides aminés
2.2.2 chromatographie liquide sous haute pression
2.2.3 pression osmotique; pH
2.3 méthodes préparatives
2.3.1 chromatographie d'échange d'ions
2.3.2 chromatographie sur SiNH2 préparative
2.4 identification des composés
2.4.1 cristallisations
2.4.2 synthèse de Bglc TYR
2.4.3 co-chromatographies

PLAN

2.4.4 propriétés spectroscopiques

3 compartiment de haut poids moleculaire: protéines
3.1 préparation des échantillons; stockage
3.2 dosages; spectrophotométrie
3.2.1 méthode de LOWRY-PETERSON
3.2.2 méthode de BRADFORD
3.2.3 densitométrie sur plaques d'électrophorèse
3.2.4 spectrophotométrie visible
3.3 chromatographies
3.3.1 chromatographie de perméation sur gel
3.3.2 chromatographie sur hydroxyapatite
3.3.3 H.P.L.C
3.4 électrophorèse
3.4.1 électrophorèse sur gradient d'acrylamide avec S.D.S.
3.4.2 électrophorèse sur gradient d'acrylamide sans S.D.S.
3.4.3 électrophorèse sur gel d'acrylamide sans gradient, en présence de S.D.S.
3.5 électrofocalisations
3.5.1 sans urée
3.5.2 avec urée
3.6 immunologie
3.6.1 préparation de l'immun sérum
3.6.2 immunoprécipitations

4 enzymologie-endocrinologie-marquage radioactif
4.1 enzymologie
4.1.1 analyses qualitatives rapides
4.1.2 B glucosyl transférase
4.1.2.1 sur homogénats
4.1.2.2 sur tissus intacts
4.1.3 B glucosidase
4.1.3.1 mise en évidence de l'activité
4.1.3.2 dosage au cours du développement
4.1.3.3 purification
4.1.3.4 propriétés
4.2 endocrinologie
4.2.1 échantillons
4.2.2 séparation des hormones juvéniles
4.2.3 séparation des ecdystéroïdes
4.2.4 radio immuno essai
4.3 radioactivité
4.3.1 mesure du volume d'hémolymphe par dilution isotopique
4.3.2 expérience de marquage des composés aromatiques

5 Statistique et analyse des données
5.1 statistique descriptive - tests classiques
5.2 analyse discriminante
5.3 analyse des correspondances
5.4 classification hiérarchique

C RESULTATS ET DISCUSSION

1 biologie et physiologie générale de S.littoralis
1.1 caractéristiques du cycle biologique de S.littoralis en laboratoire
1.1.1 développement
1.1.2 croissance

PLAN

1.1.3 âge physiologique
1.1.4 évaluation de l'état de l'élevage
1.2 nutrition
1.2.1 quelques paramètres nutritionnels
1.2.2 absorption intestinale des acides aminés
1.3 quelques caractères physiologiques de S.littoralis
1.3.1 le tissu adipeux
1.3.2 l'hémolymphe
1.3.2.1 volume
1.3.2.2 pH et pression osmotique
1.3.3 divers

2 acides aminés et peptides
2.1 identification des principales formes de tyrosine de petit P.M.
2.1.1 tyrosine libre
2.1.2 glucoside de tyrosine
2.1.3 peptides contenant de la tyrosine
2.1.4 pics non identifiés
2.2 dosage de la tyrosine et de son glucoside au cours du développement
2.2.1 concentrations
- dans les tissus totaux
- dans l'hémolymphe
2.2.2 quantités
- dans l'animal entier
- dans l'hémolymphe
2.3 évolution des acides aminés dans le dernier stade larvaire
2.3.1 acides aminés libres
2.3.2 acides aminés peptidiques

3 protéines
3.1 identification d'une protéine de stockage des acides aminés aromatiques
3.1.1 mise en évidence
3.1.1.1 électrophorèses
3.1.1.2 purification
3.1.2 dosage en fin de vie larvaire
3.1.2.1 protéines totales
3.1.2.2 évolution du profil protéique
3.2 propriétés de l'arylphorine de S.littoralis
3.2.1 poids moléculaire
3.2.2 pigment associé
3.2.3 composition en acides aminés
3.2.4 propriétés diverses
3.3 protéines de stockage et métamorphose:les arylphorines chez les lépidoptères

4 enzymologie-endocrinologie-marquage
4.1 activité "BglcTYR synthétase"
4.2 activité "BglcTYR hydrolase"
4.2.1 analyses enzymatiques rapides
4.2.2 mise en évidence de l'activité
4.2.3 dosage de la B glucosidase au cours du développement
4.2.4 propriétés
4.3 contexte hormonal
4.3.1 ecdystéroïdes
4.3.2 hormones juvéniles
4.4 marquage radioactif

PLAN

D DISCUSSION GENERALE:
essai de synthèse sur la physiologie du "système tyrosine" au cours du développement d'un lépidoptère

1 le développement embryonnaire

2 les premiers stades larvaires
  2.1 la croissance
  2.2 les mues larvaires

3 le dernier stade larvaire
  3.1 l'accumulation
  3.2 la prénymphe
  3.3 la mue nymphale

4 la nymphe
  4.1 la vie nymphale
  4.2 la mue imaginale

5 l'adulte

CONCLUSION

PRINCIPALES ABBREVIATIONS UTILISEES

DOC: Deoxycholate de sodium
TCA: Acide trichloracétique
TRIS: Hydroxymethylaminométhane
TEMED: N N N'N' tetramethylethlènediamine
BME: B mercapto-ethanol
SDS: Dodécyl sulfate de sodium
PTU: phényl thio-urée

Bglc TYR : B-D-glucopyranosyl O-L-tyrosine
DOPA : 3,4-Dihydroxyphénylalanine
DA : Dopamine (3,4-Dihydroxyphénylethylamine)
NADA : N-acetyl Dopamine
NBAD : N-B alanyl Dopamine
Bglc NBAD : B-D-glucopyranosyl 4 O-(N-B alanyl Dopamine)
pNH2 PHE : para amino phénylalanine
NVAL : nor Valine
A Am. B. : acide amino butyrique
B Am. B. : acide amino isobutyrique
ORN : ornithine
CYSTA :cystathionine
GLX : GLU + GLN
ASX : ASP + ASN
BSA : serumalbumine bovine
(V)HDL : Lipoprotéine de (très) haute densité
pNP(G) : para nitro-phénol (B glucoside de -)
JH : hormones juvéniles

HPLC: chromatographie liquide sous haute pression
PAGE: électrophorèse en gel continu d'acrylamide
PAGGE: électrophorèse en gradient d'acrylamide
D.O.: densité optique
I.R.: Infra rouge
U.V.: Ultra violet
RMN: Resonnance magnétique nucléaire
P.M.: Poids moléculaire
Si-NH2: support de colonne de silice greffée amino.
RIA: radio immuno essai
CCM: chromatographie en couches minces

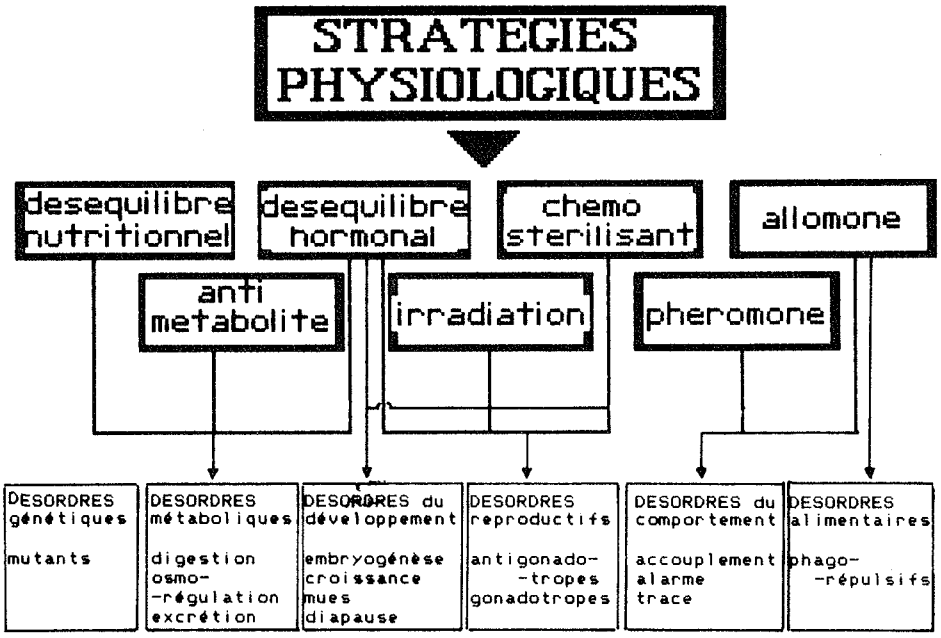


figure 1: Stratégies physiologiques de lutte contre les insectes; cibles et désordres induits (d'après MANSINGH, 1976).

Ils constituent actuellement près de 80 % des espèces animales décrites.Ils présentent une étonnante adaptabilité aux divers écosystèmes terrestres, naturels ou transformés. Et malgré les transformations drastiques qu'ont subies leurs milieux de vie avec l'extension des sociétés humaines, les refoulant souvent dans des "stations refuges" (BALACHOWSKY, 1950) de plus en plus réduites, certains d'entre eux connaissent périodiquement d'extraordinaires croissances de populations dans les nouveaux environnements engendrés par l'homme.

Ils ? ...ce sont les insectes, bien sûr !

Ceux qui, comme le criquet migrateur, le doryphore ou le phylloxéra, sont ou ont été synonymes de catastrophes agricoles majeures, qui comme le moustique ou la punaise de Chagas, sont responsables d'endémies redoutables dans certains pays tropicaux. Mais aussi ceux, comme les pollinisateurs et les entomophages, sans lesquels de nombreuses cultures ne pourraient être ce qu'elles sont. Les ravageurs animaux, dont les plus nuisibles sont les insectes phytophages, occasionnent à eux seuls de 6 à 17 % des pertes, selon les récoltes, par rapport à la production potentielle mondiale (CRAMER, 1970).

Au-delà des généralités ou de l'anecdote (!), ces différents points de vue montrent que les insectes méritent bien l'intéret qu'on leur porte. Depuis les débuts de la protection des végétaux où les méthodes culturales de lutte prédominaient, différentes stratégies ont vu le jour avec l'évolution des connaissances et des techniques : chimique avec l'essor des insecticides, puis biologique et écologique, mais aussi stratégies génétique et physiologique.

L'un des intérêts de la physiologie de l'insecte est de pouvoir se placer à plus ou moins long terme dans ce cadre finalisé.On pourrait définir ici la stratégie physiologique de lutte comme "la connaissance et l'intégration des spécificités physiologiques et biochimiques des insectes, permettant la maîtrise de notre action sur eux par des interventions sur leurs points vulnérables" (d'après MANSINGH, 1976). Une représentation schématique des multiples actions possibles est donnée en figure 1. Les particularités biochimiques à explorer sont très variées, et l'on peut citer l'approche des antimétabolites, tels qu'analogues de vitamines, d'acides nucléiques ou d'acides aminés (PENCE, 1963), ou bien celle des substances hormonomimétiques dont l'importance et la diversité des effets physiologiques permet d'espérer beaucoup.

Cependant, nos besoins en connaissances de physiologie de l'insecte

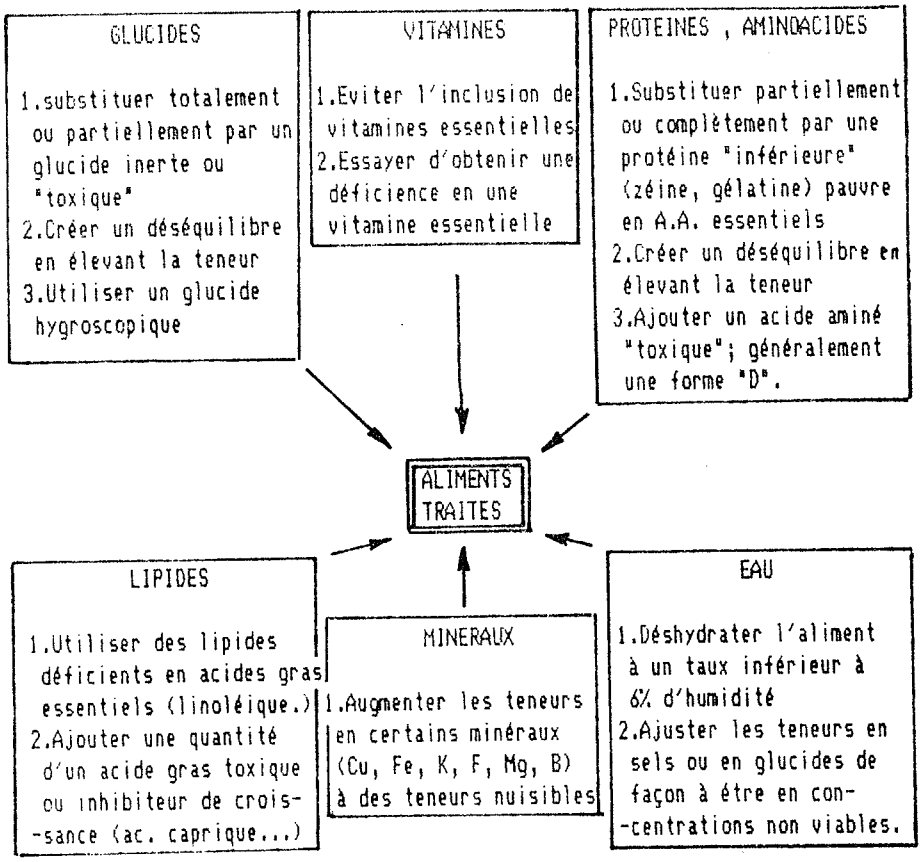
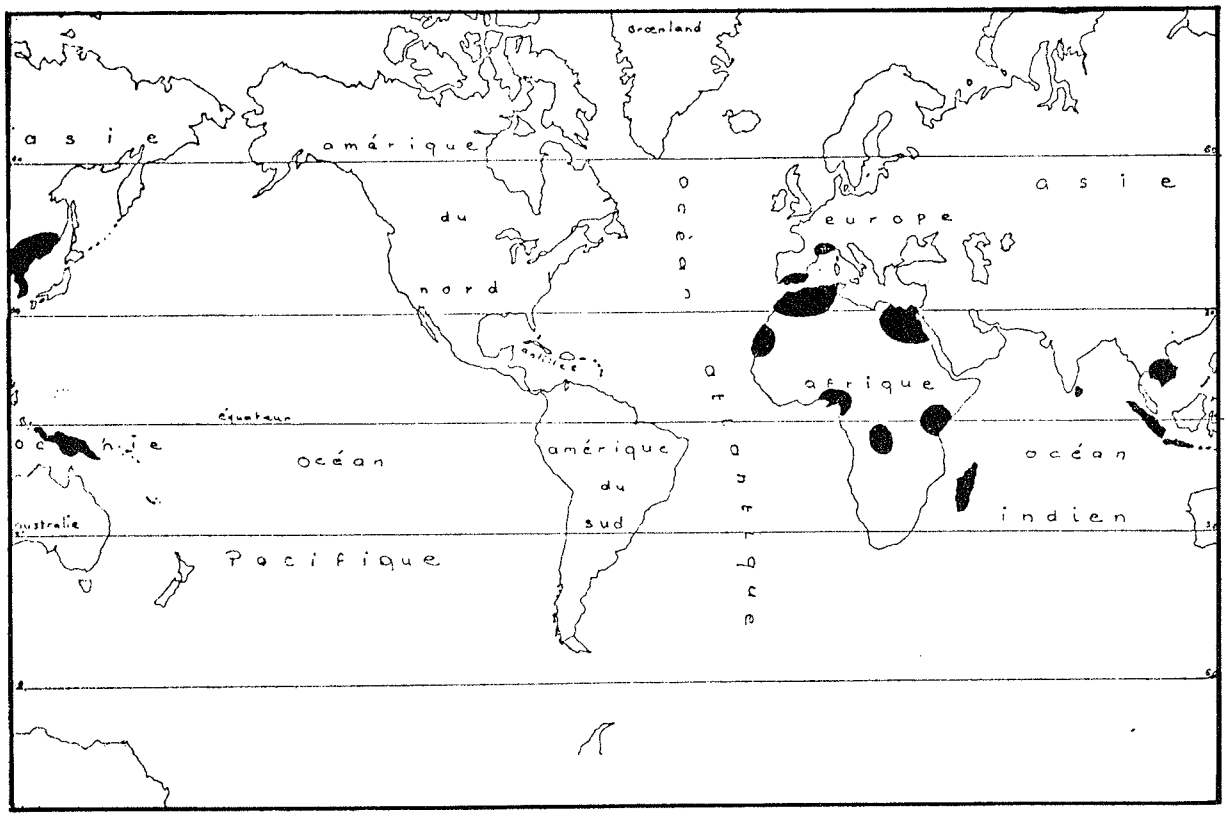


figure 2: Approche nutritionnelle de lutte contre les insectes des denrées stockées (d'après PRATT, HOUSE et MANSINGH, 1972).



Répartition géographique de Spodoptera littoralis B.

BENITO-ESPINAL d'après BALACHOWSKY 1972
1976

ne se limitent pas à une optique de lutte. La nutrition, qui a déjà fourni de nombreux axes et moyens de lutte, notamment pour la protection des denrées stockées (figure 2), est aussi un outil précieux dans beaucoup de cas où l'élevage de l'insecte demeure problèmatique, voire impossible. Il en est malheureusement ainsi de nombreux insectes auxiliaires potentiellement utilisables en lutte biologique, dont les entomophages endoparasites sont un exemple type. Leur élevage demande d'une part un savoir faire technique primordial permettant de recréer des conditions physiques proches de celles du milieu intérieur de l'insecte parasité et acceptables par l'animal en culture, et d'autre part une appréciation fine de besoins nutritionnels généralement stricts. Cette dernière est en partie faite d'une connaissance approfondie de la physiologie de l'hôte : dynamiques et spectres d'accumulation des lipides et des protéines, osmorégulation, modalités du catabolisme et de l'excrétion (acide urique...). Elle nécessite en outre la détermination de caractères biologiques du parasite parfois difficiles à saisir : position dans la larve hôte, évolution précise du régime alimentaire...

L'étude que nous allons exposer ici a été entreprise sous le double point de vue qui vient d'être développé. La tyrosine, acide aminé semi-indispensable chez les insectes, se situe au carrefour de diverses voies métaboliques importantes. Sa biochimie et son intégration dans la physiologie nutritionnelle des insectes présentent d'ailleurs plus d'une caractéristique intéressante, formant un "système tyrosine" dont les fonctions sont en grande partie originales dans le règne animal ; de là son intérêt dans l'optique d'une stratégie physiologique de lutte. D'autre part, dans le cadre d'un travail sur la nutrition in vitro d'une Tachinaire endoparasite, Lixophaga diatraeae (Dipt. Tachinidae), il a semblé intéressant d'approfondir certains aspects de la biochimie de la tyrosine chez un hôte de ce parasite. La recherche des modalités de stockage de la tyrosine a donc été entreprise chez une larve de phytophage type, la noctuelle Spodoptera littoralis (Lep. Noct.). Ce modèle a été préféré à l'hôte habituel de laboratoire Galleria mellonella (Lep. Gallerïidae), car il représente mieux les Lépidoptères ravageurs phytophages (Galleria possède en effet un régime alimentaire particulier, composé de cire et de pollen, qui aurait pu gêner l'interprétation d'expériences de physiologie nutritionnelle générale).

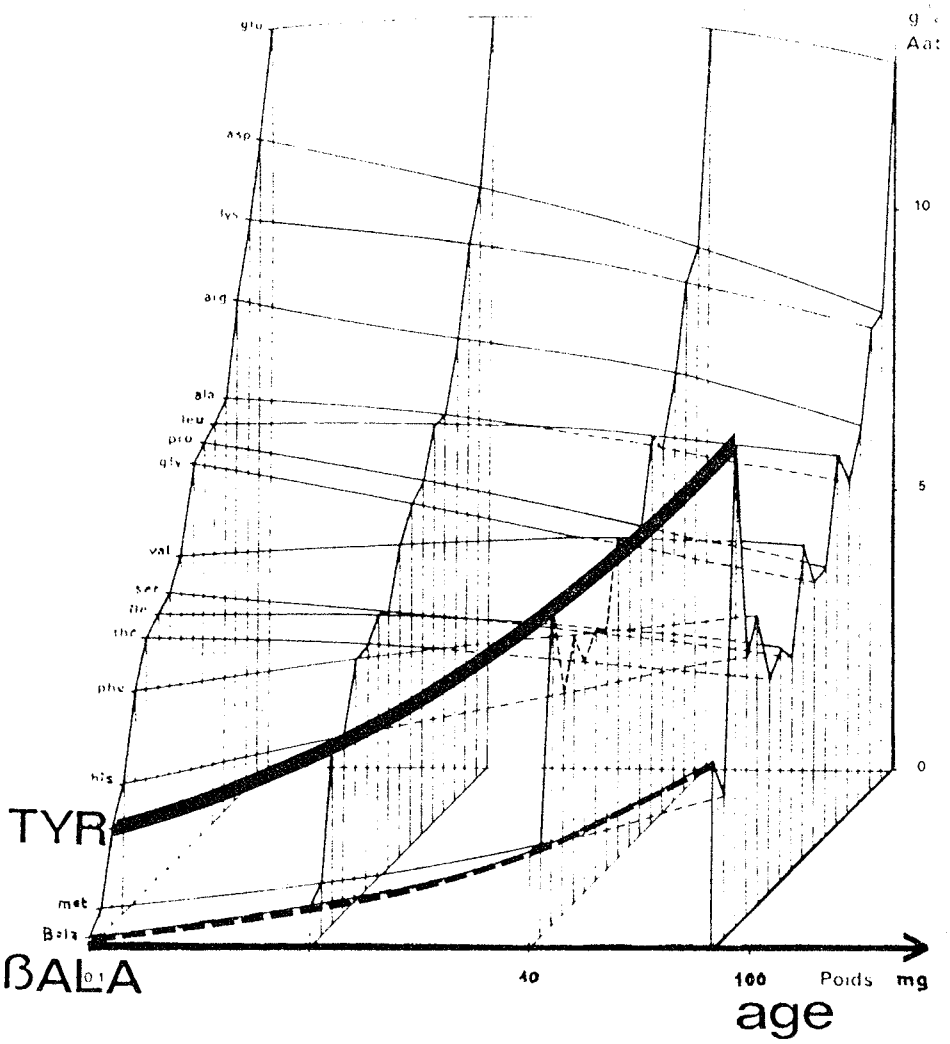


figure 3: Evolution de la composition relative en acides aminés de la larve du diptère endoparasite PHRYXE CAUDATA (BONNOT et coll., 1976).

A. PRESENTATION DU SUJET

1. PRESENTATION DES TRAVAUX :

Dans un travail sur les variations de la composition corporelle en acides aminés d'une Tachinaire parasitoïde (BONNOT et coll., 1976), il est nettement apparu que la tyrosine tenait une place particulière par son évolution différente de la plupart des autres aminoacides (figure 3). En effet, son importante accumulation relative traduit un accroissement notable des besoins quantitatifs journaliers en tyrosine. Cela ne pouvait être ignoré dans le cadre d'essais nutritionnels in vitro. Par la suite, les comparaisons de composition entre larves élevées sur Galleria et sur milieux artificiels ont fait apparaître les constants déficits en tyrosine de ces dernières. En effet, l'incorporation de tyrosine dans les milieux se trouve physiquement limitée par sa faible solubilité. Une question s'est alors posée : sous quelle forme physiologique la tyrosine est-elle fournie au parasite dans la larve de Lépidoptère ?

La réponse a été fournie avec la découverte du B glucoside de la tyrosine chez Manduca sexta (KRAMER et coll.,1980) et chez G. mellonella dans notre laboratoire (PASQUET et DELOBEL, 1982). De nombreuses questions se sont alors posées sur ce conjugué de la tyrosine : quelle est son importance quantitative ; est-il présent tout au long du développement ; quelles sont ses fonctions précises ? Notre travail sur S.littoralis a donc cherché à répondre à certaines de ces questions, et à en susciter d'autres.

Il sera présenté en quatre parties plus ou moins distinctes, pour la clarté de l'ensemble. Une synthèse des résultats acquis, au sein d'un exposé sur le "système tyrosine", sera ensuite tentée. Nous traiterons ainsi de :

1.1. L'ELEVAGE : N'étant pas implanté au laboratoire, l'élevage de S. littoralis a du être introduit à partir de l'expérience de la Station INRA de Zoologie d'AVIGNON sur l'élevage des noctuelles. Pour les études de physiologie, un grand nombre de points relatifs à la biologie et à la nutrition ont du être préalablement abordés.

En effet, la connaissance du cycle biologique précis dans nos conditions d'élevage est tout à fait indispensable, de même que celle des caractéristiques de croissance. L'observation fine du comportement des larves est aussi nécessaire à l'établissement d'une échelle physiologique des âges, notamment au dernier stade larvaire. D'autre

part, de nombreuses données sur l'alimentation et la nutrition ont été recueillies pour déterminer certains flux de tyrosine .Certains caractères n'ayant pas toujours directement trait au sujet, seront exposés de façon concise et pourront éventuellement servir à des travaux ultérieurs de physiologie sur S.littoralis. Quelques résultats utiles d'autres auteurs seront aussi réunis dans ce but.

1.2. LE COMPARTIMENT DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE : La première étape étant l'identification éventuelle de la B glucosyl tyrosine chez S.littoralis, nous avons ensuite mis au point une méthode de dosage au cours du développement. Les autres formes de tyrosine ont aussi été recherchées dans ce compartiment (tyrosine libre, autre conjugué, peptides...).

1.3. LE COMPARTIMENT DE HAUT POIDS MOLECULAIRE : Physiologiquement distinct du précédent, il est aussi décrit séparément, car les techniques d'étude sont très différentes. Les questions que nous avons tenté d'élucider dans ce cas sont : existe-t-il un stockage spécifique de la tyrosine sous forme protéique ? Si oui, quelle est son importance et quelles sont les propriétés de ces polypeptides ? Enfin, ont-ils un rôle particulier dans les différentes étapes du développement et de la métamorphose de S.littoralis ?

1.4. ENZYMOLOGIE, ENDOCRINOLOGIE ... : Ce dernier chapitre regroupe les résultats relatifs à la régulation des variations des différentes formes de la tyrosine. Quels sont les enzymes mises en jeu et où sont-elles localisées ? Quel est le déterminisme endocrinien impliqué ? Existe-t-il des liens entre les divers compartiments et leurs rôles sont-ils distribués strictement ?

Avant d'aller plus loin, il semble nécessaire de faire le point sur les connaissances acquises jusque là dans ce domaine. C'est pourquoi nous essayerons de résumer l'abondante bibliograhie sur la biochimie de la tyrosine chez les insectes. Nous proposerons aussi un modèle de base pour la physiologie du "système tyrosine", qui pourrait servir de cadre aux discussions sur ses composants et les inter-relations qu'ils entretiennent ; ici comme ailleurs, une des tâches les plus délicates est en effet de réunir toutes les observations en un ensemble complet et cohérent.

2. BIOCHIMIE DE LA TYROSINE CHEZ LES INSECTES :

D'une façon générale, les besoins nutritionnels des insectes en acides aminés aromatiques sont qualitativement peu différents de ceux des Mammifères (LIPKE et FRAENKEL, 1956 ; GILMOUR, 1961 ; DADD, 1973) : La phénylalanine et le tryptophane figurent parmi les dix acides aminés indispensables. Les insectes sont en effet incapables de synthétiser le cycle aromatique par la voie du shikimmate et de l'acide chorismique, qui conduit chez la plupart des microorganismes et des plantes à la phénylalanine et la tyrosine (par la voie de l'acide préphénique), ou au tryptophane (par la voie de l'acide anthranilique) Pour plus de détails sur ces voies, se reporter à l'annexe 1.

Les rares observations d'autotrophie vis-à-vis du noyau aromatique ont été attribuées à la présence de symbiontes intracellulaires : l'incorporation dans les acides aminés aromatiques de radioactivité provenant d'U-C14 glucose est en effet absente chez une souche rendue aposymbiotique de Blatella (HENRY, 1962). Des conclusions analogues sont faites chez certains Coléoptères curculionides (WICKER et NARDON, 1982), mais la plupart des Diptères et des Lépidoptères, dépourvus d'endosymbiontes, sont totalement tributaires d'un apport exogène (KASTING et Mc GINNIS, 1962).

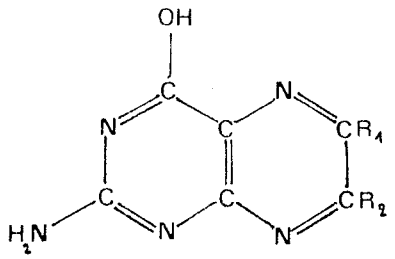
La tyrosine elle-même possède un statut d'acide aminé semi-indispensable : en effet, des injections de C14 phenylalanine à Bombyx mori entraînent rapidement l'apparition de tyrosine marquée dans la soie secrétée (FUKUDA, 1956). La phénylanine-4-hydroxylase a été identifiée chez de nombreux insectes (SCHLORER et coll., 1970), mais l'activité réverse n'a jamais été rapportée.

A partir de ces apports alimentaires d'acides aminés, mais aussi parfois d'autres substances phénoliques (BERNAYS et coll, 1983), les insectes synthétisent une variété impressionnante de molécules aromatiques aux fonctions les plus diverses. Nous essayerons d'abord de signaler et regrouper les différents composés décrits dans la littérature, puis de dégager les particularités (notamment vis-à-vis de la situation chez les vertébrés) de quelques métabolismes importants (chaîne latérale, métabolisme oxydatif, dégradation).

2.1. DIFFERENTES FORMES ET DERIVES DES ACIDES AMINES AROMATIQUES CHEZ LES INSECTES :

2.1.1. Tyrosine et protéines :

La tyrosine, ainsi que les autres acides aminés aromatiques, sont évidemment incorporés dans les protéines des insectes. Cependant, il existe quelques cas où la tyrosine joue un rôle particulier dans la structure et la propriété des protéines l'incorporant. C'est ainsi

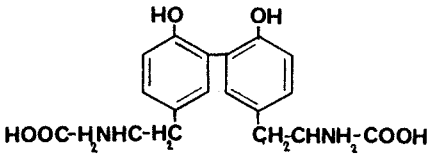


R1	R2	PIGMENT	COULEUR
OH	H	Xanthoptérine	jaune
OH	OH	Leucoptérine	blanc
H	OH	Isoxanthoptérine	incolore
COOH	H	2-amino hydroxyptéridine 6-carboxylate	jaune
OH	CH(OH)=C(OH)-CH_2-OH	Erythroptérine	rouge

figure 4: Structure chimique de quelques ptéridines rencontrées chez les insectes (dans BURSELL, 1970)

qu'une protéine nommée résiline et de propriétés physiques analogues à celle de l'élastine, a été extraite des cuticules souples intersegmentaires de certains insectes (* 1);sans structures secondaires marquées, elle se présenterait sous la forme d'un réseau protéique lâche, consolidé par des liaisons mettant en jeu des tyrosines révélées à l'hydrolyse par la présence de di et de tri-tyrosine (*2):

dityrosine de Schistocerca



D'autres protéines cuticulaires, beaucoup plus rigides, utilisent aussi des éléments dérivés de la tyrosine pour la stabilisation de leurs structures spatiales. Les insectes, contrairement à beaucoup d'animaux et même d'arthropodes, n'utilisent pas les sels de calcium comme support à leur squelette rigide ; ce sont ici les sclérotines (PRYOR, 1940) qui remplissent cette fonction primordiale. L'identité chimique, immunologique ou génétique de ces protéines est encore loin d'être établie car leurs propriétés physicochimiques les rendent réfractaires à l'investigation par de nombreuses techniques. En fait, l'étude de ces protéines in situ est indissociable de celle des différents mécanismes de sclérotisation ; nous en reparlerons par la suite.

Un troisième type de protéines est constitué par une forme de stockage protéique, généralement soluble, très riche en acides aminés aromatiques. A la suite de TELFER (1983) , de RIDDIFORD et LAW (1983), nous les nommerons arylphorines de préférence à la nomenclature utilisée auparavant (Calliphorine, *3 ; Manducine, *4). Ces protéines étant l'objet d'une bonne partie de notre étude, nous ne nous y étendrons pas ici.

2.1.2. Composés aromatiques, pigments et mélanisation :

La variété des colorations rencontrées dans la classe des insectes est une de ses caractéristiques les plus spectaculaires. Mais outre l'impressionnante palette des couleurs d'origine physique, la plupart des insectes synthétisent un bon nombre de pigments. Ils sont souvent déposés dans les structures tégumentaires et leurs dérivés et peuvent être classés dans plusieurs groupes :

- les ptéridines, dont la structure chimique de base est montrée en figure 4. Souvent déposés dans les yeux composés de divers insectes, ils présentent parfois une forte photoréactivité suggérant leur intervention dans la physiologie de la vision (VUILLAUME, 1980). Ils

(*1) Pour alléger le texte, les signes * de ce chapitre renvoient aux réf érences reportées en annexe 2.

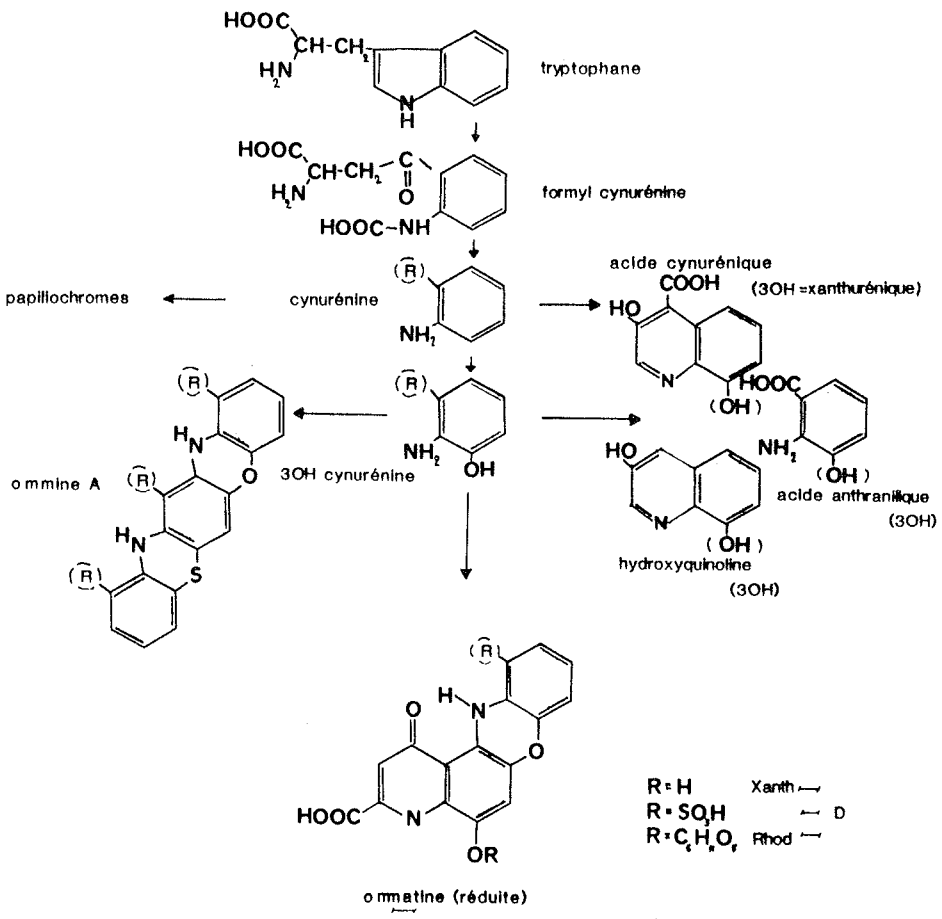


figure 5: Voies de biosynthèse des ommochromes des insectes (d'après BUTENANDT, 1960).

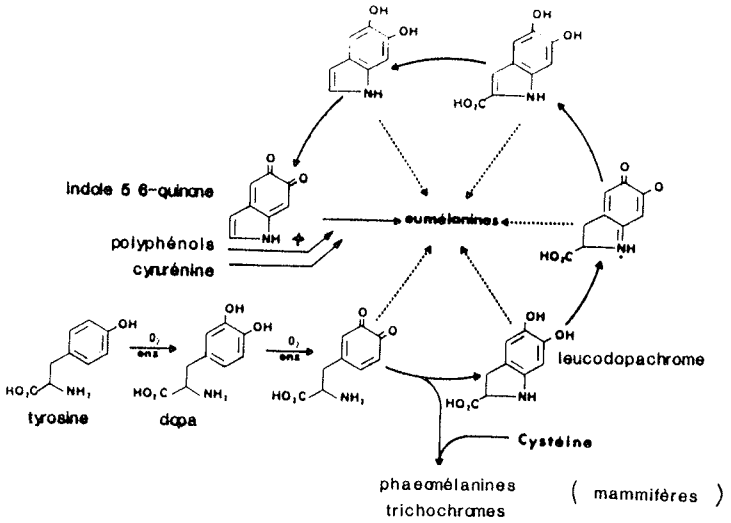


figure 6: Voies de biosynthèse des mélanines (d'après PROTA et THOMSON, 1976).

sont probablement dérivés de précurseurs puriques qui, après ouverture du cycle imidazole, réagiraient avec des composés dicarboxylés du type glyoxylate (BURSELL, 1970).

- les ommochromes, également impliqués dans la vision au niveau des cellules migrantes des ommatidies, forment une famille aux structures complexes dérivées du tryptophane. La figure 5 représente des étapes de la synthèse de quelques uns de ces pigments.

- les caroténoïdes, comme le β carotène et la lutéine, fréquemment associés à des protéines de l'hémolymphe (CHEESMAN et coll., 1960).

- des pigments biliaires sont aussi retrouvés liés à des protéines hémolymphatiques (CHOUSSY et coll., 1973). Ce sont le plus souvent, du moins chez les Lépidoptères, des composés tétrapyroliques linéaires de la série IX gamma ou alpha.

- les mélanines, enfin, dont les structures chimiques complexes sont loin d'être élucidées, forment une bonne partie des pigments bruns ou noirs. Leur biosynthèse semble suivre des voies peu différentes de celles des eumélanines de mammifères (MASON, 1948), débutant par l'oxydation de la tyrosine et l'indolisation de la DOPA résultante. Les étapes ultérieures, encore très peu claires, peuvent intégrer d'autres précurseurs tels que polyphénols et dérivés du tryptophane (figure 6). Aucune mention n'est faite de la présence chez les insectes des mélanines soufrées - trichochromes et phaeomélanines - décrites chez les mammifères (PROTA et THOMSON , 1976).(Voir l'annexe 3).

2.1.3. Composés aromatiques et neurotransmission :

Les amines biogènes du système nerveux des vertébrés sont ausssi retrouvées en grande partie dans celui des insectes. Bien que jusqu'ici largement moins étudiées que les composés participant à la sclérotisation de la cuticule, leur rôles en tant que neurotransmetteurs, neurohormones et neuromodulateurs ont été activement recherchés (voir LAFON-CAZAL, 1978 ; EVANS, 1980). D'après leurs taux de synthèse dans les différentes parties du système nerveux central, les principaux candidats comme neurotransmetteurs semblent être, à côté de composés non aromatiques (Acétylcholine, GABA et même histidine), la dopamine, la tyramine, l'octopamine et la 5 hydroxytryptamine (*5). Les voies de synthèse de ces composés chez les insectes sont celles identifiées chez les Vertébrés, mais certains tronçons ne sont pas encore démontrés avec certitude (figure 7). Par ailleurs, de nombreuses voies de métabolisation de ces différentes substances lors de leur incorporation dans les cellules nerveuses ont été décrites (figure 8) ; ces conjugaisons, réversibles - stockage -, ou définitives - inactivation -, jouent de toute évidence un rôle régulateur de l'activité synaptique. Une revue de la localisation et

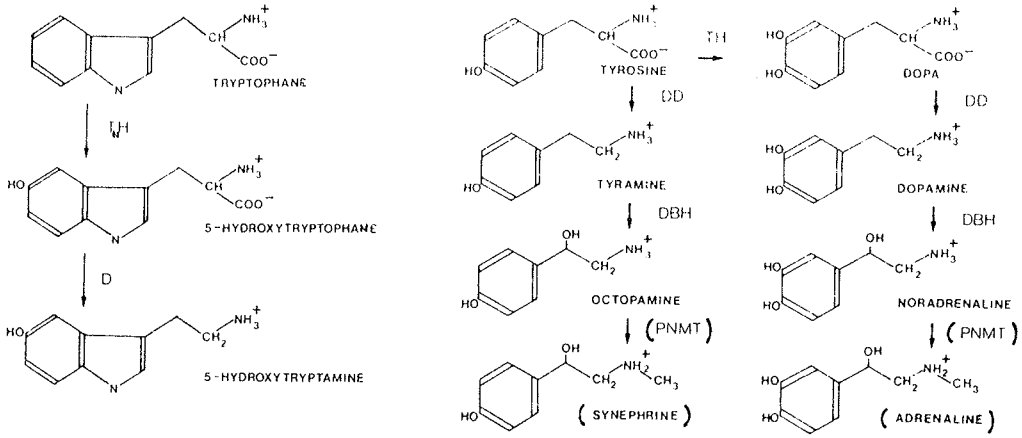


figure 7: Biosynthèse des phénolamines, des catécholamines et des indolalkylamines du système nerveux des insectes (d'après EVANS, 1980).

activités enzymatiques: TH= tyrosine 3 hydroxylase
DD= DOPA décarboxylase
DBH= dopamine béta hydroxylase
PNMT= phénolamine N méthyl transférase
T.H= tryptophane 5 hydroxylase

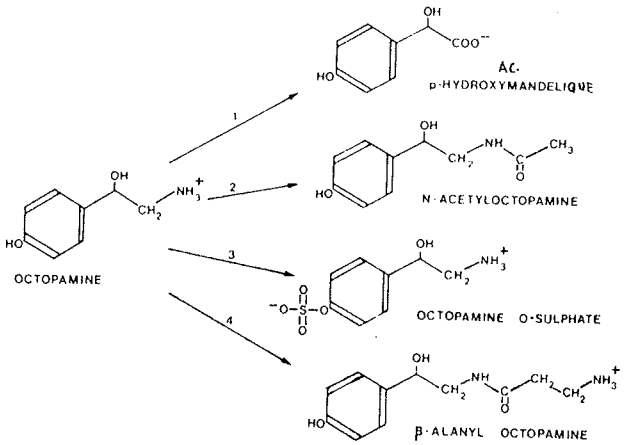


figure 8: Métabolisme des amines biogènes dans le système nerveux des insectes (d'après EVANS, 1980): exemple de l'octopamine

des foncions de toutes ces substances n'est pas le but de notre travail ; un court résumé s'en trouve simplement en annexe 1.

2.1.4. Quinones et stratégies de défense

De nombreux composés aromatiques plus ou moins oxydés et polymérisés ont été mis en évidence chez les insectes dans le cadre de substances jouant un rôle directement ou indirectement défensif : il s'agit soit de substances toxiques ou phago-répulsives, soit de substances vénimeuses ou urticantes. Citons pour exemples la p. Benzoquinone extraite de certains Coléoptères et des Blattes (*6 et 7), ou le cocktail de quinones de la sécrétion défensive de certains Coléoptères (*8). Les quinones sont souvent glyco-conjuguées, probablement à des fins de transport physiologique, pour augmenter leur solubilité aqueuse. Leur biosynthèse est peu connue, mais la tyrosine partage probablement son rôle de précurseur avec de nombreuses substances exogènes. L'encapsulation mélanique d'endoparasites ou de microorganismes dans l'hémolymphe rentre aussi dans ce cadre (ASHIDA et coll. 1982).

2.1.5. Composés aromatiques divers

Avant d'aborder la sclérotisation proprement dite, il faut signaler qu'à l'instar de ce qui se passe dans le système nerveux, différents conjugués d'acides aminés aromatiques ont été identifiés dans l'hémolymphe, le tégument, ou des glandes spécialisées de certains insectes. Il leur a été attribué des rôles allant du stockage à la protection et au transport de substrats phénoliques ou catécholiques des enzymes de la sclérotisation. Ils varient notablement selon les ordres ou les familles étudiés ; ce sont principalement:

- les peptides aromatiques observés chez les Diptères; ce sont des formes abondantes et spécifiques d'accumulation de la tyrosine. La synthèse débute après l'éclosion et cesse lors de l'utilisation massive du dipeptide, à la formation du puparium. L'exemple le plus "parfait" de cette forme d'accumulation reste la B alanyl-tyrosine des sarcophagidés (*9), qui libère à la fois la tyrosine et la B alanine qui sont incorporées dans la cuticule de la pupe (JACOBS, 1978). De structure très proche, la gamma glutamyl phénylalanine remplit les mêmes fonctions, mais presque exclusivement chez les muscidae (*10).

- les glucosides phénoliques : ce moyen de protection de l'hydroxyle phénolique ou catécholique (en 4-OH le plus souvent) a été découvert dans les glandes collétérales de nombreux dictyoptères (blattidae et mantidae), et prévient l'oxydation du substrat avant son excrétion dans la cavité où se forme l'oothèque. Cette solution est aussi adoptée dans des glandes séricigènes de Lépidoptères saturniidae (*11), et même dans certaines cuticules (* 12) ou hémolymphes (*13, *14). Le tableau 1 ci-dessous présente les différents aglycones liés au B glucose chez divers insectes ; les références reportent toujours à

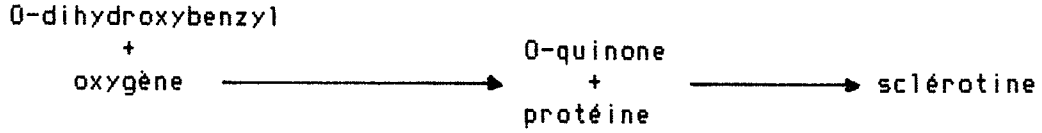
l'annexe 2.

PHENOL	FAMILLE	ORGANE	REF.
ACIDE PROTOCATECHUIQUE	BLATTIDAE	GL. COLLETERALE	*15
ACIDE DIHYDROXYBENZYLIQUE	BLABERIDAE	GL. COLLETERALE	*16
N-ACETYL DOPAMINE (§)	MANTIDAE	OOTHEQUE	*17
N-MALONYL DOPAMINE (§)	MANTIDAE	OOTHEQUE	*17
N(N-ACETYL B ALANYL) DOPAMINE (§)	MANTIDAE	OOTHEQUE	*18
N B-ALANYL DOPAMINE (§)	MANTIDAE	OOTHEQUE	*19
N(N-MALONYL B ALANYL) DOPAMINE (§)	MANTIDAE	OOTHEQUE	*19
ACIDE GENTISIQUE	SATURNIDAE	GL. SERICIGENE	*11
ACIDE 3-HYDROXYANTHRANILIQUE	SATURNIDAE	GL. SERICIGENE	*11
N-ACETYL DOPAMINE	DROSOPHILIDAE	CUTICULE	*12
N-B ALANYL DOPAMINE	SATURNIDAE	CUTICULE	*20
TYROSINE	DROSOPHILIDAE	HEMOLYMPHE	*13,*14

Tableau 1 : Différents aglycones de B glucosides aromatiques chez les insectes. (§) = 3-OH glucosides . v. annexe 5

- les esters : la tyrosine-O-phosphate semble jouer chez les Diptères drosophilidae le rôle des dipeptides aromatiques chez les muscidae et sarcophagidae (*21). La phosphorylation peut aussi avoir lieu sur des composés plus avancés dans la voie de la sclérotisation (N-acetyl dopamine 3 O-phosphate), de même que la sulfatation (dopamine et N-acetyl dopamine 3 O-sulfate) (*22). Cette conjugaison peut donc jouer un rôle régulateur dans le déclenchement de la sclérotisation, ce que semblerait confirmer la présence d'activités phosphatases et sulfatases dans la cuticule de certaines glandes épidermiques de la blatte (*23).

2.1.6. Tyrosine et sclérotisation : jusqu'aux années 50 environ, le durcissement de la cuticule était attribué à une forte chitinisation de celle-ci. Mais la présence de protéines dans les structures tégumentaires a conduit à un bouleversement de cette conception et à rechercher les mécanismes capables de conduire à la rigidificaion des protéines. A la suite de PRYOR (1940), de nombreux travaux ont accrédité la thèse du tannage quinonique des polypeptides, selon le schéma de base devenu classique :



L'extraction d'une myriade de quinones, d'acides et d'alcools catécholiques des cuticules d'insectes a encouragé l'approfondissement de cette voie. L'inventaire de ces composés, dont bon nombre sont

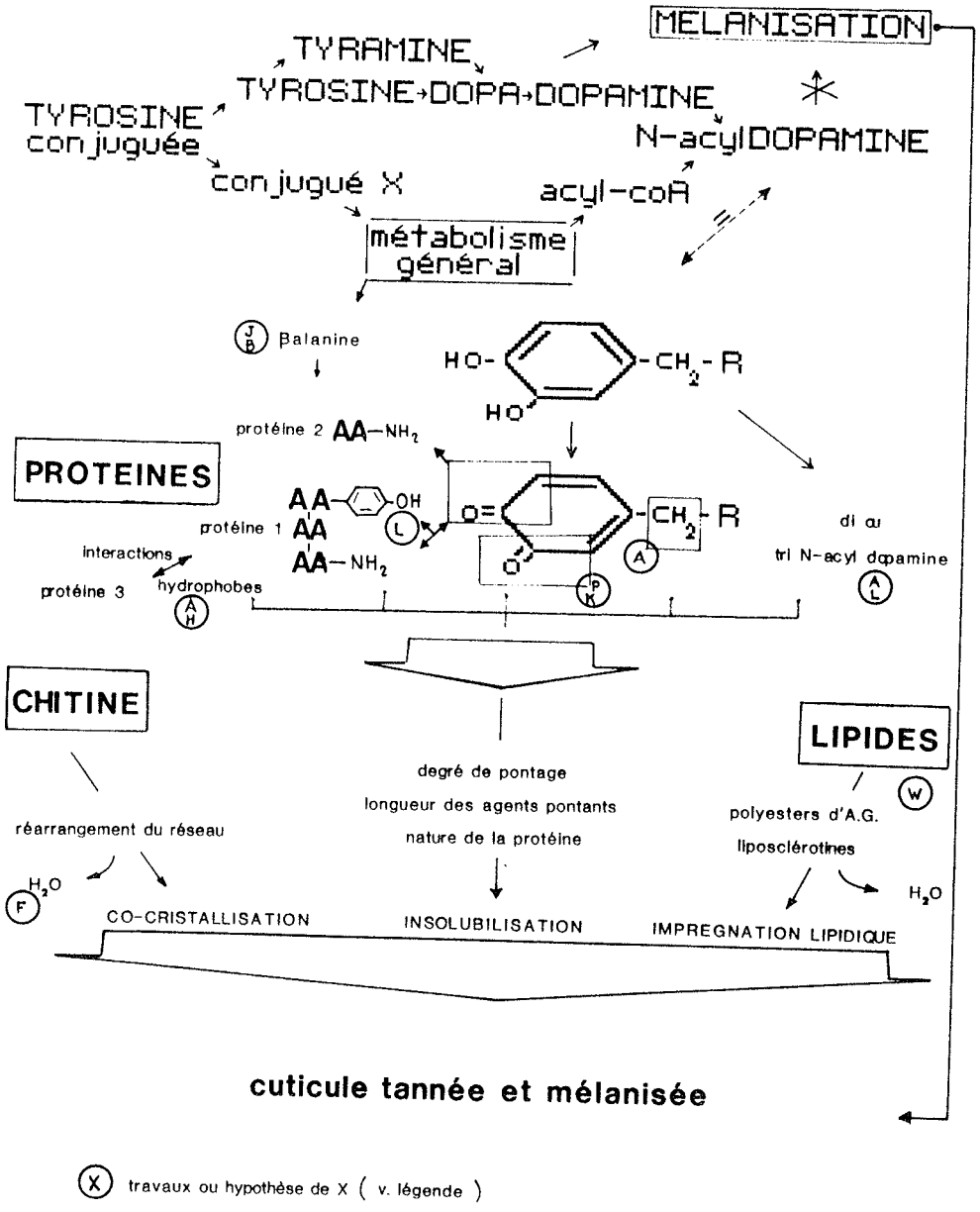


figure 9: Biochimie de la sclérotisation et du tannage des protéines cuticulaires des insectes (d'après BRUNET, 1980).

Abbréviations des noms d'auteurs dont les équipes ont travaillé sur le sujet

A: ANDERSEN	B: BODNARYK	F: FRAENKEL	H: HACKMAN
J: JACOBS	K: KARLSON	L: LIPKE	W: WIGGLESWORTH

probablement des artéfacts d'extraction, ne présente pas d'intérêt ici (voir à ce sujet la très complète revue de BRUNET, 1980).

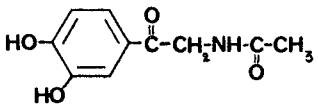
Mais une étape fondamentale a été franchie vers les années 60, avec l'isolement de la N-acétyl tyramine (BUTENANDT, 1959), mais surtout de la N-acétyl dopamine (KARLSON et SEKERIS, 1962). En effet, les premières étapes de cette voie ont alors été élucidées et la tyrosine s'est révélée être le précurseur métabolique des agents tannants. De plus, la sclérotisation s'est révélée biochimiquement séparée de la mélanisation (elles peuvent être dissociées expérimentalement : KARLSON et SCHLOSSBERGER - RAECKE, 1962), car les tyrosinases de cette dernière semblent inactives sur les composés N-substitués . Deux enzymes contrôlent les étapes clés de ce métabolisme : la dopa décarboxylase, formant la dopamine sous stimulus ecdystéroïdien (KARLSON et SEKERIS, 1962 b) ; la dopamine transacylase (acetylcoA ou autres donneurs d'acyls), encore mal identifiée mais qui devrait jouer un rôle régulateur non négligeable.

La suite des réactions reste encore mal connue car difficile à manipuler expérimentalement (réactions en phases hétérogènes, insolubilité des substrats ...). Cependant, on peut affirmer que la cuticule tannée n'est sûrement pas le résultat de réactions simples et uniques, mais plutôt le fruit de multiples intéractions, enzymatiques ou non, entre ses constituants essentiels ; les différents équilibres entre ces réactions pourraient rendre compte de la grande diversité des situations rencontrées. On peut néanmoins distinguer deux types de sclérotisation par la localisation du point de substitution (donc de polymérisation) sur le monomère N-acyl dopaminique:

-la sclérotisation "classique" avancée par l'équipe de KARLSON, d'après les connaissances sur le tannage des protéines; la substitution se fait sur un carbone du cycle aromatique; ce dernier se trouve alors lié directement ou indirectement à une protéine, vraissemblablement par les groupements nucléophiles de leurs résidus acides aminés (E NH2 de la lysine par exemple).

-La béta sclérotisation ferait par contre intervenir un carbone de la chaîne latérale (carbone en béta du noyau de la N-acétyl dopamine). L'argumentation pour l'existence de telles liaisons vient de la récupération de cétocatéchols divers, tels que la N-acétyl nor adrénalone (*24), après hydrolyse de la cuticule de certains insectes.

N-acétyl nor adrénalone



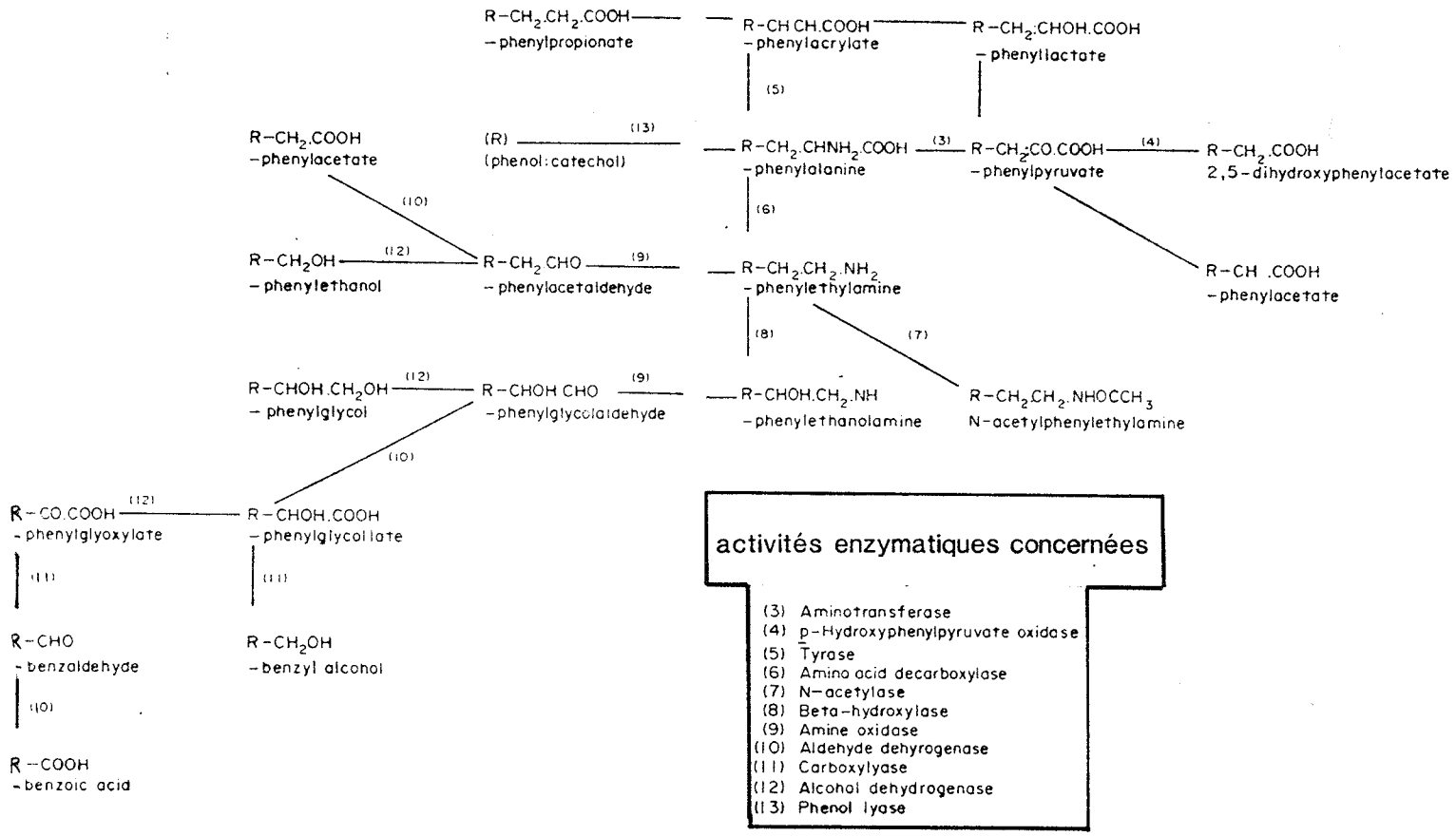


figure 10: Réactions de la chaîne latérale de la tyrosine identifiées chez les insectes. Enzymes mises en jeu (d'après BRUNET, 1980)

Cela est actuellement bien établi (ANDERSEN, 1979), mais semble limité de façon intéressante aux cuticules vraies d'insectes (absent chez les arachnides, crustacés, et même dans les oothèques de blattes - WELINDER et coll.; 1976).

A côté de la sclérotisation sensu stricto, des mécanismes variés interviennent dans le durcissement de la cuticule : citons pour exemples l'intervention des lipides (WIGGLESWORTH, 1970) et de la B alanine (JACOBS, 1978); les réarrangements des réseaux de chitine liés à une déshydratation prononcée (FRAENKEL et RUDALL, 1940), ainsi que les interactions protéine-protéine (HACKMAN, 1974). Une tentative de résumé de cet ensemble complexe d'interactions est exposée en figure 9.

2.2 METABOLISME GENERAL DES COMPOSES AROMATIQUES.

Toute la biochimie exposée jusqu'ici l'a été dans des cadres fonctionnels bien précis. C'est d'ailleurs la principale raison de leur étude. Il n'en reste pas moins qu'un métabolisme général et intermédiaire des acides aminés aromatiques existe aussi chez les insectes. Nous en décrivons rapidement les grands traits.

2.2.1 Métabolisme de la chaîne latérale:

Comme chez les mammifères et apparemment les autres animaux, la phénylalanine semble n'avoir pour devenir que l'incorporation en peptides et protéines, et la conversion en tyrosine ; quelques exceptions existent cependant, comme la synthèse d'une phéromone aromatique non phénolique, l'alcool phénethylique, chez un lépidoptère noctuidae (*25). La tyrosine, elle, peut être transformée en de nombreux dérivés phénoliques parfois présents en quantités non négligeables. Ils peuvent remplir des fonctions antibiotiques ou antioxydantes, ou bien représenter une forme d'excrétion du cycle aromatique. Les principales réactions affectant la chaîne sont des transaminations et des décarboxylations, mais aussi des N-acétylations, des B hydroxylations ou des échanges de chaîne latérale (BRUNET, 1980); elles sont représentées à la figure 10. Seules quelques enzymes ont été extensivement étudiées, dont la DOPA-décarboxylase localisée dans les hémocytes avant la mue, et assez récemment purifiée et caractérisée (FRAGOULIS et SEKERIS, 1975). Son activation par l'ecdysone semble aller de pair avec l'inactivation de l'activité aminotransférasique (KARLSON et SEKERIS, 1962), orientant alors le métabolisme de la tyrosine du catabolisme de la chaine latérale vers la voie de la sclérotisation. D'autres travaux assez ponctuels font état de propriétés particulières, telles que la rythmicité circadienne de l'activité tyrosine-aminotransférasique (*26), ou de la localisation dans les oenocytes de l'activité N-acylasique(*27).

2.2.2 Oxydations du cycle aromatique: Ayant déjà décrit les composés mis en jeu lors de la mélanisation et de la

p

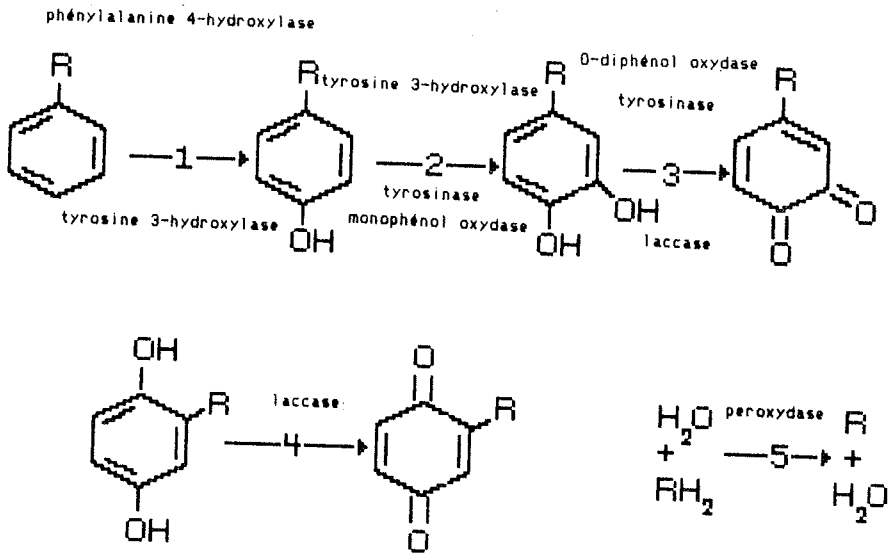


figure 11: Identification des différentes réactions d'oxydation du cycle aromatique, et action de plusieurs enzymes sur chaque étape (d'après BRUNET, 1980).voir aussi le tableau 2.

sclérotisation, nous nous bornerons ici à mettre un peu d'ordre dans les enzymes impliquées dans ces réactions. Que ce soit chez les vertébrés ou chez les invertébrés, cette enzymologie est assez complexe et les difficultés de nomenclature, liées à des purifications difficiles et des spécificités très variables, rend toute synthèse délicate. La figure 11 représente les principales réactions oxydant le noyau aromatique chez les insectes, et le tableau 2 tente de réunir les définitions et les propriétés des enzymes qui en sont responsables. Un des traits les plus marquants est l'absence d'identification d'une tyrosine 3-hydroxylase stricte chez les insectes, rendant la tyrosinase - qui est aussi une O-diphenol oxydase - responsable de l'oxydation de la tyrosine en DOPA dans l'hémolymphe ; la compétition tyrosinase / DOPAdécarboxylase pour l'utilisation de la DOPA pose donc un problème à priori.

Enzyme (activité)	nomenclature officielle	réaction (v. fig.11)	cofacteurs cosubstrats	présence chez les insectes	Réf.
phénylalanine 4-hydroxylase	E.C.1.14.3.1	(1)	ptérine + réductase	OUI(hémolymphe)	*28
tyrosine 3-hydroxylase	E.C.1.14.16.2	(2) et (1)	ptérine + réductase	NON(syst. nerveux?)	
monophénol oxydase	/	(2) ?	sans ptérine	?	
O-diphénol oxydase	E.C.1.10.3.1	(3)	ptérine	OUI(cuticule)	*29
tyrosinase	E.C.1.14.18.1	(2) et (3)	Cu++ et O-diphénol	(vertébrés)	
			Cu++ sans diphénol	(invertébrés) OUI	*29
laccase	E.C.1.14.18.1	(3) et (4)	Cu++(>tyrosinase)	OUI	*30
peroxydase	E.C.1.11.1.7	(5) , (3) ?	H2O2	OUI	*31

Tableau 2: caractérisation des enzymes responsables de l'oxydation du cycle aromatique chez les insectes (d'après BRUNET, 1980).

2.2.3. Catabolisme du noyau aromatique : il semble qu'aucun travail n'ait été effectué sur le catabolisme du cycle benzénique chez les insectes. Pour les mammifères, les voies de ce catabolisme ont été identifiées (annexe 6) et font intervenir une étape complexe et importante transformant le p hydroxyphenyl pyruvate (présent chez les insectes, voir fig. 10) en acide homogentisique. La connaissance de cette voie est pourtant l'indispensable préalable à tout bilan complet des acides aminés aromatiques. Certaines expériences, utilisant de la tyrosine marquée sur le carbone gamma , suggèrent cependant un faible taux d'un tel catabolisme chez la blatte adulte (HOPKINS et coll.; 1976). Dans une telle hypothèse, les formes circulantes des différents acides ou alcools phénoliques et catécholiques décrits précédemment pourraient bien être des formes d'excrétion du noyau aomatique. Il n'est cependant fait aucune mention

des composés 2,5 di-hydroxyphénoliques, remplissant ces fonctions chez les vertébrés.

En conclusion à cette revue de la biochimie de la tyrosine, on s'aperçoit que ce composé joue bien chez les insectes un rôle aussi important que dans le règne végétal et le reste du règne animal. Aux originalités développées par les insectes, on peut cependant opposer l'absence de certains métabolismes "évolués" (thyroxine et hormones thyroïdiennes des mammifères), ou spécialisés (synthèse d'alcaloïdes chez les végétaux : morphine, mescaline, codéïne...).

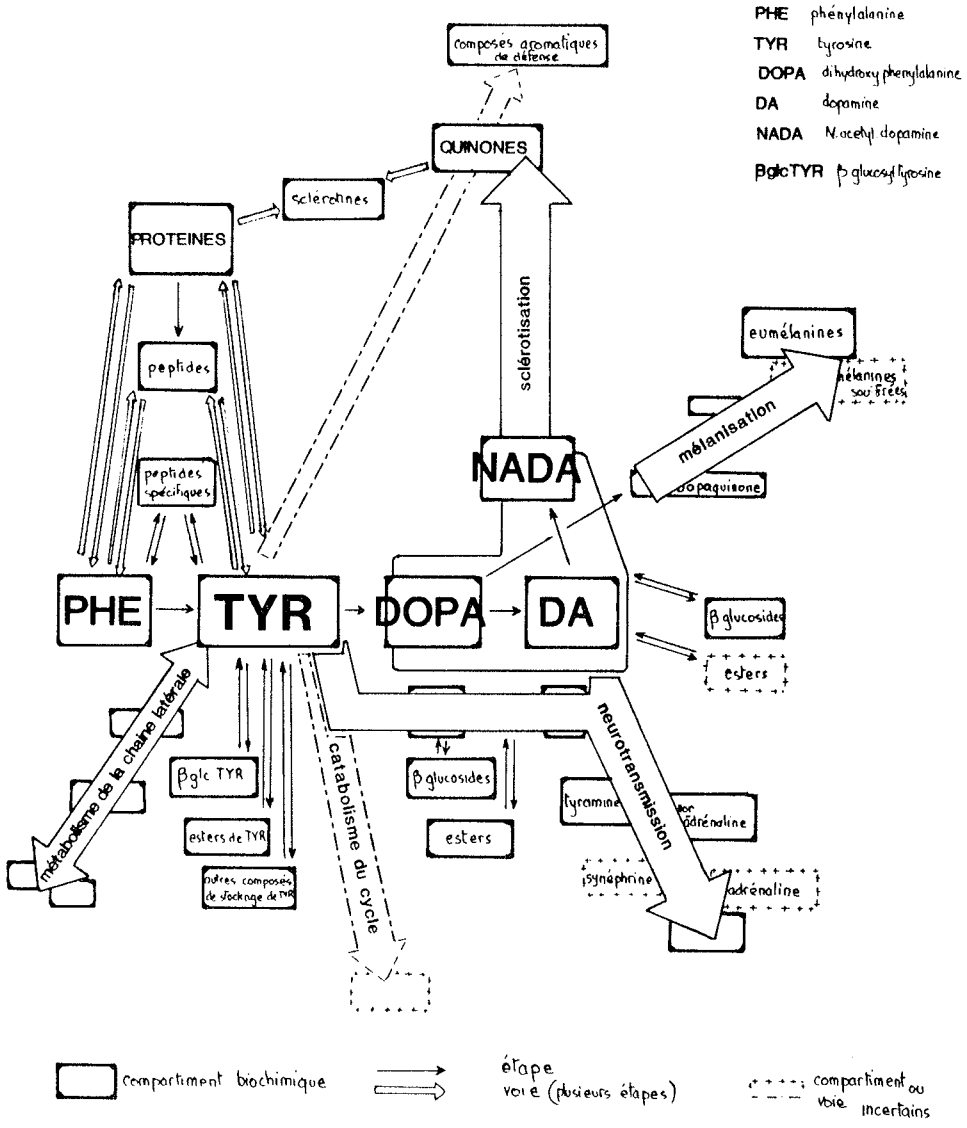


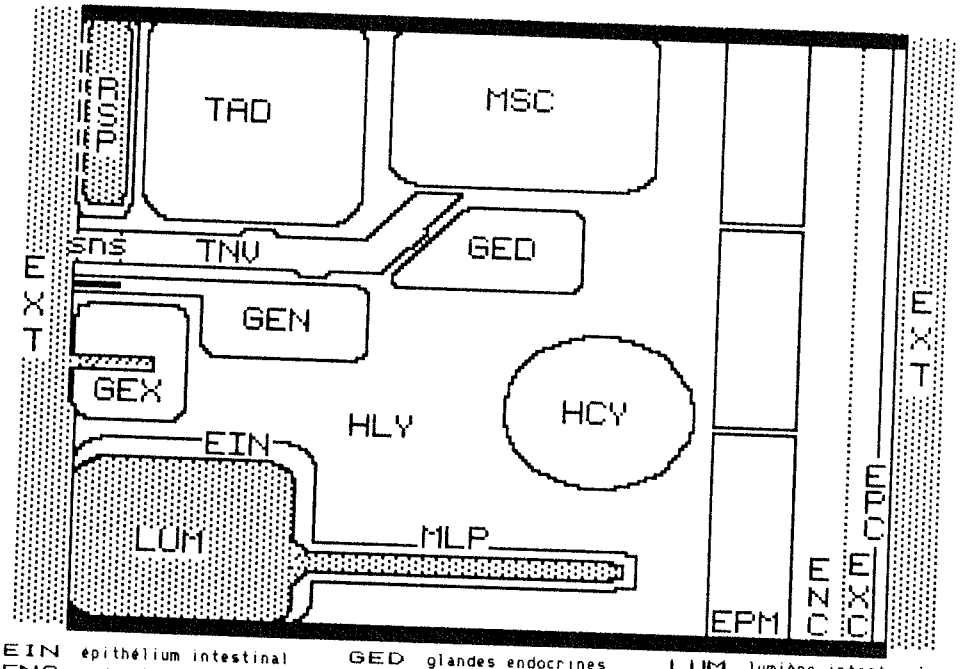
figure 12: Compartimentation biochimique de la tyrosine chez les insectes.

3. MODELE POUR LA PHYSIOLOGIE DU "SYSTEME TYROSINE" CHEZ LES INSECTES

Même parfaitement ordonné et synthétisé, le dépouillement des voies biochimiques ne constitue pas une fin en soi. Ce n'est que son intégration dans la physiologie générale de l'organisme étudié qui puisse objectivement satisfaire l'esprit. Or, malgré l'énorme accumulation de connaissances effectuées par les sciences physiologiques au cours de ces deux derniers siècles, nous sommes encore "loin du compte" dans la grande majorité des cas abordés. En effet, il suffit que les composés considérés soient un tant soit peu ubiquitaires (et c'est le cas le plus courant) pour que l'écheveau devienne vite inextricable. Et si la réalisation in vitro de formes de vie quelque peu évoluées paraît logiquement utopique, la modélisation complète du comportement de ces mêmes formes de vie n'en est pas moins tout aussi difficile.

Néanmoins, l'ampleur de la tâche ne doit pas nous faire oublier cet objectif conceptuel, et la construction de modèles, à divers niveaux d'intégration, procède d'une démarche raisonnable. Nous sommes bien conscients qu'ils ne pourraient souvent pas être fonctionnels (diagnostiques, prédictifs...) ; là encore, si les mathématiques et l'informatique ont accompli ces derniers temps des progrés considérables, la somme d'information et la complexité des intéractions font des modèles biologiques des objets bien délicats à manipuler sous l'angle cybernétique. Les besoins, notamment industriels, en ce domaine sont toutefois de précieux moteurs à l'avancement des recherches (ATLAN, 1984).

Le modèle que nous présentons ici voudrait simplement servir de cadre, où une recherche sur le sujet pourrait trouver sa position et identifier par là les interactions qui l'intéressent. La compartimentation se fait à différents niveaux, et c'est l'imbrication de toutes ses composantes qui rend compte de la complexité réelle. Deux types de compartimentation sont familières aux modélisateurs en biologie, car elles découlent de deux typologies courantes en physiologie (biochimie et histologie). Une troisième peut y être superposée en tenant compte des différentes phases ontogéniques suivies par l'insecte. Enfin, ce dernier véhicule des informations génétiques qui sont la base de la plus triviale des compartimentations : la systématique. La représentation schématique étant le meilleur moyen d'illustrer cette optique, nous avons réuni en trois figures les principaux traits de la compartimentation biochimique (résumé du chapitre A2, figure 12), spatiale (figure 13) et temporelle (figure 14) de la tyrosine chez les insectes.



EIN épithélium intestinal
ENC endocuticule
EPC épicuticule
EPM épiderme
EXC exocuticule
EXT milieu externe

GED glandes endocrines
GEN glandes génitales
GEX glandes exocrines
HCY hémocytes
HLY hémolymphe

LUM lumière intestinale
MLP tubes de MALPIGHI
MSC muscles
RSP appareil respiratoire
SNS système neurosensoriel
TAD tissu adipeux
TNV système nerveux

figure 13: Compartimentation spatiale (tissulaire) en physiologie générale de l'insecte.

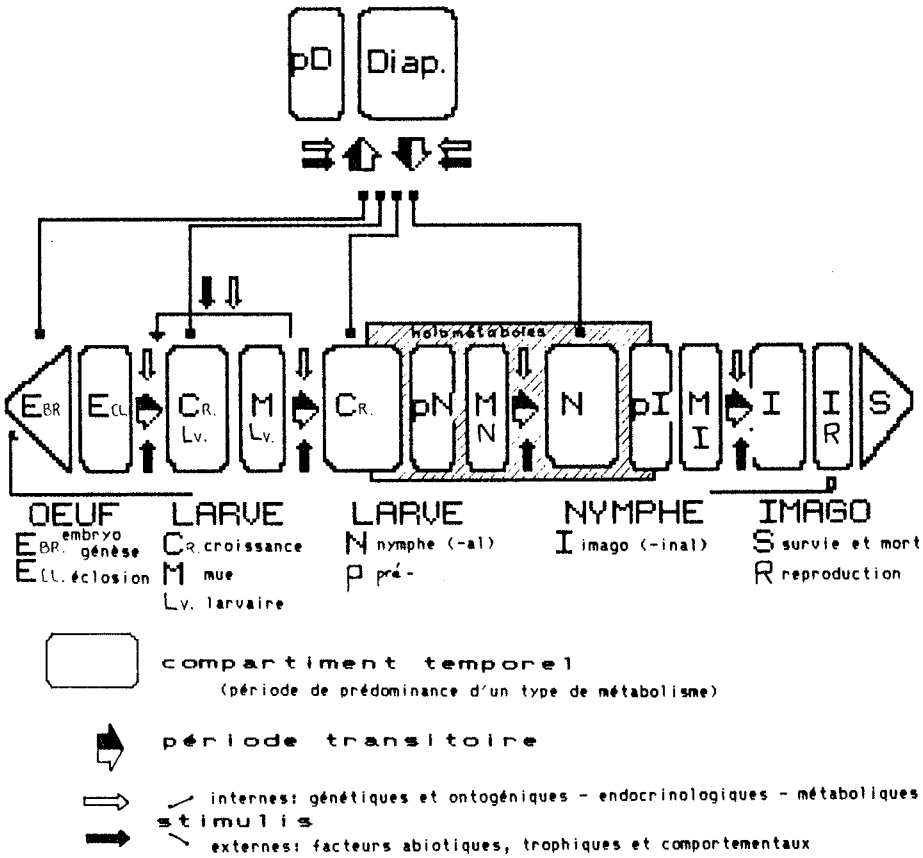


figure 14: Compartimentation temporelle (ontogénique) en physiologie générale de l'insecte.

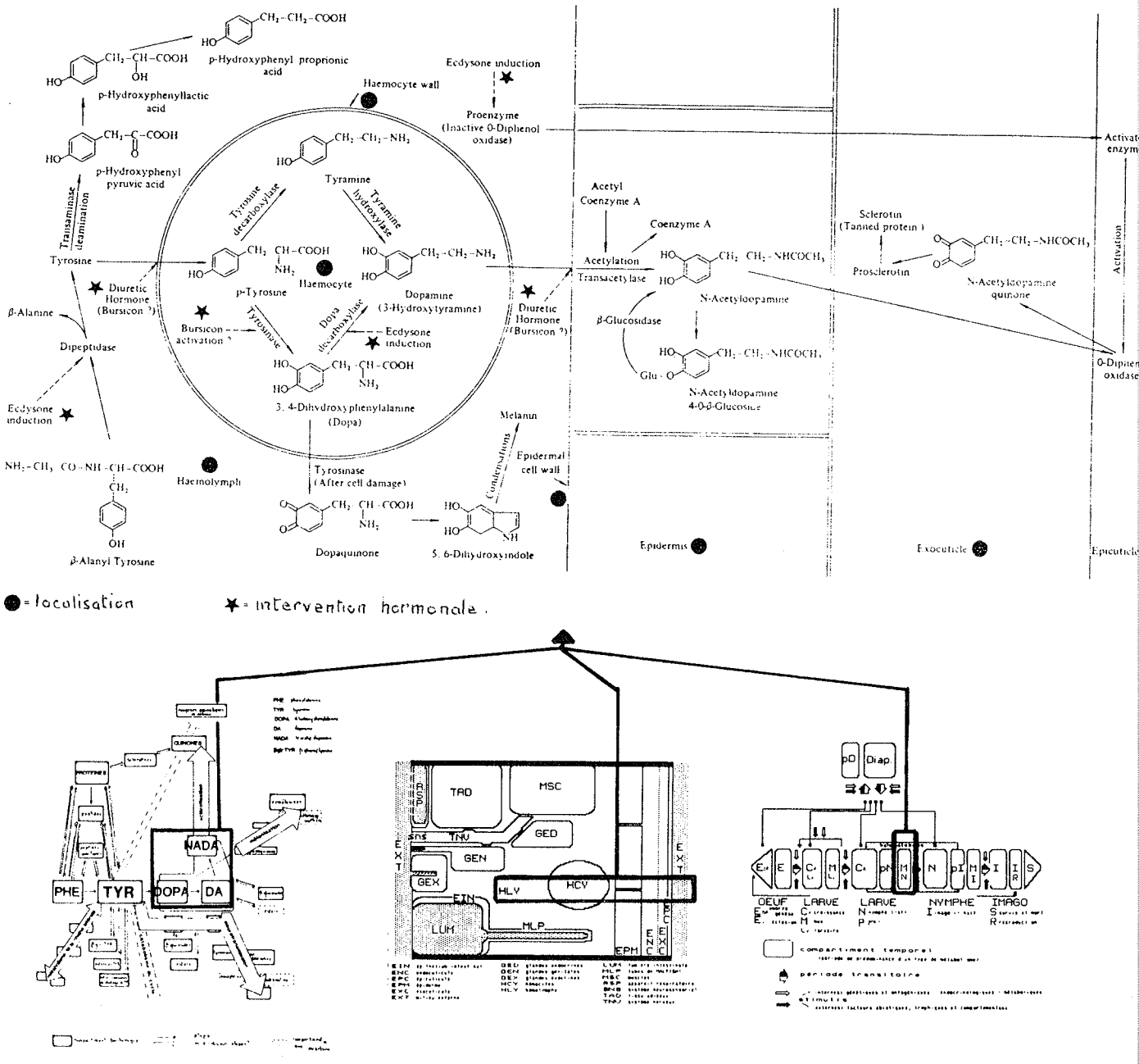


figure 15: Exemple d'intégration des différentes compartimentations impliquées dans les réactions de sclérotisation chez un insecte (schéma de NEVILLE, 1975).

Il est évidemment hors de question de vouloir actuellement aborder l'ensemble des interactions suggérées pour les trois compartimentations précédentes. On peut seulement essayer d'illustrer l'intérêt d'une telle approche globale par l'exemple d'une synthèse des recherches actuelles dans un sous-ensemble particulier de cette compartimentation : la figure 15 montre de façon claire et complète la localisation histologique et les régulations hormonales de toute la chaîne de la sclérotisation chez un Diptère sarcophagidae (d'après NEVILLE, 1975). Notre but, dans ce travail, voudrait être une modeste contribution à l'enrichissement de tels modèles.

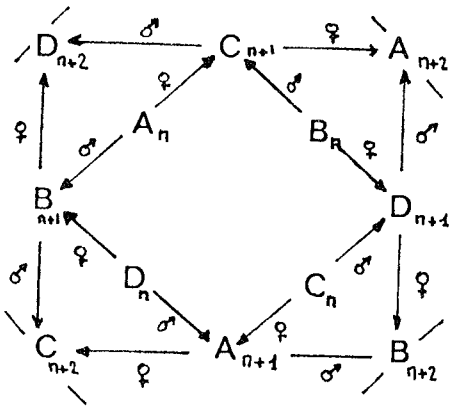


figure 16: Protocole de croisement de la "souche" de Spodoptera littoralis

B - MATERIEL ET METHODES

1 ELEVAGE ET DETERMINATION DES PARAMETRES BIOLOGIQUES DE S. LITTORALIS :

1.1. ELEVAGE :

La souche de Spodoptera littoralis (Boisduval.) que nous avons utilisée est d'origine égyptienne, et nous a aimablement été fournie par Mr BUES, de la Station de Zoologie INRA d'AVIGNON. Les larves ont été élevées sur le milieu artificiel de POITOUT et coll. (1972)*, et dans les conditions ayant permis l'élevage au laboratoire de nombreuses noctuelles (POITOUT et BUES, 1974).

L'élevage débute en petites logettes (1,0 X 1,0 cm) et les larves sont transférées vers le cinquième stade en logettes individuelles (2,0 X 3,0 cm) pour des raisons d'hygiène et de comportement ; la nymphose est réalisée pour les mêmes raisons sur tourbe stérilisée. Pour conserver une taille raisonnable (cent couples environ) sans faire apparaître de problèmes de consanguinité, l'élevage a été divisé en quatre "souches" et un protocole régulier de croisements a été adapté d'une génération sur l'autre (figure 16).

La température de 25 ± 1° C a été adoptée, avec une humidité relative de 70 à 80 % et une photopériode 12/12. Pour des besoins techniques ou de synchronisation, nous avons parfois et hors périodes expérimentales, fait varier la température de 22° C à 27° C (la gamme de températures admises pour l'élevage de S.littoralis va de 20° C à 35° C - SIDIBE, 1976). Nous avons en outre expérimenté un cycle d'élevage sans adjonction des antimicrobiens aromatiques - nipagine et acide benzoïque retirés de la composition -, pour déterminer l'éventuelle influence de ceux-ci sur les variables étudiées.

1.2. DETERMINATION DES PARAMETRES BIOLOGIQUES DE S. LITTORALIS

1.2.1. Expérience : Afin de déterminer les caractéristiques du développement et de la croissance de S.littoralis, 84 larves néonates ont été suivies individuellement sur un cycle dans nos conditions d'élevage. Vingt d'entres elles furent pesées tous les jours ainsi que juste après chaque mue, et certains caractères fins du comportement ont été observés, notamment au cours du dernier stade larvaire.

Les principaux résultats obtenus concernent :

* Pour la composition, se reporter au paragraphe 1.3 et à l'annexe 7

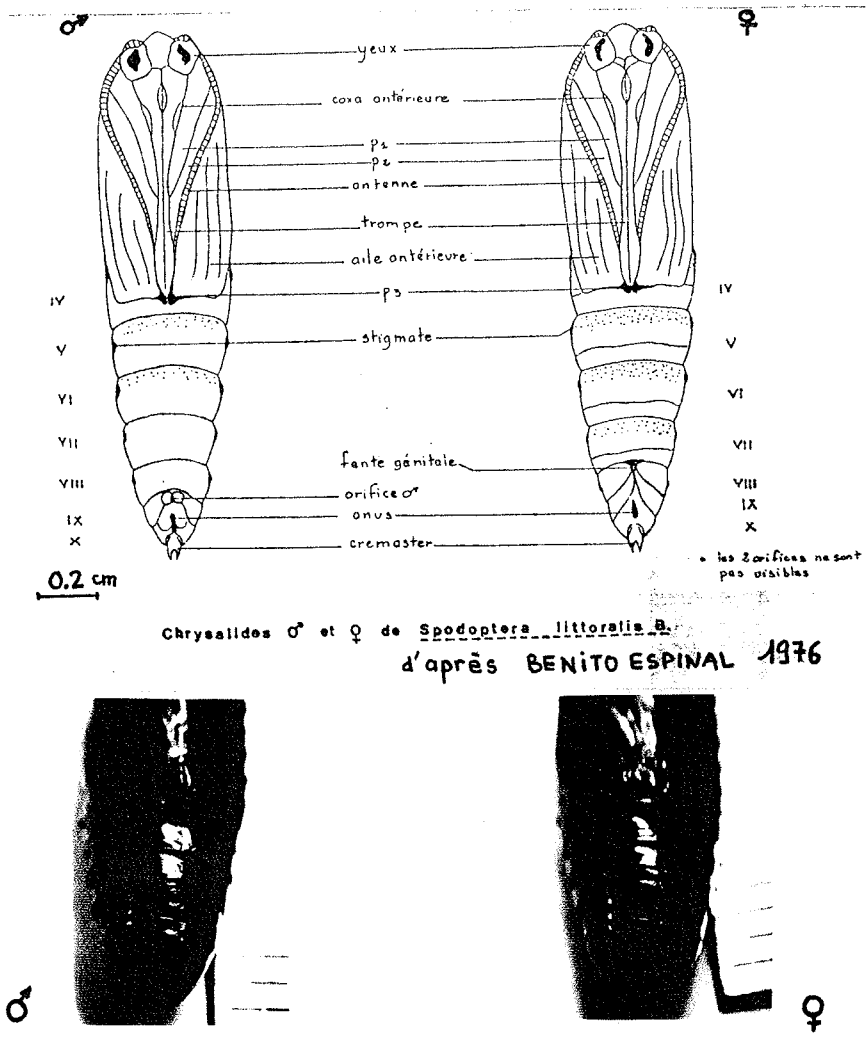


figure 17a: Morphologie externe des chrysalides mâles et femelles: sexage par examen des derniers segments abdominaux (face inférieure).

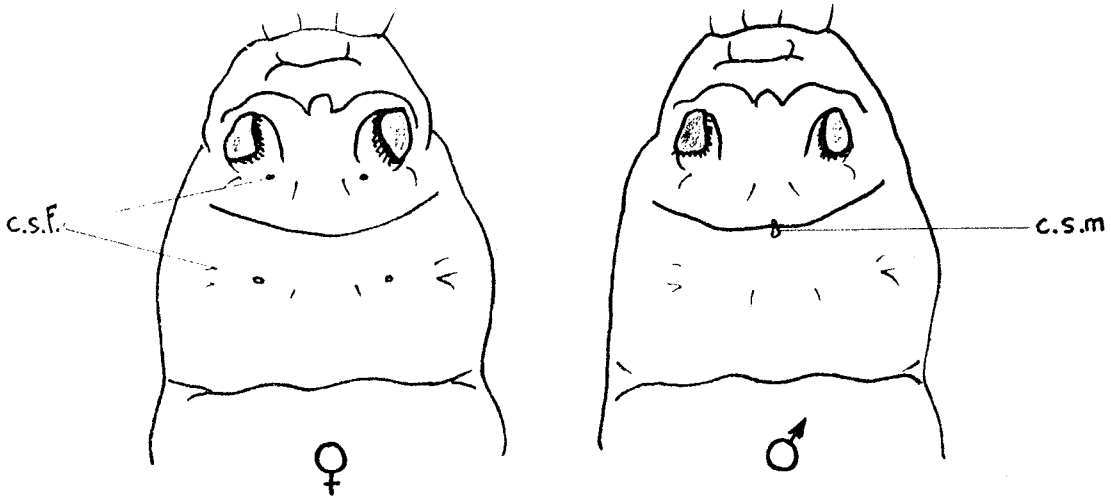


figure 17b: Morphologie externe de la face inférieure des derniers segments abdominaux de chenilles de dernier stade (HAINES, 1982)
c.s.m.(f.)= caractères sexuels mâles (femelles).

1.2.2. Développement et mortalité : tout au long du développement larvo-nymphal, les mues et mortalités individuelles ont été notées pour permettre l'obtention de données précises sur les moyennes et variances des durées de tous les stades. Aucune donnée quantitative n'a par contre été relevée sur la fécondité et la fertilité.

1.2.3. Capsules céphaliques : la détermination pratique des stades larvaires peut se faire à tout moment par mesure des capsules céphaliques. Les valeurs témoins ont été obtenues au cours de cette expérience sur des larves endormies au CO_2 : la largeur maximale des capsules est mesurée grâce à un micromètre oculaire (loupe binoculaire ZEISS).

1.2.4. Croissance : la courbe de poids témoin a été obtenue par pesées journalières des larves sur une microbalance (balance gamma analytique SETARAM). Les poids à la mue ont aussi été notés pour permettre des comparaisons lorsque les durées de développement sont différentes (voir 1.3.). D'autre part, les données de poids à la première et à la douzième génération ont été comparées pour déceler une éventuelle dérive de la souche.

1.2.5. Sexage : les chrysalides sont sexées sans grosse difficulté à l'oeil nu (figure 17 a). Chez les chenilles, le dimorphisme n'est à priori pas apparent. Nous avons cependant testé une méthode préconisée par HAINES (1982) pour les derniers stades (figure 17 b). Le travail est effectué à la loupe binoculaire. Si le résultat a été concluant (93 % de déterminations correctes), la délicatesse et le temps passé à cette détermination se sont avérés rédhibitoires à une utilisation courante. Comme les phénomènes étudiés ne semblent pas à priori liés au sexe (ISOBE et coll.; 1981), nous l'avons négligé dans la suite de notre travail.

1.3. DETERMINATION DES PARAMETRES NUTRITIONNELS :

La connaissance de certaines grandeurs nutritionnelles, telles que consommation brute ou digestibilité apparente de certains composants du milieu alimentaire, est apparue nécessaire pour valider certaines conclusions. Aussi est-ce une des raisons pour lesquelles nous avons entrepris quelques expériences de nutrition.

1.3.1. Expérience sur les gels conditionnés : son but est hors de notre sujet mais, certaines conclusions nous intéressant directement, nous avons jugé utile de reporter en annexe 7 sa description complète. On pourra aussi y trouver le détail de la composition du milieu artificiel que nous avons utilisé (milieu dit "agar").

1.3.2. Expérience sur l'assimilation des acides aminés : pour évaluer l'apport exogène vrai de tyrosine et de phénylalanine, la digestibilité apparente des acides aminés dans notre milieu a été estimée ((quantité ingérée - quantité dans les fécès) / quantité ingérée ; WALDBAUER, 1968). Dix larves ont été élevées individuellement pendant 24 h en conditions contrôlées : l'ingéré a été estimé par la méthode gravimétrique classique avec la correction relative au dessèchement (WALDBAUER ; 1968), et les fécès totales récoltées et congelées puis lyophylisées. L'analyse des acides aminés est ensuite réalisée sur les milieux et les fécès (voir 2.2.1.) et les bilans calculés. Cette expérience a été réalisée, pour comparaison, sur des larves en milieu de cinquième stade et en début de sixième et dernier stade.

1.4. RECOLTE D'HEMOLYMPHE DE CHENILLES DE LEPIDOPTERES :

L'hémolymphe de nombreuses espèces de Lépidoptères a été récoltée pour plusieurs types d'analyse dont nous parlerons plus loin. Nos besoins portaient sur de l'hémolymphe de chenilles de dernier stade larvaire, en fin d'alimentation. Nous nous les sommes procurées de différentes façons.

1.4.1. Elevage ou origine des chenilles : outre *S.littoralis*, nous avons élevé au laboratoire deux espèces, *Bombyx mori* et *Philosamia cynthia*, respectivement sur feuilles de murier et d'ailanthe, à la température ambiante. Pour les autres espèces, nous les avons soit récoltées dans la région Lyonnaise et le Jura, et amenées au dernier stade sur aliment naturel, soit obtenues grâce à différents laboratoires et nourries sur un milieu artificiel approprié. L'annexe 8 fournit la liste de ces Lépidoptères et leur origine.

1.4.2. Prélèvements d'hémolymphe : pour toutes les espèces traitées, l'hémolymphe a été prélevée par coupure d'une fausse patte abdominale (généralement de l'avant dernière paire). Les chenilles propres préalablement anesthésiées par le froid, sont tenues par la main gauche gantée (pour éviter de polluer le prélèvement). Une fois la fausse patte coupée, la goutte d'hémolymphe est rapidement pipetée (pipette automatique ou aspirateur artisanal, pour les volumes importants) ; elle est alors immédiatement placée au froid et en contact avec un tampon d'inhibition de la mélanisation : tampon phoshate 0,15 M, à pH 6,9 et saturé en phénylthiourée(5 mM, la PTU est dissoute à 50°C, puis le tampon filtré). Après une centrifugation de 15 mn, au froid, à 2000 g, le surnageant est séparé des hémocytes et éventuellement stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

2. COMPARTIMENT DE FAIBLE P.M. : ACIDES AMINES ET PEPTIDES

2.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS ; EXTRACTIONS ; STOCKAGE

2.1.1 Précipitation des protéines : pour les dosages individuels, sur larves entières comme sur hémolymphe, une méthode a été mise au point afin d'assurer une récupération maximale, un dosage précis des faibles quantités ainsi qu'un temps de préparation relativement bref : pools de larves (stades 1 à 4) ou larves individuelles (stades 5 ou 6) sont broyés in toto à 0° C en présence de TCA (5 % pds./vol. final, dans 1.5ml) et d'une quantité déterminée de standard interne (voir 2.2.2.). Trois extractions par deux volumes de chloroforme, suivies de centrifugation à 4° C (2000 g, 10 mn) permettent de débarasser la phase aqueuse de lipides, des protéines précipitées et d'une partie du TCA. L'extrait conservé à -20° C est amené à pH 6-7 par NaHCO3 en poudre préalablement à l'injection HPLC. La neutralisation est vérifiée au papier pH pour s'assurer une bonne reproductibilité des temps de rétention. Aux stades 5 et 6, l'hémolymphe des larves individuelles (10 à 150 µl) est traitée de façon analogue en volumes réduits (environ 500 µl finaux en tubes eppendorf).

2.1.2 Dialyse : pour les besoins préparatifs, les larves de dernier stade (50 à 100 individus) sont ébouillantées pendant 2 mn dans de l'eau distillée (pour les tuer et dénaturer les enzymes). Elles sont alors broyées (broyeur à couteaux ; inox ; 500 ml), puis grossièrement filtrées sur mousseline et l'extrait aqueux est dialysé 5 fois contre un litre d'eau ultra-pure sur un temps total de 14 heures et à 4°C(Tubes VISKING ; pouvoir de coupure de 10 - 12 KD). Le dialysat est ensuite amené à sec sur évaporateur rotatif de BUCHI, et stocké à -20° C jusqu'à utilisation.

2.1.3 Ultrafiltration : lorsque les besoins, analytiques ou semi-préparatifs, se portaient à la fois sur la fraction de faible P.M. et la fraction protéique, les échantillons ont été soumis à l'ultrafiltration en cellule AMICON de 10 ml, sur une membrane UM10 (coupure à 10 KD environ). Cette technique a également été utilisée pour débarasser la fraction protéique des substrats dialysables, lors d'essais d'enzymologie (voir 4.1.2.).

2.1.4 Filtration sur gel : lors des analyses d'hémolymphe des différents lépidoptères, la fraction de petit poids moléculaire est obtenue par filtration sur gel (voir 3.3.1), suivie d'une concentration et d'une précipitation des protéines au T.C.A. (voir 2.1.1)avant l'analyse H.P.L.C.

2.2 METHODES ANALYTIQUES :

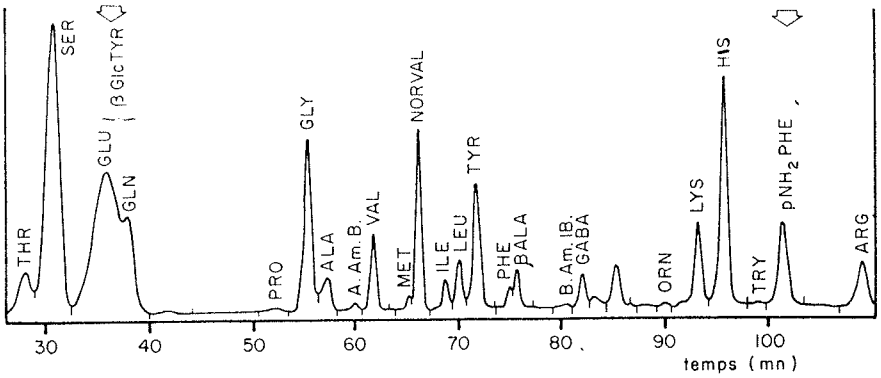


figure 18: Chromatogramme type d'échantillon biologique d'acides aminés (voir le texte pour les conditions): analyse de larve entière de S. littoralis au stade L6"c" -voir résultats-

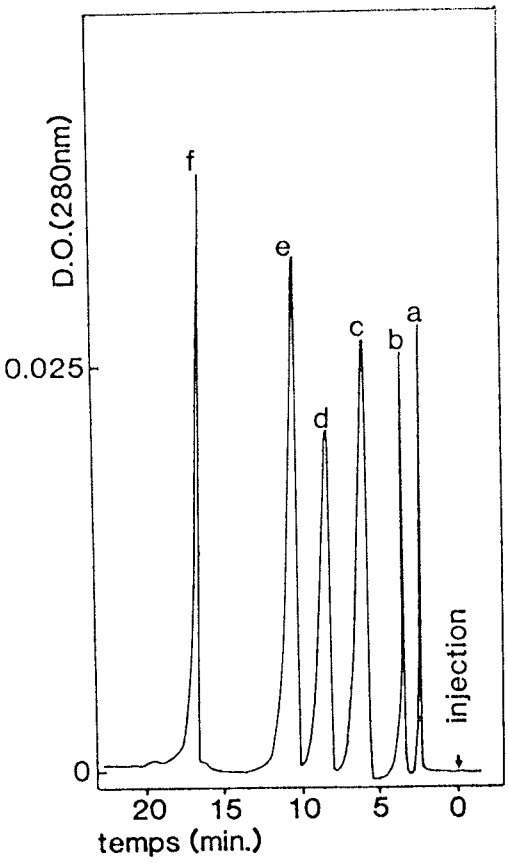


figure 19a: chromatogramme standard HPLC
a pOH phényl propionate
b pOH phényl acétate
c tryptophane d tyrosine
e pNH2 phénylalanine
f B glucosyl tyrosine

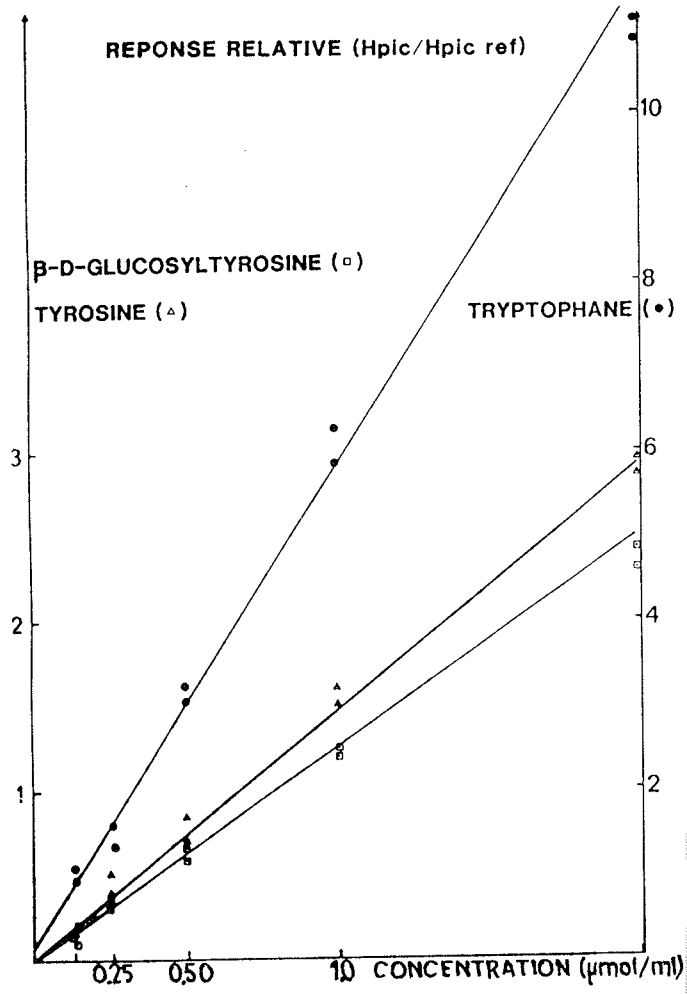


figure 19b: Vérification de la linéarité du dosa de trois acides aminés par HPLC (mes de la hauteur des pics).

2.2.1 Analyse automatique d'acides aminés : les analyses ont été effectuées directement sur extraits individuels (2.1.1) ou après hydrolyse acide; celle-ci est réalisée par HCl 6N, 24 h à 120°C, en présence d'acide thioglycolique à 0.1% et en ampoule scellée, à une pression inférieure à 25 µm de mercure. L'analyseur est un KONTRON LIQUIMAT III équipé d'une résine AS 70 (7 µm; 12% de réticulation). L'élution par 5 tampons Lithium se fait d'après une modification du programme "liquides biologiques" du constructeur (voir le détail en annexe 9). Le standard de référence est soit la Norvaline, soit la p-amino phénylalanine (voir 2.2.2). Un chromatogramme "type" est présenté en figure 18.

2.2.2 Chromatographie liquide sous haute pression:

-injection: 20 µl d'hémolymphe traitée (2.1.1)
-colonne : silice greffée NH2, 30 cm de longueur, 4.6 mm de diamètre, particules de 5 µm (MERCK Lichrosorb NH2).
-détection: absorption U.V. à 280 nm
-débit: 1.5 ml/mn.
-élution: A: NaH2PO4 0.01M ajusté à pH 4.3
B: acétonitrile-eau (500-70)
-temps 0: 97% de B dans A + B
-temps 1.5 à 8.5 mn.: gradient linéaire de 97% à 90% de B /A+B
-temps 8.5 à 18.5 mn.: " " de 90% à 50% "
- 18.5 mn.: 30% de B /A+B
- 23.5 mn.: régénération en 5 mn. jusqu'a 97% de B /A+B

La méthode est adaptée d'une séparation d'acides aminés par HPLC (SCHUSTER, 1980). Un chromatogramme standard est donné en figure 19a (séparation d'acides et acides aminés naturels; la pNH2 PHE est utilisée comme standard interne). Les caractères de linéarité du dosage total sur les hauteurs des pics apparaissent en figure 19b.

2.2.3 Pression osmotique; pH : quelques mesures ont été effectuées sur hémolymphe brute immédiatement après le prélèvement (4°C). L'osmomètre utilisé est un appareil digital FISKE OS à lecture directe. L'échantillon, d'environ 250 µl, est évidemment exempt de tout ajout, notamment en inhibiteurs de mélanisation. Le pH mètre utilisé est un RADIOMETER modèle 26.

2.3 METHODES PREPARATIVES :

2.3.1 Chromatographie d'échange d'ions

-colonne : polystyrène greffé acide sulfonique, échangeuse de cations, forme H+ ; 25 cm de longueur, 12 mm de diamètre ; 50-100 mesh (DOWEX 50W-X4).

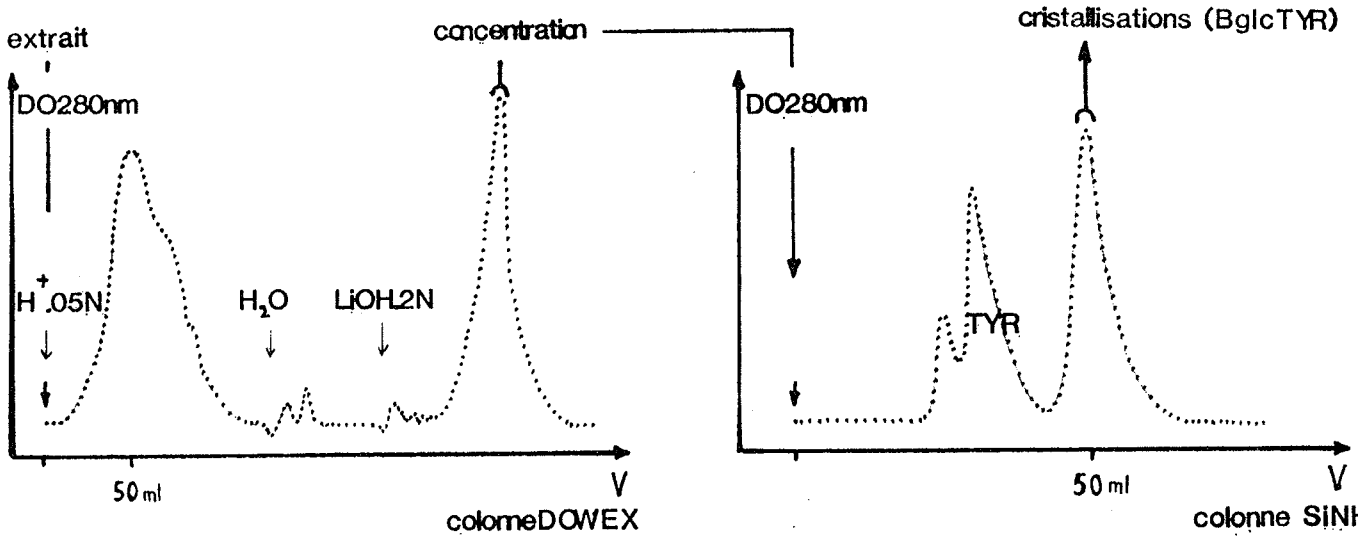


figure 20: Etapes de la purification du glucoside de tyrosine à partir d'extraits de larves de dernier stade: chromatogrammes des deux passages sur colonnes réalisés.

-détection: absorption U.V à 280 nm
-débit : 2 ml/mn
-élution : lavage par 50 ml d'HCl 0.2 N
équilibrage par 50 ml d'HCl 0.05 N
dépôt de l'échantillon (10 à 30 ml)
-0-45 min : HCl 0.05 N
-45-90 min : rinçage eau distillée
-90-120 min : LiOH 0.2 N

La dernière fraction est recueillie et neutralisée par l'HCl concentré. Elle est ensuite concentrée, grossièrement dessalée par passage sur Sephadex G15 et reconcentrée avant la chromatographie suivante.

2.3.2 Chromatographie sur Si-NH2 préparative : c'est la transposition, à l'échelle préparative, des conditions employées en HPLC.

-colonne : Silice greffée NH2 ; 30 cm de longueur, 10 mm de diamètre, 25 à 40 µm de diamètre des particules (MERCK, LICHROSORB NH2)
-détection: absorption U.V à 280 nm
-débit : 1 ml/mn
-élution : gradient linéaire, passant en une heure de la solution B à un mélange à 50 % de A et de B (voir 2.2.2).

La figure 20 résume le protocole d'extraction préparative du glucoside de la tyrosine.

2.4 IDENTIFICATION DES COMPOSES :

Différentes molécules, présentes dans les diverses fractions obtenues précédemment, ont été identifiées ou partiellement caractérisées. Les critères utilisés sont physiques (point de fusion, couleur), physicochimiques (caractères de solubilité) et spectroscopiques.

2.4.1 Cristallisations : le glucoside de tyrosine a été cristallisé deux fois dans un mélange eau - alcool. L'acide urique a été recueilli sous forme de cristaux spontanés à partir de fractions acidifiées de la chromatographie d'échange d'ions.

2.4.2 Synthèse de Bglc-TYR : afin de posséder les données physicochimiques de référence, la B-D-Glucopyranosyl O-L-tyrosine a été synthétisée selon la méthode utilisée par notre laboratoire (DELOBEL et coll., à paraître). L'annexe 10 décrit cette synthèse.

2.4.3 Cochromatographie : des critères supplémentaires

d'identification sont fournis par la cochromatographie du "pic" ou de la "tache" inconnue avec un produit de référence, et cela dans plusieurs systèmes chromatographiques (couches minces avec différents solvants, HPLC, autoanalyseur - pour les produits aminés -).

2.4.4 Propriétés spectroscopiques : les spectres U.V. - visible des composés en solution aqueuse ont été effectués sur un SAFAS 2000 à double faisceau, et les spectres I.R. des composés cristallisés réalisés en pastilles de KBr sur un spectrophotomètre I.R. SAFAS utilisé en mono faisceau.

3. COMPARTIMENT DE HAUT P.M. : LES PROTEINES

3.1 PREPARATION ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS

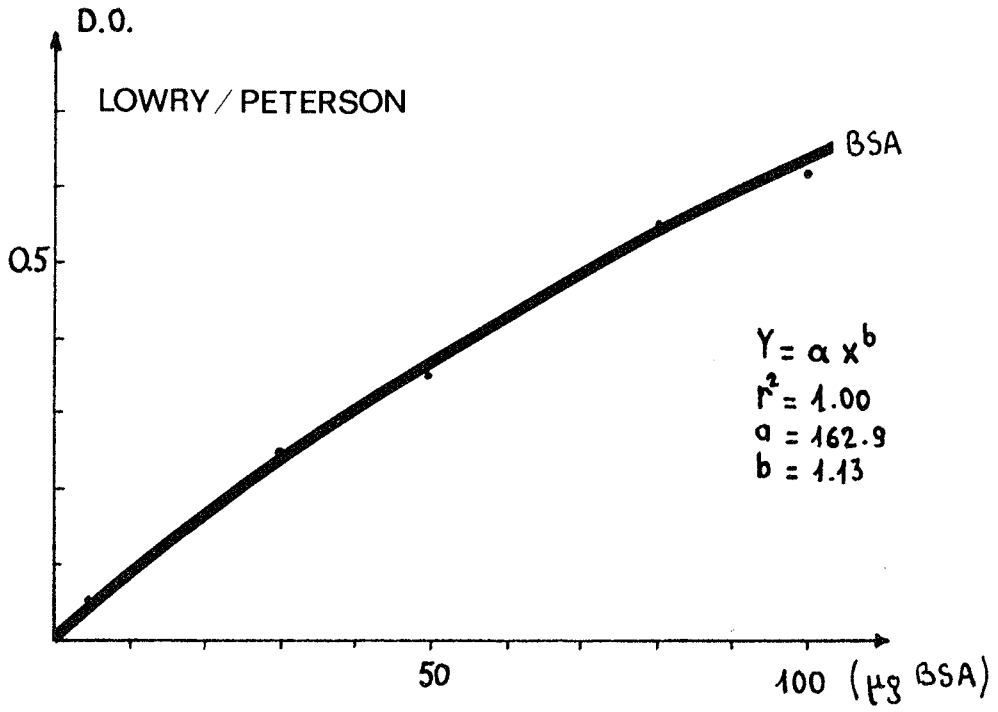
Pour les purifications de protéines hémolymphatiques, l'hémolymphe propre non mélanisée (1.4.2) est utilisée directement. Pour les dosages de protéines sur prélèvements individuels, la P.T.U. est soit omise, soit présente à une concentration finale n'interférant pas avec le dosage des protéines (100 µM).

Le tissu adipeux, après dissection dans le tampon phosphate 0,15 M (1.4.2), est homogénéisé au potter dans ce même tampon, puis centrifugé à 2000 g pendant 30 mn. La fraction aqueuse non lipidique est prélevée et précipitée par du sulfate d'ammonium (90 %). Après une autre centrifugation dans les mêmes conditions, le surnageant est jeté et le précipité repris et dialysé (une nuit à 4° C) contre le même tampon phosphate, mais exempt de P.T.U.. Pour toutes les manipulations préparatives de protéines, les concentrations et la conservation sur des périodes de plus de 48 h se font par dialyse contre de l'eau ou un tampon, lyophilisation et stockage à - 20° C.

3.2 DOSAGES ; SPECTROPHOTOMETRIE

3.2.1 Méthode de LOWRY-PETERSON : cette méthode est décrite en détails en annexe 11 (PETERSON, 1977). Elle a été utilisée soit complètement, c'est-à-dire avec l'étape de précipitation des protéines, soit simplifiée pour des dosages plus routiniers et en absence de substances interférentes (voir 3.2.2). L'interférence légère de la P.T.U. peut être négligée dans nos gammes de dosage si sa concentration finale n'excède pas 100 ou même 500 µM (1/10° de la saturation).

3.2.2 Méthode de BRADFORD : cette méthode (BRADFORD, 1976), plus simple, s'est révélée parfois plus adéquate car moins sensible que la précédente à la présence de substances phénoliques



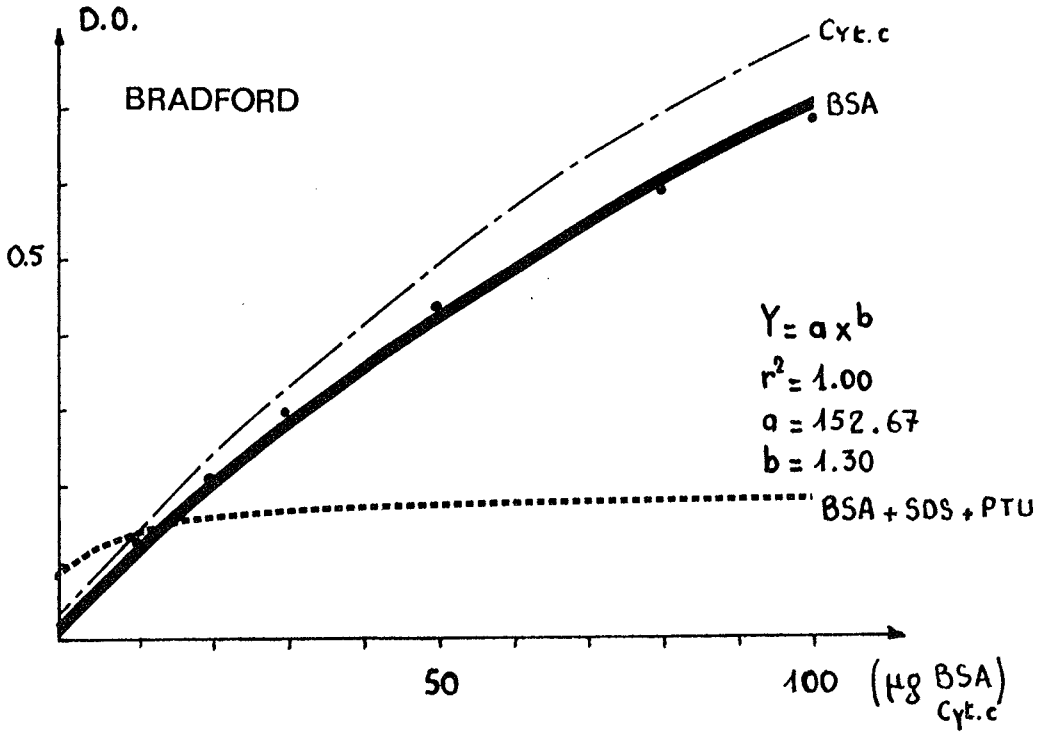


figure 21: Courbes d'étalonnage des dosages de protéines utilisés
en haut: dosage de LOWRY-PETERSON (sur sérumalbumine bovine)
en bas: dosage de BRADFORD
- sur sérumalbumine seule
- sur cytochrome C
- sur sérumalbumine en présence de PTU et de SDS

interférentes (voir résultats : C.3.1.2.1). Sa mise en oeuvre est présentée en annexe 12. Un minimum de précautions est cependant nécessaire : en effet, la présence de phénylthiourée déplace le spectre d'absorptioon du bleu de coomassie (coloration plus verte du complexe Bleu de coomassie/protéine), et l'adjonction de SDS peut entraîner des interférences (adsorption non compétitive) interdisant l'emploi de ce dosage dans certaines conditions (en présence de tampons d'électrophorèse ; 3.4.1 et 3.4.2).

Par ailleurs, et comme pour la méthode de LOWRY, des différences de réponse non négligeables sont obtenues avec des protéines standards différentes. Nous avons utilisé la Serum albumine bovine Sigma fraction V dans toutes nos gammes étalon. Signalons à ce sujet que les courbes étalon des deux méthodes employées s'accordent mieux à des ajustements "puissance" que linéaires (droites en coordonnées LOG/LOG). C'est donc cet ajustement qui a été préféré pour l'estimation de nos concentrations en protéines ; l'estimation graphique est même supprimée par l'utilisation d'une calculatrice programmable (HP 41, module statistique ; programme d'ajustement "puissance"). La figure 21 résume les différentes remarques qui viennent d'être effectuées.

3.2.3 Densitométrie sur plaques d'électrophorèse :

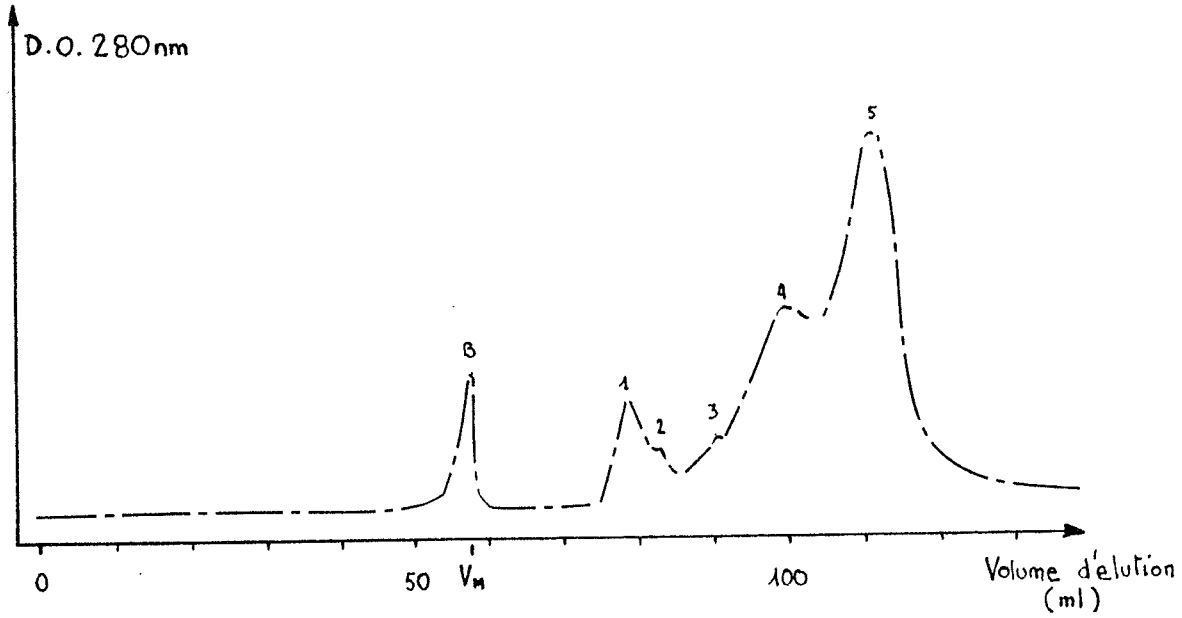
L'analyse quantitative des résultats des électrophorèse en gels d'acrylamide a été effectuée par balayage monodimensionnel des bandes électrophorétiques d'un puits après la coloration au bleu de Coomassie. L'appareil utilisé est un photomètre enregistreur intégrateur VERNON, modèle PHI 6, muni d'un filtre rouge 23A pour améliorer le contraste du bleu. Les résultats sont exprimés en mg de protéines par pic ou groupe de pic par répartition, proportionnelle à la surface, de la quantité totale connue de protéines par puits. Ces résultats sont donc assortis des mêmes limitations que précédemment (voir résultats : C 3.1.2).

3.2.4 Spectrophotométrie visible : les spectres dans le visible de certaines protéines en solution aqueuse ont été enregistrés comme en 2.4.4. Il en est de même pour le spectre dans le dioxanne de pigments liés à des protéines de l'hémolymphe.

3.3 CHROMATOGRAPHIES

3.3.1 Chromatographie de perméation sur gel :

dépôt : 500 à 2000 µl d'hémolymphe (voir 1.4.2)
colonne : agarose larges pores ; 100 cm de longueur, 18 mm de diamètre ; particules de 40 à 140 µm (IBF, Ultrogel A6)
détection : absorption U.V à 280 nm
débit : 10 à 12 ml/heure
élution : tampon phosphate 0.01 M pH 6.8 ; NaCl 0.2 M;



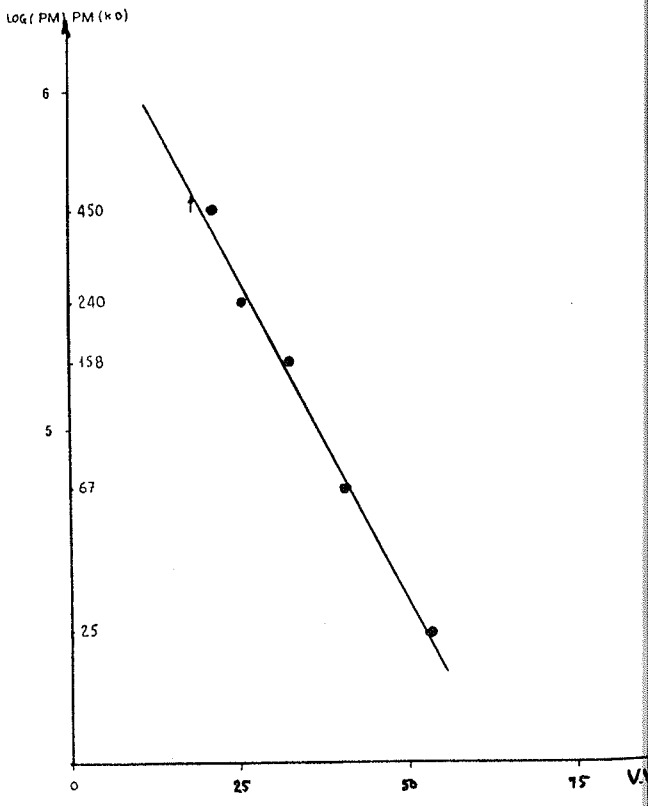


figure 21 bis: Détermination des poids moléculaires de protéines natives par perméation sur gel (ULTROGEL A6).

en haut: chromatogramme de protéines étalons (Ferritine; Catalase; Aldolase Sérumalbumine bovine; Chymotrypsinogène)
ci-contre: ajustement semi-LOG des poids moléculaires aux volumes d'élution

NaN3 0.02 %.

La figure 21 bis montre un chromatogramme de protéines standards et l'ajustement des poids moléculaires aux volumes d'élution.

3.3.2 Chromatographie sur hydroxyapatite :

dépôt : fraction brute de sortie de colonne précédente, ou protéine lyophylisée dissoute dans NaCl 0.15 M.
colonne : hydroxylapatite immobilisée sur agarose ; 25 cm de longueur, 12 mm de diamètre ; particules de 60 à 180 µm (IBF, Ultrogel HA)
détection : absorption U.V à 280 nm
débit : 1,5 ml/mn
élution : gradient de molarité de tampon phosphate pH 6.8 : équilibrage par 50 ml de tampon 5mM ; 50 ml de tampon 200 mM ; gradient linéaire passant en 40 mn de 200 à 500 mM ; rinçage par 30 ml de 500 mM.

3.3.3 HPLC :

dépôt : 20 µl d'hémolymphe traitée (selon 1.4.2)
colonne : Silice greffée neutre pour perméation des protéines ; 7.8 mm de diamètre (WATERS, Protein Pak 125 et SW 300)
débit : 0.8 ml/mn
élution : tampon phosphate 0.05 M, pH 7.0

3.4 ELECTROPHORESES :

Toutes les électrophorèses ont été réalisées sur gels en plaques de 150 x 180 x 1,5 mm, dans un appareil à électrophorèse verticale LKB 2001 muni d'une réfrigération, maintenue à 18° C environ.

3.4.1 Electrophorèses sur gradient d'acrylamide avec SDS : la plupart de nos électrophorèses ont été réalisées selon cette technique (d'après LAEMMLI, 1970), permettant une séparation correcte de protéines dans une large gamme de poids moléculaires. Le détail des opérations est résumé en annexe 13. Les protéines utilisées comme marqueurs de poids moléculaire sont celles des mélanges BIORAD pour electrophorèses en présence de SDS :

MYOSINE (200 kD), B GALACTOSIDASE (116 kD), PHOSPHORYLASE B (92.4 kD), SERUM ALBUMINE bovine (66 kD), ANHYDRASE CARBONIQUE (31 kD), INHIBITEUR TRYPSIQUE de soja (21 kD), LYSOZYME (14.4 kD).

Sur la gamme des faibles poids moléculaires (jusqu'à 80 kD), la migration dans notre système est bien sensiblement proportionnelle au poids moléculaire. Mais les déterminations sur une large gamme font apparaître une meilleure correlation à un ajustement exponentiel (PM = a exp (b x d migration)). La figure 22 le montre bien et donne la

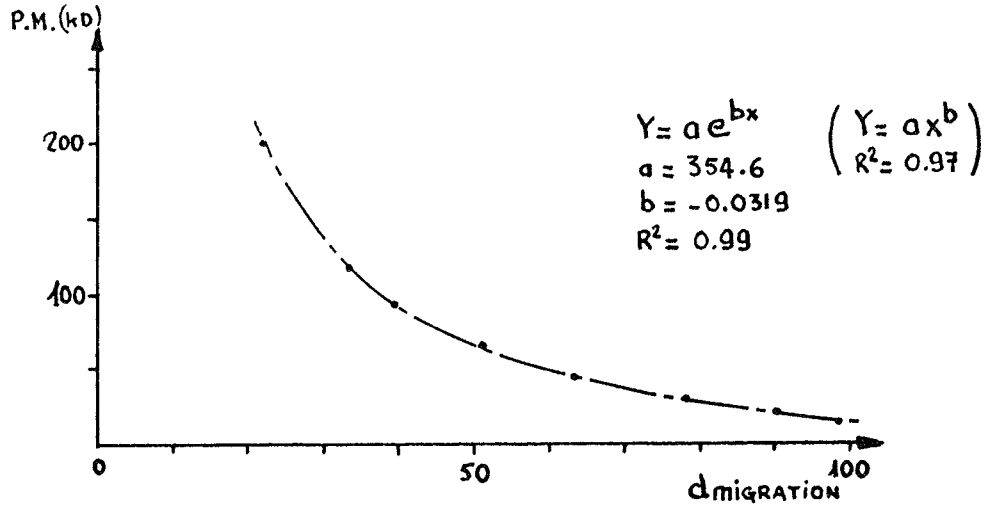


figure 22: Détermination des poids moléculaires des monomères protéiques par SDS PAGGE : ajustement exponentiel du Poids Moléculaire à la distance de migration (se référer au texte pour les conditions de l'électrophorèse et les témoins de migration utilisés).

relation utilisée pour l'estimation des poids moléculaires de protéines très différentes sur un même gel (voir résultats, C 3.2.1). Cela pourrait s'expliquer soit par une migration incomplète, soit par un gradient non exactement linéaire (artéfact d'agitation, de polymérisation...).

3.4.2 Electrophorèse sur gradient d'acrylamide sans SDS: l'adjonction de SDS rendant impossible l'observation des protéines natives oligomériques, nous avons utilisé une méthode permettant une estimation des P.M. en absence de SDS (LAMBIN et FINE ;1979). Le gel est préparé comme en 3.3.1 avec remplacement du SDS par du glycérol (aussi à 10%), et de la solution à 15% d'acrylamide par une solution à 10% (gradient 5-10%). L'échantillon de standards ou de protéine purifiée est mis à migrer pendant des temps différents (de 1h à 8h), à courant constant de 20 mA (150 V au départ). Après coloration des bandes, on peut figurer sur un graphe la racine carrée du temps de migration en fonction de la distance de migration pour chaque protéine. Les droites obtenues font correspondre une pente à chaque protéine. L'ajustement linéaire, en coordonnées semi-Logarithmiques, de cette pente aux poids moléculaires des protéines natives permet d'estimer correctement ces derniers pour des protéines inconnues. Les protéines "marqueurs" sont ici :

FERRITINE (450 kD), CATALASE (240 kD), ALDOLASE (158 kD), SERUMALBUMINE BOVINE (68 kD), OVALBUMINE (45 kD), CHYMOTRYPSINOGENE (25 kD); (Boehringer MANNHEIM).

3.4.3 Electrophorèse sur gel d'acrylamide sans gradient, en présence de SDS: La composition du gel et le protocole sont aussi fournis en annexe 13. Ces électrophorèses ont été réalisées pour affiner la séparation dans une gamme donnée, ainsi que pour estimer différemment les P.M. des protéines purifiées. Le meilleur ajustement est ici aussi exponentiel, exprimé classiquement par la relation LOG(P.M) = axRf + b, où Rf est le rapport de la distance de migration de la bande à celle du front matérialisé par le bleu de bromophénol.

3.5 ELECTROFOCALISATIONS :

3.5.1 Sans urée: Des gels d'acrylamide en couches minces ont été utilisés (Ampholines 3.5-9.5 PAG plates, LKB). Les plaques prêtes à l'emploi sont étendues sur la sole réfrigérante (4°C) de l'appareil à électrophorèse horizontale LKB MULTIPHOR. Après préfocalisation, 50 à 100 µg de protéines purifiées sont déposés et le générateur mis en route pour 90 minutes à la puissance constante de 30 W (1500 V pour 50 mA en début de focalisation . Les échantillons sont encadrés par des protéines témoins (BIORAD) pour la détermination des p.I. :

AMYLOGLUCOSIDASE (p.I.=3.5), INHIBITEUR TRYPSIQUE de soja (4.55), B

LACTOGLOBULINE A(5.20), ANHYDRASE CARBONIQUE B bovine (5.85), A.C. B humaine (6.55), MYOGLOBINE de cheval (6.85,7.35), LECTINE de lentille (8.15, 8.45, 8.65) et TRYPSINOGENE (9.30).

3.5.2 Avec urée : Pour obtenir l'électrofocalisation en milieu dénaturant, la technique analytique de première dimension d' O' FARREL(1975) a été réalisée. Elle a été réalisée en tubes de 130 x 2.5 mm et figure en annexe 14.

3.6 IMMUNOLOGIE :

Dans le cadre de l'étude systématique de certaines protéines de l'hémolymphe des larves de lépidoptères, une comparaison de certaines de leurs propriétés immunologiques a été tentée.

3.6.1: Préparation de l'immun serum

Une protéine de l'hémolymphe de S.littoralis, d'une pureté électrophorétique de près de 90%, sert à immuniser un lapin de 3.5 kg, selon le protocole suivant (KAMINSKI, 1979); l'adjuvant de FREUND utilisé est de type "incomplet"(sans mycobactéries).

première injection : 3 mg dans 1 ml de tampon mélangé à 1ml d'adjuvant de FREUND, par voie intrapéritonéale.

deuxième injection : 2 mg dans 0.5 ml de tampon et 0.5 ml
21 jours après d'adjuvant, par voie sous cutanée.

troisième injection : 1 mg dans les mêmes conditions.
21 jours après

prélèvement : par ponction intraveineuse dans la
15 jours après veine marginale de l'oreille.

Après une coagulation de 2 h à température ordinaire et 10 h à + 4°c, le sang est centrifugé 30 mn à 2000g, et le sérum recueilli est fractionné puis congelé à - 20° c jusqu'à utilisation. Les détails de préparation sont ceux décrits par KAMINSKI (1979).

3.6.2 immunodiffusions : nous avons éffectué des immunodiffusions simples en gels d'agar (technique d'"Ouchterlony").

4 ENZYMOLOGIE - ENDOCRINOLOGIE - MARQUAGE RADIOACTIF :

4.1 ENZYMOLOGIE :

4.1.1 Analyses qualitatives rapides:Pour révéler l'existence de certaines activités à des moments précis du développement de S.littoralis et dans certains tissus particuliers, nous avons utilisé des plaquettes de diagnostic rapide APIZYM. Les tissus sont homogénéisés en tampon phosphate (à pH 6.8 ou 5.6) et une quantité aliquote introduite dans chaque cupule de la plaquette. Après

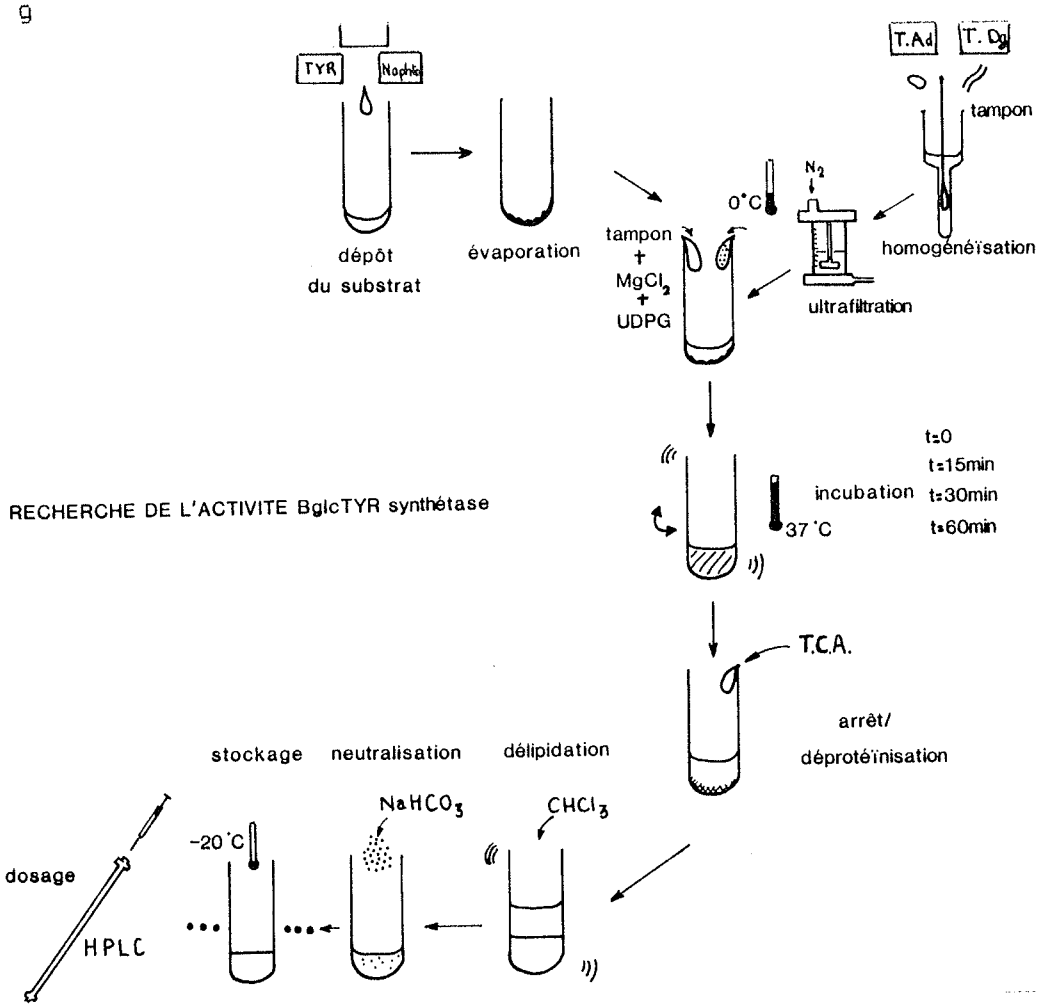


figure 23: Protocole expérimental pour la recherche de l'activité de synthèse du glucoside de tyrosine sur des homogénats tissulaires de S. littoralis.

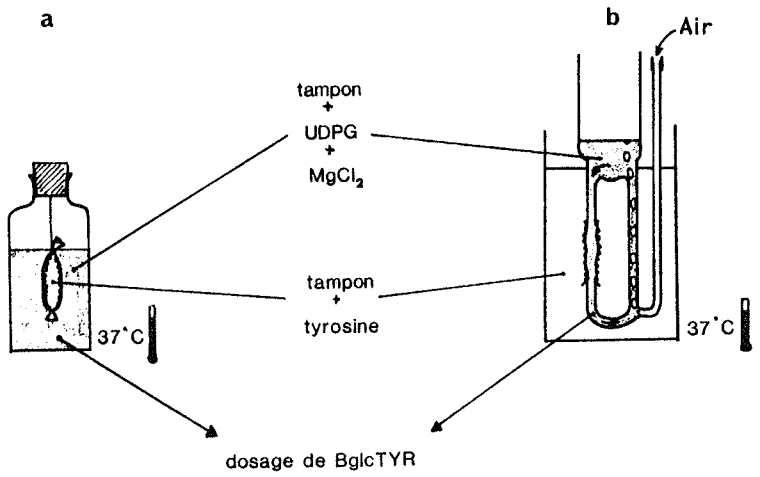


figure 24: Dispositifs d'incubation pour la recherche de l'activité de synthèse du glucoside de tyrosine sur des tubes digestifs entiers de S. littoralis
a. incubation "en sac" sans aération du milieu
b. perfusion de tube digestif retourné, avec aération / agitation.

incubation de 3 h à 37° C, la réaction est stoppée, révélée et les résultats enregistrés sur une échelle à 5 classes. Les activités testées , les substrats employés ainsi que les correspondances de l'échelle de lecture sont consignés à l'annexe 15.

4.1.2 B Glucosyl transférase : cette activité a été recherchée de différentes façons. Nous avons fait l'hypothèse que la synthèse de Bglc TYR était réalisée par une activité de ce type à partir de glucose activé sous forme d'UDPG. En effet, une telle activité a été suggérée, et localisée chez certains insectes, comme intervenant dans certains mécanismes de détoxification de substances phénoliques exogènes (MEHENDALE et DOROUGH, 1972). Nous avons essayé de détecter cette glucosylation sur du 1-Naphtol et sur la tyrosine dans des expériences de deux types :

4.1.2.1 Sur homogénats de tissu adipeux ou de tube digestif : le protocole expérimental est décrit en figure 23. L'incubation a lieu à 37° C et le milieu d'incubation est le suivant (d'après VAISANEN et coll., 1983) : tampon glycine NaOH 50 mM pH 7.8 , MgCl2 10 mM, UDPG 0.5 mM, 1-Naphtol ou tyrosine 25 µM.

4.1.2.2 Sur tissus intacts : des incubations d'une heure de tubes digestifs vidés ont été tentées. Les protocoles sont présentés en figure 24a et b. Si l'expérience 24a ne pose pas trop de difficultés, la perfusion de tubes digestifs (d'après NEDERGAARD, 1972) a posé un certain nombre de problèmes techniques, notamment d'adéquation de tailles, qui n'ont pu être résolus. Nous avons néanmoins choisi de la présenter car nous pensons qu'elle est réalisable.

4.1.3 B Glucosidase :

4.1.3.1 Mise en évidence de l'activité B Glucosidasique : dix chrysalides blanches sont broyées à 4° C dans 20 ml de tampon phosphate 0.15 M à pH 6.2. Après centrifugation (30 mn, 2500 g), l'homogénat est débarassé des lipides flottant et de la cuticule du culot, et ultrafiltré pour se débarasser des composants de faible P.M., notamment de la tyrosine. L'incubation a ensuite lieu pendant une heure à 37° C dans le précédent tampon, après adjonction soit de Bglc TYR, soit de p-nitrophenyl-B-Glucoside (SIGMA), à concentration de 10 mM. La tyrosine formée est détectée par HPLC après traitement des échantillons comme décrit en 2.1.1 et 2.2.2. La détection du p-nitrophenol est décrite dans le paragraphe suivant.

4.1.3.2 Dosage au cours du développement : l'activité B Glucosidasique a été dosée au cours des 5° et 6° stades larvaires ainsi que sur des chrysalides jeunes, selon la méthode utilisée par CHARARAS et CHIPOULET (1982). Cinq invidivus par âge

sont pesés et utilisés comme suit (le tampon utilisé est celui décrit en 4.1.3.1, additionné de P.T.U. 0.5 mM) :

LARVE

prélèvement "total" d'hémolymphe — larve saignée

10 µl pour le dosage des hormones → congeler

x µl + 100 µl de tampon — + 1 ml de tampon au 1/5°

peser — broyer, rincer

centrifuger à 4°C

prélever tout le surnageant

congeler, lyophiliser

reprendre par 100 µl d'eau — reprendre par 200 µl d'eau

+ 50 ul de p NPG 20 mM — + 100 ul pNPG 20 mM

60
30
ou 10 min à 37°C

arrêter par 3 ml Na2CO3 2%

lire la D.O. à 400 nm

Des témoins sans enzyme, ou inactivés par la chaleur, ainsi que des extraits de contenu de tube digestif ont été soumis au même protocole pour les contrôles.

4.1.3.3 Propriétés: Un tout début de caractérisation de la B glucosidase a été effectué avec l'établissement de sa courbe d'activité à différents pH. L'extrait enzymatique est obtenu comme précédemment (4.1.3.1), et le dosage de la dégradation du pNPG est réalisé dans des tampons Citrate pour les pH les plus bas, et en tampons Phosphate (SORENSEN) pour la gamme 5.4-9.

4.2 ENDOCRINOLOGIE

4.2.1 Echantillons : sur les échantillons de dosage de la B Glucosidase, 10 µl d'hémolymphe brute ont été prélevés et congelés, puis utilisés pour doser les hormones juvéniles et les ecdystéroïdes au cours du dernier stade larvaire. Les prélèvements

d'hémolymphe sont séparés, par plusieurs extractions (voir en annexe 16), en une phase hexane contenant les hormones juvéniles totales et une phase méthanol-eau (70/30) contenant les ecdystéroïdes. Ces extraits sont ensuite traités séparément et finalement dosés par R.I.A.

4.2.2 Séparation des hormones juvéniles : après un lavage de la phase hexane sur une colonne de silice, les hormones juvéniles sont éluées par du dioxanne. Cette dernière phase est alors acidifiée par de l'acide sulfurique et portée à 40°C pendant 12 heures pour assurer la conversion des J.H. en leurs diols immunoréactifs. Après une deuxième purification par C.C.M. sur silice (solvant: Heptane / Dioxanne - 70/30), les diols sont récupérés pour le dosage. Sur tous les échantillons, les JH totales sont dosées par R.I.A.. Pour un petit nombre d'entre-eux (en début de stade 6, lors du filage, chrysalides blanches, chrysalides 3 à 5 heures après la mue), les différentes hormones ont été séparées par H.P.L.C. (PLANTEVIN et coll., 1984).

4.2.3 Séparation des ecdystéroïdes : ici également, le dosage par R.I.A. des ecdystéroïdes totaux est effectué sur tous les échantillons. Ceux présentant les plus fortes teneurs en ecdystéroïdes (larves lors du filage, chrysalides 24 heures après la mue) ont été soumis à une séparation de l'ecdysone et de l'ecdystérone par chromatographie en couches minces (CALVEZ et coll.; 1976).

4.2.4 Radio immuno essais: pour les hormones juvémiles (STRAMBI et coll.; 1981) comme pour les ecdystéroïdes (DE REGGI et coll.; 1975), le dosage est effectué par dialyse à l'équilibre avec des hormones ou analogues d'hormones marqués à l'Iode-125 et des anticorps provenant d'IMMUNOTECH (MARSEILLE).

4.3 RADIOACTIVITE

4.3.1 Mesure du volume d'hémolymphe par dilution isotopique : des groupes de 5 à 7 larves, d'âge déterminé dans le dernier stade, sont isolés et anesthésiés au gaz carbonique. A l'aide d'une micropipette en quartz, un microlitre (correspondant à environ 2.3 bKq) d'une solution aqueuse d'hydroxy 14 C-inuline (CEA) leur est injecté au niveau d'une fausse patte abdominale. Trois heures après, un prélèvement de 10 µl est effectué et le volume hémolymphatique évalué par la dilution de l'inuline (LEVENBOOK, 1958). Le comptage de l'échantillon (10 µl d'hémolymphe ; 10 µl de tampon d'inhibition de mélanisation ; 10 µl d'eau) se fait dans 4 ml de scintillant 299 (PACKARD), avec un compteur TRICARB 3255 (PACKARD).

4.3.2 Expérience de marquage des composés aromatiques:
Dans le but d'une part d'analyser le devenir d'un apport de tyrosine en début de dernier stade larvaire, et d'autre part d'évaluer le rôle de l'intestin dans la synthèse éventuelle d'une des formes de

stockage de la tyrosine, nous avons effectué l'expérience de marquage suivante:

Deux lots de dix larves âgées de 24 heures après la dernière mue larvaire sont isolés en logettes dans des dessicateurs étanches placés à 25°C; la quantité d'alimentation fournie (environ 600 mg de milieu frais) est calculée pour être totalement ingérée en 24 heures.

Un premier lot reçoit de la 14-C tyrosine par ingestion: environ 72 bKq de tyrosine uniformément marquée (C.E.A) sont injectés dans l'alimentation de chacune des dix larves.

Le second lot est traité par injection: la même dose de tyrosine est ici injectée à chaque larve sous forme de solution saline à pH neutre (8µl). Les larves ayant perdu de l'hémolymphe à la suite de l'intervention ne sont pas utilisées pour l'expérience.

Vingt quatre heures après la mise sur milieu marqué ou l'injection, les larves des deux lots sont ponctionnées comme décrit précédemment et l'hémolymphe recueillie à 0°C. Deux échantillons de 20 µl sont retirés de l'hémolymphe prélevée dans chaque lot, laquelle est alors additionnée de P.T.U. et stockée à -40°C pour une utilisation ultérieure. Un des deux échantillons est passé immédiatement en H.P.L.C. sur une colonne "protéine" SW300. L'autre est traité au T.C.A. pour précipiter les protéines, et stocké à -20°C en attendant son passage en H.P.L.C. pour séparer la tyrosine libre de son glucoside.

Les sorties de colonne H.P.L.C. sont fractionnées puis comptées comme précédemment. Une fraction aliquote de 10 µl de l'hémolymphe de chaque lot est par ailleurs comptée telle quelle.

La radioactivité présente dans les fécès est aussi mesurée après digestion basique (SOLUENE - PACKARD) et une décoloration par l'eau oxygénée. Le CO_2 dégagé au cours des 24 heures, piégé par de la soude 0.25N, est également soumis au comptage. Pour chaque type de mesure, le "quenching" est déterminé par addition d'une dose connue de 14C-tyrosine et recomptage (standardisation externe).

5. STATISTIQUE ET ANALYSE DES DONNEES

5.1 Statistique descriptive - tests classiques : toutes les méthodes utilisées sont décrites, avec les restrictions qui s'y rapportent, dans les ouvrages de SCHWARTZ (1969) et de DAGNELIE (1969). Chaque fois que cela a été possible (répétitions et populations normales), nos données ont été présentées avec l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil de 5 % : $x \pm ts/\sqrt{n}$, avec x = moyenne de l'échantillon, s = écart-type corrigé (estimateur sans biais) de l'échantillon, n = taille de l'échantillon, t = valeur limite du test de Student au seuil de 5 %. Lorsque l'hypothèse de normalité ne peut être émise (résultats en pourcentage...), seul l'écart réduit $s/\sqrt{n}$

est fourni.

Les comparaisons simples ou multiples de moyennes sont réalisées grâce à une calculatrice programmable (HP 41 ; module statistique ; programme d'analyse de variance à un critère). L'hypothèse d'égalité des variances est supposée si les valeurs le permettent, mais non testée.

Nous avons aussi utilisé à plusieurs reprises des méthodes statistiques multidimensionnelles permettant une représentation concise de résultats concernant un nombre élevé de variables. Ces méthodes peuvent être assorties de tests sur une hypothèse de départ (cas de l'analyse discriminante). Elles peuvent aussi être plus descriptives et traduire graphiquement les caractères essentiels d'un "grand tableau"; c'est le cas de l'analyse factorielle des correspondances et de la classification hiérarchique telles que nous les avons utilisées sur des données de composition de protéines en acides aminés.

Nous ne nous étendrons pas ici sur le détail de ces techniques, mais nous en exposerons quand même les principes pour permettre l'interprétation des graphiques obtenus.

5.2 Analyse discriminante:

Cette méthode a été utilisée pour certains résultats présentés en annexe 7. Les données se présentent sous forme d'un tableau croisé d'individus, regroupés à priori en populations (dans notre cas: répétitions des expériences sur un même milieu nutritionnel), et de variables (dans notre cas: indices nutritionnels). Le principe de la méthode est de projeter les individus, dans l'espace des variables, sur un plan maximisant la variance interpopulation par rapport à la variance intrapopulation. Finalement, un test statistique permet d'apprécier globalement la validité de la subdivision en populations distinctes (dans notre cas: existence d'un effet des différents milieux utilisés sur les grandeurs étudiées). Le programme informatique utilisé a été écrit par P.FOUILLET et E.WAJNBERG (Laboratoire de biologie des populations, UNIVERSITE CLAUDE BERNARD, LYON) sur un microordinateur APPLE II.

5.3 Analyse factorielle des correspondances (A.F.C.):

Mise au point à l'origine pour l'étude des tableaux de contingence (voir BENZECRI, 1979 ; LE BART et coll.; 1982), nous avons utilisé cette méthode sur des tableaux de composition en acides aminés de protéines homologues.

Comme les autres techniques d'analyse multidimensionnelle , elle permet en première approximation la condensation de l'information d'un tableau assez aride en un graphe d'appréhension plus directe. Il faut cependant signaler que, d'une façon générale, la perte d'information dûe à cette simplification peut occasionner des erreurs notables d'interprétation dans le cas de tableaux assez complexes. Elles sont donc toujours assorties de nombreux indices ("contributions" par

exemple) permettant de minimiser ces erreurs d'appréciations ("erreurs de perspective") lors d'analyses assez fines; nous ne rentrerons pas ici dans ces détails.

Résumons cependant en quelques mots le principe de la méthode:
elle partage avec d'autres techniques un but consistant à trouver les axes successifs d'inertie maximale du "nuage" des observations (individus dans l'espace des variables, ou l'inverse). Ces axes, nommés "facteurs", permettent d'obtenir des projections contenant le maximum de la variance (équivalant à "information") du nuage initial. Nous nous sommes ici contentés du premier plan factoriel, contenant souvent pour les petits tableaux la plus grande partie de l'information utile.

Sans entrer dans des considérations techniques excessives, notons que l'A.F.C. utilise pour la constitution de ces axes un type particulier de distance (dite métrique du X^2) mettant l'accent sur les différences de profils plutôt que sur des différences absolues. Elle permet de plus une représentation graphique simultanée des "variables" et des "individus" dans le plan factoriel (ici protéine associée à une espèce donnée, et aminoacides la constituant).

5.4 CLASSIFICATION HIERARCHIQUE :

Sur les mêmes données que celles ayant servi à l'analyse précédente, nous avons effectué (toujours grâce à des programmes de P. FOUILLET et E. WAJNBERG) une classification sur les différents insectes à partir des compositions en acides aminés de la protéine étudiée. La classification automatique utilisée est de type hiérarchique ascendante, c'est-à-dire agrégeant les classes par ordre de proximité (les classes les plus proches étant regroupées d'abord).

figure 25 : cycle de développement de S. littoralis

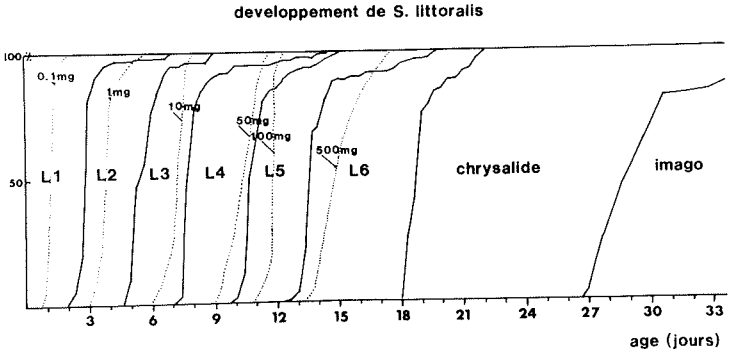


figure 26 : durée des stades larvaires du stade nymphal de S. littoralis
- pour chaque âge, les courbes pleines délimitent les proportions des larves vivantes présentes dans chaque stade
- les courbes en pointillés représentent le franchissement de différents poids par la population étudiée

C. RESULTATS ET DISCUSSION

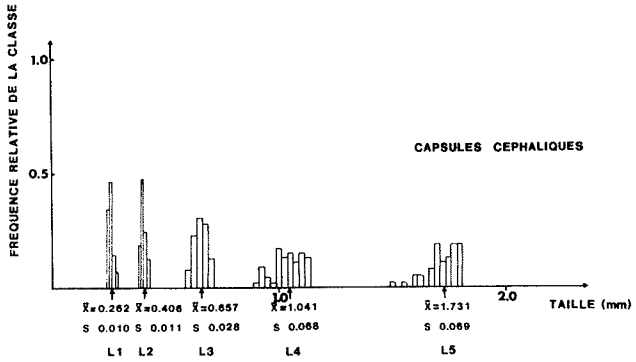
1. BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE GENERALE DE S. LITTORALIS

1.1 CARACTERISTIQUES DU CYCLE BIOLOGIQUE DE S. LITTORALIS EN LABORATOIRE:

1.1.1 Développement : dans nos conditions d'élevage, la durée totale du cycle biologique de S.littoralis est d'environ 35 jours se répartissant comme suit : 3,5 jours environ pour le développement embryonnaire, 18 à 19 jours pour la totalité des six stades larvaires, 8 à 9 jours pour le développement nymphal et 3 à 4 jours pour l'obtention d'une ponte fertile. On observe moins de 4% de mues surnuméraires. Les figures 25 et 26 illustrent le déroulement normal du développement larvo-nymphal de S.littoralis et des données plus précises sur la durée moyenne des différents stades, ainsi que sur la mortalité larvaire, sont fournis au § 1.1.4.

La reconnaissance morphologique des différents stades ne pose pas de problème particulier : elle peut être effectuée à tout moment d'après une évaluation informelle du couple taille - poids associé à l'observation à l'oeil nu de la capsule céphalique. Les doutes peuvent être levés en mesurant la largeur des capsules céphaliques. Ces dernières sont en effet distribuées en classes disjointes comme le montre la figure suivante (les capsules des L6 ne sont pas représentées car elles sont fendues à la mue nymphale) :

figure 27 : distribution des largeurs de capsules céphaliques des différents stades de S. littoralis



L'élevage étant effectué en continu sur un lot d'animaux, des problèmes d'homogénéité de développement risquaient d'apparaître au cours des générations. Une sorte de resynchronisation a donc été effectuée à chaque cycle en plaçant les oeufs fraîchement pondus à une température de 21° C (ralentissant leur développement - 5 à 6 jours

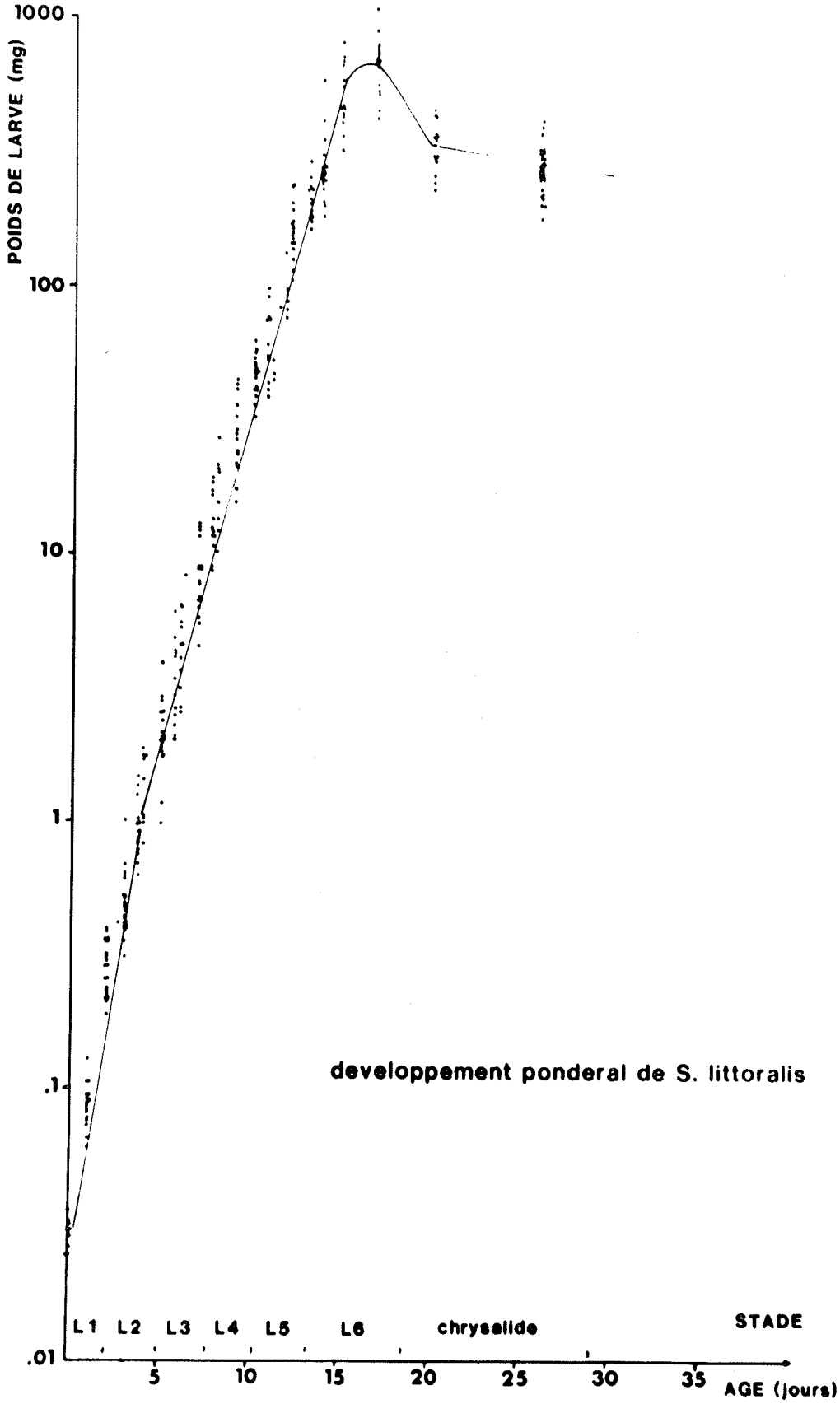


figure 28 : évolution du poids de S. littoralis au cours de son développement larvo-nymphal

à 21° C -), et ne les replaçant à 25° C qu'à l'obtention du nombre suffisant d'oeufs pour continuer l'élevage.

1.1.2 Croissance : elle a été suivie au cours du développement et l'évolution des poids frais (bol alimentaire compris) est montrée en coordonnées semi-logarithmiques à la figure 28. La croissance est donc de type exponentiel avec, semble-t-il, une phase un peu plus rapide pour les deux premiers stades larvaires. On peut estimer les temps de doublement à 0.7 jour dans la première phase et à 1.2 jour dans la seconde. Il est entendu que cette vision "semi-fine" de la croissance ne rend pas compte de l'évolution au voisinage de la mue.

Le tableau 3 donne les poids moyens à la mue (animaux pris moins de 6 h après une mue), permettant une comparaison avec des élevages dans d'autres conditions.

début du stade	L1	L2	L3	L4	L5	L6	N
Poids ± ts/√n -mg-	.028±.002	.55 ±.05	3.65±.61	15.9±1.4	76.2±26	250±25	337±30
(n)	29	42	33	35	34	20	18

1.1.3 Ages physiologiques : lors de tout suivi d'un phénomène au cours du développement se pose le problème de la mesure du temps. La méthode la plus directe est la mesure réelle du temps à partir d'un évènement particulier pris comme base, par exemple l'éclosion. Lorsqu'on étudie certaines portions du développement, on peut déplacer le zéro des temps à un évènement particulier, comme une mue larvaire précise. Cela commence cependant à poser de petits problèmes techniques tels qu'une surveillance continue des mues. Une autre approche consiste à mesurer le temps par une grandeur qui lui soit bien corrélée ; nous avons vu que le poids peu convenir ici et nous l'avons utilisé parfois dans ce but.

Dans certaines situations, cependant, cette grandeur ne suffit pas à caractériser l'âge assez précisément ; soit que la variabilité inter-individuelle interdise son utilisation dans des intervalles de temps trop courts, soit qu'elle ne constitue plus une fonction monotone du temps comme c'est le cas en fin de dernier stade larvaire avec l'arrêt de l'alimentation. Dans ces situations, l'existence de marqueurs anatomiques ou éthologiques du développement permet un repérage fin et fiable, puisqu'il est à priori sous-tendu par un ensemble de déterminants physiologiques contrôlant aussi les phénomènes que nous étudions. Une certaine variabilité parasite peut ainsi être réduite.

Les limites d'une telle démarche résident d'une part dans le choix d'un "marqueur" correct, dont la précision est inévitablement

Abbrév	Heures après la mue 5/6	Poids moyen	Photo (figure 6)		Commentaire
L5b	-33	170	-	en alimentation active	
L5c	-22	210	-	en alimentation, activité faible	
L5d	-11	230	1	plus d'alimentation, inactive	sensible, capsule céph."yeux noirs"
L60	0	250	2	pas d'alimentation, peu active	c.c. blanche, noir vif, contrastes
L6a	12	265	-	début d'alimentation, assez active	c.c. noire, couleur noire, "
L6a'	24	290	3	en alimantation active	noire, ornementations visibles
L6b	48	480	4	en alimentation active	grise foncée, orn. encore vis.
L6c	72	700	5	en fin d'alimentation, active	grise, tégument tendu, orn. pales
L6c	79	430	6	plus d'alimentation, active	grise, tégument distendu
L6d	86	380	7	purge du tube digestif, filage	grise foncée, luisante, pigment cutané rouge
L6e	102	370	-	fin de filage, peu active	annelées irréversiblement
L6f	112	350	8	immobiles, sensible	annelage resserré
L6g	125	350	-	immobiles, insensible	"
N0	132	335	9	chrysalide blanche/verte	tégument mou très fragile
Na	138	330	-	chrysalide brun clair	tégument encore fragile
Nb	144	325	10	chrysalide brune	
Nc	156	320	-	chrysalide marron tannée	tégument consolidé
Nd	180	310	-	chrysalide marron foncé	tégument rigide

tableau 4 : description de différents marqueurs du développement de S. littoralis encadrant le dernier stade larvaire

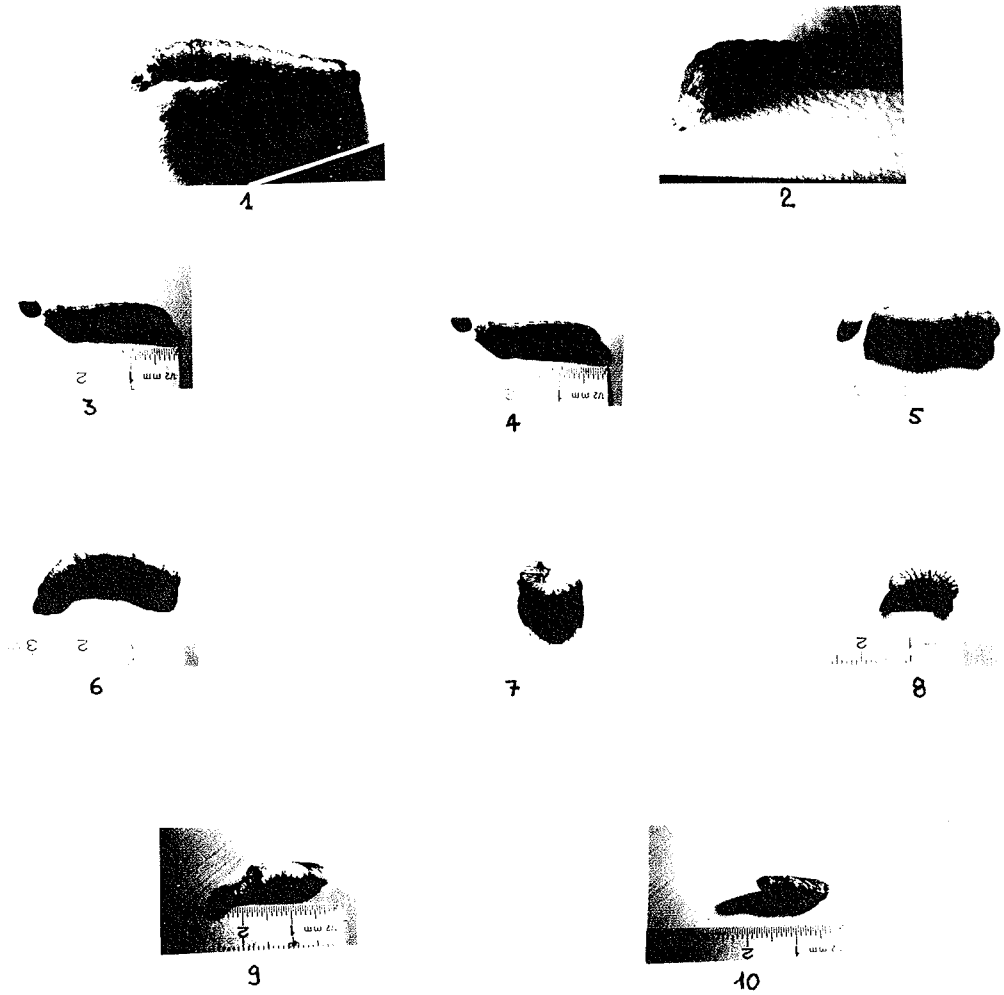


figure 29 : aspects des chenilles de S. littoralis au cours du dernier stade larvaire. Les numéros reportent aux descriptions du tableau 4

restreinte, et de l'autre dans le risque de masquer un phénomène dont la cause est indépendante des déterminants physiologiques gouvernant le "marquage". Dans le cas étudié, ce risque nous a paru assez minime et nous avons utilisé une grille de descripteurs caractérisant les étapes de la fin du développement larvaire. Elle est exposée au tableau 4 et illustrée par les photos de la figure 29.

1.1.4 Evaluation de l'état de l'élevage : étant donné notre manque d'expérience dans l'élevage de noctuelles, nous avons comparé certains de nos caractères d'élevage, d'une part avec les résultats obtenus par d'autres auteurs, et d'autre part entre deux générations de notre élevage. Cette comparaison entre générations éloignées de plus d'un an montre (tableau 5) une légère augmentation du poids moyen des chrysalides, qui n'est cependant pas significative, et une stabilité de la durée de ce stade. On constate cependant une légère baisse de la sex-ratio (cette dernière mesure étant globale et sans répétition, on ne peut pas dire grand chose quant à sa signification).

tableau 5 : comparaison de quelques caractères des chrysalides à la première et la deuxième génération de l'élevage

Poids en mg	Poids des chrysalides ♀	Poids des chrysalides ♂	sex ratio ♀/♂	Durée (j) du stade nymphal
Génération 1	275±45	258±35	0.97	8.9±0.2
(n)	(10)	(10)	(443)	(31)
Génération 12	317±32	300±28	0.81	8.8±0.2
(n)	(10)	(10)	(218)	(29)

La comparaison des durées des différents stades larvaires avec celles obtenues dans un élevage semblable (SIDIBE, 1976) ne révèle aucune différence frappante (tableau 6). Les durées relatives des stades larvaires sont aussi très comparables avec un élevage sur luzerne, mais la durée du stade nymphal y est nettement plus grande. C'est éventuellement un élément à retenir pour des comparaisons avec des résultats obtenus avec des élevages sur aliment naturel.

Auteur	Aliment	temp.	L1	L2	L3	L4	L5	L6	N
			$\bar{x}$ (s)	$\bar{x}$ (s)	$\bar{x}$ (s)	$\bar{x}$ (s)	$\bar{x}$ (s)	$\bar{x}$ (s)	$\bar{x}$ (s)
BAKER et MILLER	luzerne	22.5	3.5	3.0	3.0	4.0	2.8	7.0	21
SIDIBE	milieu POITOUT	25°C	3.2 (0.7)	1.5 (0.6)	3.3 (0.8)	2.2 (0.7)	2.1 (0.4)	5.5 (1.3)	11. (2.4)
notre travail	milieu POITOUT	25°C	2.9 (0.2)	2.7 (0.5)	2.3 (0.5)	3.0 (0.2)	2.7 (0.3)	5.2 (0.4)	8.9 (0.4)

tableau 6 : comparaison de la durée des stades et de sa variabilité entre différents élevages de S. littoralis

En ce qui concerne la mortalité, le tableau 7 montre qu'elle reste comparable à celle obtenue par SIDIBE, la principale différence étant le déplacement vers le stade nymphal de la mortalité observée par SIDIBE au dernier stade larvaire.

tableau 7 : mortalité larvaire et nymphale de S. littoralis dans deux élevages de laboratoire sur aliment artificiel

Auteur	L1	L2	L3	L4	L5	L6	N	TOTAL
SIDIBE	3.3%	3.4%	0%	1.7%	1.8%	12.9%	0%	21.6%
notre travail	4.8%	2.3%	4.8%	0%	1.2%	0%	13.1%	26.2%

Quoiqu'il en soit, l'utilisation pour nos expériences d'individus "normaux", c'est-à-dire sans retard de développement, permet d'éliminer l'influence des facteurs aléatoires de l'élevage.

Par ailleurs, comme nous employons des antimicrobiens phénoliques dans le milieu artificiel, nous avons grossièrement évalué leurs effets sur quelques variables étudiées. S'il paraît évident qu'ils ralentissent quelque peu le développement larvaire (quand même de près de 15 %), leur suppression paraît impossible sans trouver un autre moyen de limiter le développement fongique (OUYE, 1962).

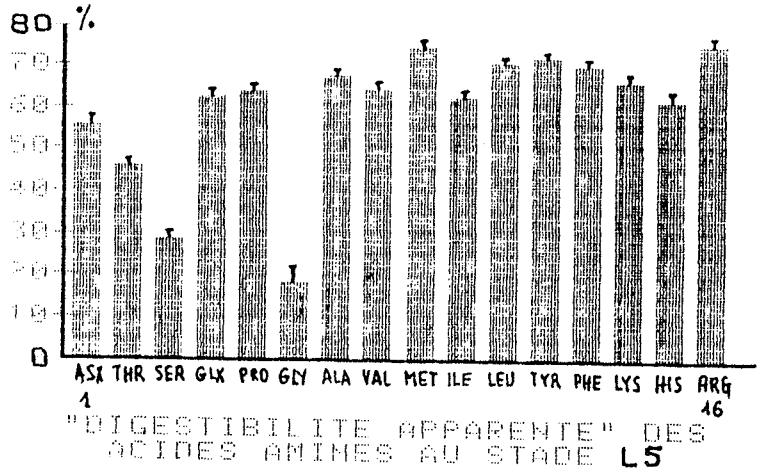
L'hémolymphe d'animaux élevés normalement ne présente, en H.P.L.C. à une sensibilité habituelle (détection à 254 ou a 280 nm), aucune différence par rapport à des animaux élevés sur milieu dépourvu d'acide benzoïque et de nipagine. Les fecès présentent par ailleurs un pic pouvant correspondre à de l'acide hippurique (N-Benzoyl glycine), forme d'excrétion du noyau benzénique chez de nombreux herbivores.

Il est aussi à noter que l'amino acidémie semble légèrement modifiée (modification de certains niveaux d'acides aminés, mais sans changement du spectre) par l'incorporaion de ces antimicrobiens dans l'alimentation. Comme l'effet était léger, nous n'avons pas approfondi la question par des répétitions, et avons utilisé le milieu "POITOUT et BUES" standard pour toutes nos expériences.

A titre d'information, signalons qu'un certain nombre de renseignements peuvent être trouvés sur divers aspects de la biologie de S.littoralis :

- biologie, comportement, rythmes d'émergence en milieu naturel (BISHARA, 1934 ; JARCZYK et coll. 1957 ; HASSAN et coll. 1960 ; BALACHOWSKY, 1972)

- effets de la température et de la thermopériode sur le développement (BAKER et MILLER, 1974 ; SIDIBE, 1976 ; MILLER, 1977)



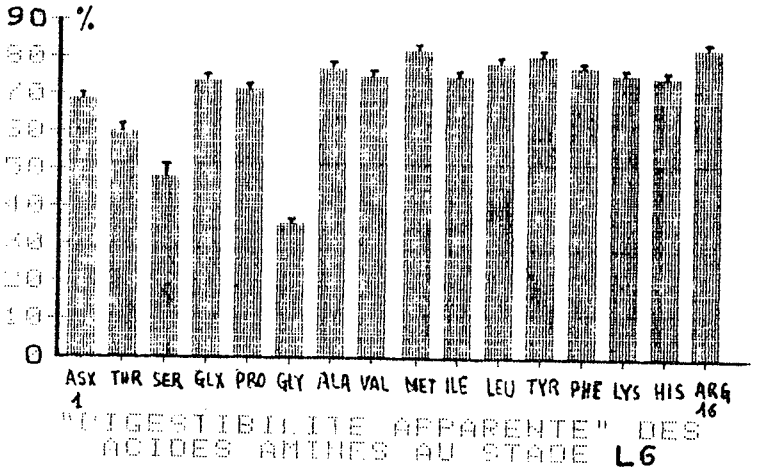


figure 30 : comparaison du bilan d'assimilation des acides aminés de l'alimentation en début des stades 5 et 6 de S. littoralis

- caractéristiques de la fécondité et de la fertilité en élevage de laboratoire (BENITO ESPINAL, 1976 ; MILLER, 1977).

1.2 NUTRITION

1.2.1 Quelques paramètres nutritionnels : nous ne nous étendrons pas ici sur l'expérience réalisée, qui est décrite et commentée en annexe 7. Seuls quelques résultats concernant la nutrition de S.littoralis sur notre milieu artificiel sont fournis dans le tableau 8.

tableau 8 : quelques paramètres relatifs à l'alimentation de S. littoralis sur le milieu de POITOUT et BUES

Consommation brute (g/j)		Indice de consommation		Indice de croissance		Digestibilité apparente		E.C.I.	
$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$
0.85	0.13	1.69	0.20	0.42	0.10	27%	2%	17%	3.5%

La donnée qui nous sera utile est surtout celle de la consommation brute journalière (en poids frais). C'est une valeur moyenne calculée sur une période de 48 h en début de dernier stade larvaire. Elle nous permettra d'estimer les intrants en tyrosine au cours de cette période, grâce au taux par ailleurs connu des différents acides aminés dans l'alimentation (tableau 9).

tableau 9 : composition en acides aminés du milieu de POITOUT et BUES

	ASX	THR	SER	GLX	PRO	GLY	ALA	VAL	MET	ILE	LEU	TYR	PHE	LYS	HIS	ARG
µmol/g P.Frais	22.2	10.6	7.4	39.2	15.5	24.1	29.9	18.8	4.5	13.5	26.6	5.9	10.8	13.9	6.7	12.7
s (n=4)	1.4	.6	.6	2	1	1.7	2	1.4	.4	.8	1.6	.5	.7	1.3	.8	.9
%	8.5	4	2.8	14.9	5.9	9.2	11.4	7.2	1.7	5.1	10.1	2.3	4.1	5.3	2.5	4.9
µmol/g P.Sec	97	46	32	172	68	105	131	82	20	59	117	26	47	61	29	56

1.2.2 Absorption intestinale des acides aminés:

L'expérience réalisée (voir B.1.3.2) sur des larves âgées de 24 heures dans chacun des stades 5 et 6 permet d'estimer le bilan en acides aminés entre l'ingéré et l'excrété au cours de cette période. Les résultats de digestibilité apparente pour chaque acide aminé sont présentés dans les histogrammes de la figure 30.

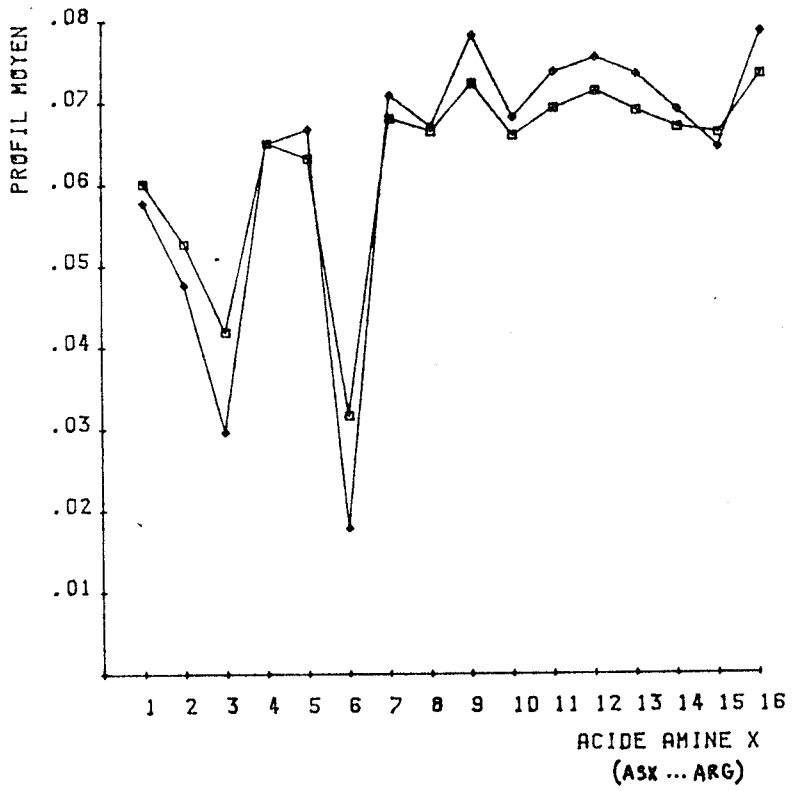


figure 31 : COMPARAISON DES PROFILS MOYENS D'ASSIMILATION
DES ACIDES AMINES
ENTRE LES STADES 5 ET 6
(◆) (□)

Il faut ici souligner que notre protocole d'estimation de la "digestibilité" ne comporte pas de marqueur de fin d'ingestion (colorant) ni de marqueur interne non digestible (oxyde de chrome, par exemple). Une erreur est donc introduite dans l'estimation de la quantité exacte de fécès correspondant à l'ingéré. Elle entraîne donc un certain accroissement de la variabilité inter-individuelle: pour un individu, les valeurs obtenues pour tous les acides aminés peuvent être légèrement décalées; néanmoins, les profils de "digestibilité" ne sont pas affectés par ce biais (valeurs rapportées à 100 pour chaque individu).

Ces remarques permettent de faire ressortir deux points des résultats présentés en figure 30:

a- A l'intérieur de chacun des deux groupes (stades 5 et 6), les différents individus présentent des profils tout à fait analogues (corrélation inter-individuelle très significative). Cela veut dire que les valeurs moyennes présentées à la figure 30 sont bien représentatives des différences réelles de "digestibilité" entre les divers acides aminés au cours des périodes étudiées.

b- En comparant les stades 5 et 6, on observe à l'évidence une différence entre les niveaux moyens pour chaque acide aminé. Cependant, nous ne pouvons en déduire des différences réelles de digestibilité: en effet, des différences dans le transit intestinal entre ces deux périodes peuvent entrainer des variations de ce type. Cela pourrait être le cas ici, une larve âgée de 24 heures dans le stade 5 n'étant pas exactement comparable à une larve âgée de 24 heures dans le stade 6, qui est plus long.

La comparaison entre les deux stades reste néanmoins possible sur les profils de "digestibilité", et montre qu'il n'existe pas de différence significative de classement des acides aminés entre les stades 5 et 6: La figure 31 présente les profils comparés et leur très forte corrélation (test de corrélation des rangs de SPEARMAN significatif à mieux que 1%.).

Cette expérience montre en outre les statuts particuliers de la glycine et de la sérine, qui présentent un bilan bien différent des autres acides aminés. Cela est très vraissemblablement dû à la présence dans les fécès de formes d'excrétion contenant de la glycine ou de la sérine (acides aminés non indispensables dont la néosynthèse est forte, à partir du glucose par exemple -KASTINGS et MC GINNIS, 1962). Leur nature exacte demeure inconnue (glycine ou sérine libre, acide hippurique ou autres glyco(séro?)conjugués...).

Par ailleurs, on peut noter que la tyrosine est l'un des acides aminés présentant le meilleur bilan (après l'arginine et la méthionine). C'est cette observation (au terme d'une expérience préliminaire analogue en début de dernier stade larvaire), qui nous a

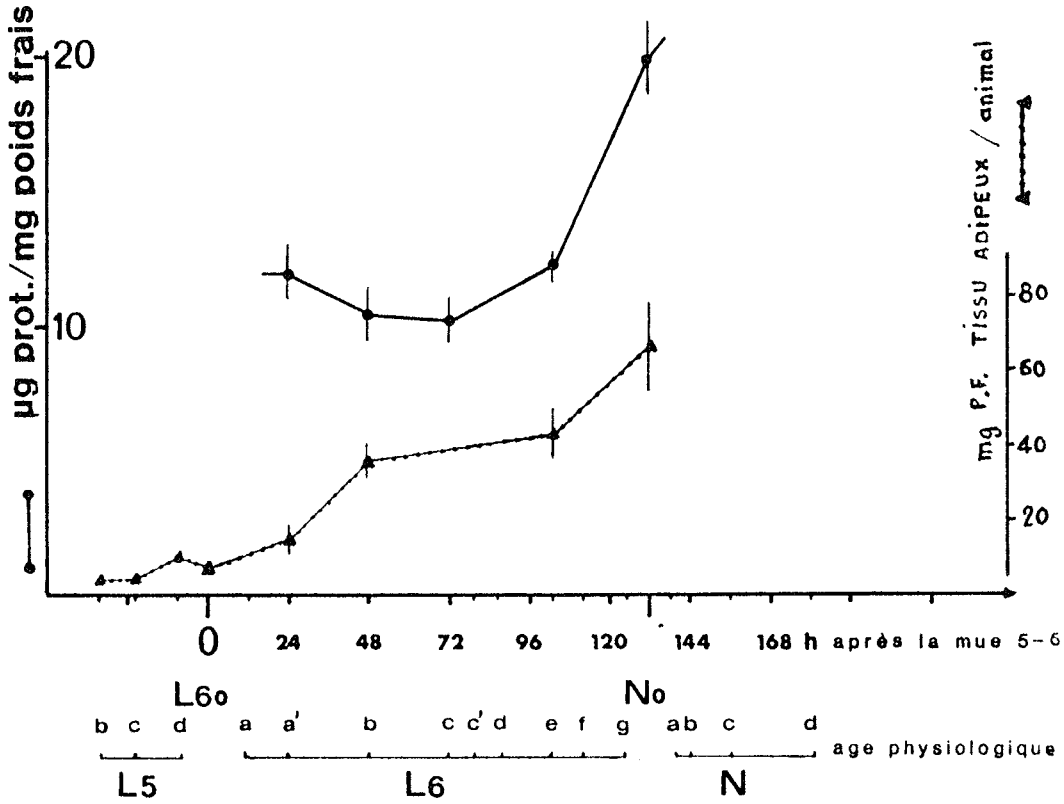


figure 32 : évolution du poids frais et de la teneur en protéines du corps adipeux de S. littoralis au cours du dernier stade larvaire

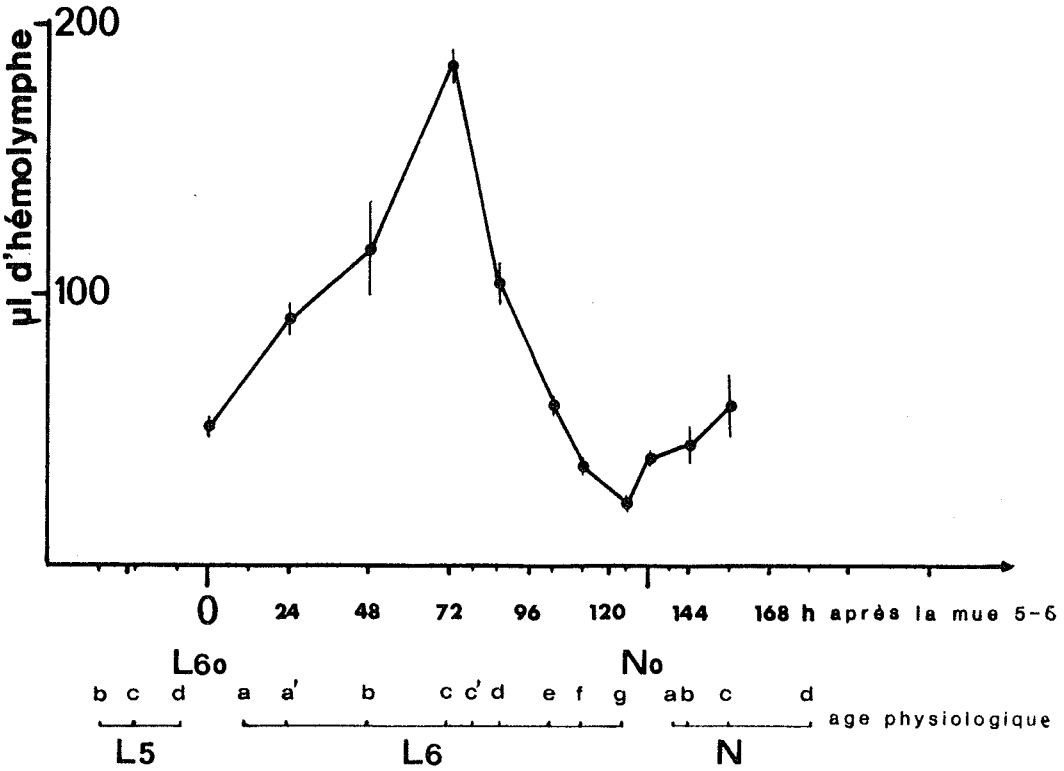


figure 33 : variations du volume hémolymphatique au cours du dernier stade larvaire de S. littoralis

suggéré la réalisation d'une comparaison entre les stades 5 et 6. En effet, comme nous le verrons par la suite, le métabolisme de la tyrosine change brutalement à la dernière mue larvaire, et il paraissait intéressant de savoir si ce phénomène s'exprimait au niveau de l'assimilation intestinale de tyrosine. Nos résultats montrent donc que cette grandeur ne semble pas particulièrement affectée par le passage de l'avant dernier au dernier stade larvaire; cela ne prouve cependant pas que l'intestin soit étranger aux changements constatés de métabolisme (qui sont principalement des synthèses actives de composés de stockage de la tyrosine).

1.3 QUELQUES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES DE S. LITTORALIS

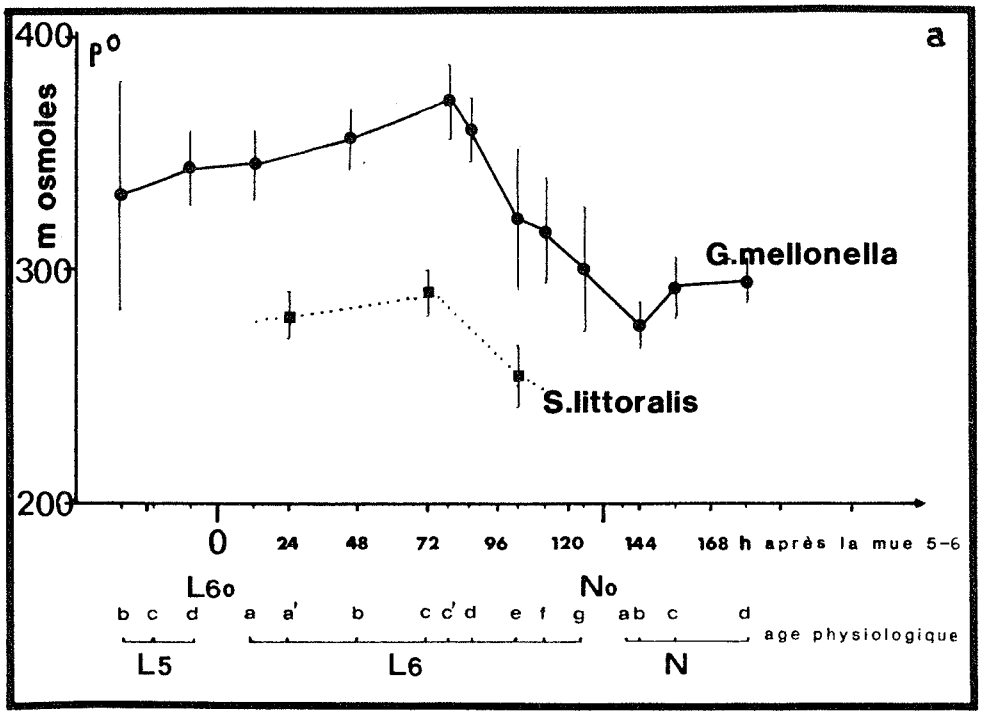
Les points exposés dans ce paragraphe regroupent de nombreuses informations, tant qualitatives que quantitatives, sur la physiologie de S.littoralis. Ils nous ont été utiles à un moment ou à un autre de notre étude mais, ne concernant pas directement les différents volets que nous avons abordés, ils ont été exposés à part. Certaines des données qui suivent proviennent d'autres auteurs ; nous les avons reportées ici pour leur intérêt dans la discussion de certains résultats. Elles sont généralement encadrées en trait gras.

1.3.1 Le tissu adipeux : l'interprétation de certaines expériences nécessite de connaître l'importance quantitative de certains tissus, dont le corps gras. Malheureusement, c'est une donnée très difficille à appréhender précisément, notamment chez S.littoralis où ce tissu est souvent diffus et très fragile. De plus, sa teneur en eau après dissection étant difficile à contrôler, seules des méthodes assez lourdes de dissection totale et de dessication (par lyophilisation par exemple) peuvent donner des résultats fiables. N'étant pas absolument indispensable à notre travail, nous ne les avons pas mises en oeuvre, mais avons simplement estimé l'évolution du poids frais du corps gras dans le dernier stade larvaire par dissection totale sous liquide physiologique. L'excès d'eau est retiré le plus complètement possible par capillarité, le séchage sur papier filtre ne permettant pas de récupérer facilement le tissu déposé. La figure 32 montre l'évolution de ce tissu en fin de vie larvaire.

Par ailleurs, l'évolution de la teneur en protéines du tissu adipeux a aussi été estimée (figure 32). La présence de lipides nous a obligé à utiliser la méthode de LOWRY-PETERSON avec précipitation (voir matériel et méthodes) ; cette raison, combinée à l'expression de la teneur "par mg de poids frais" conduit à considérer les résultats de la figure 32 avec précaution.

1.3.2 L'hémolymphe

1.3.2.1 Volume : cette grandeur, très utile à connaître, est aussi assez délicate à obtenir. En utilisant la



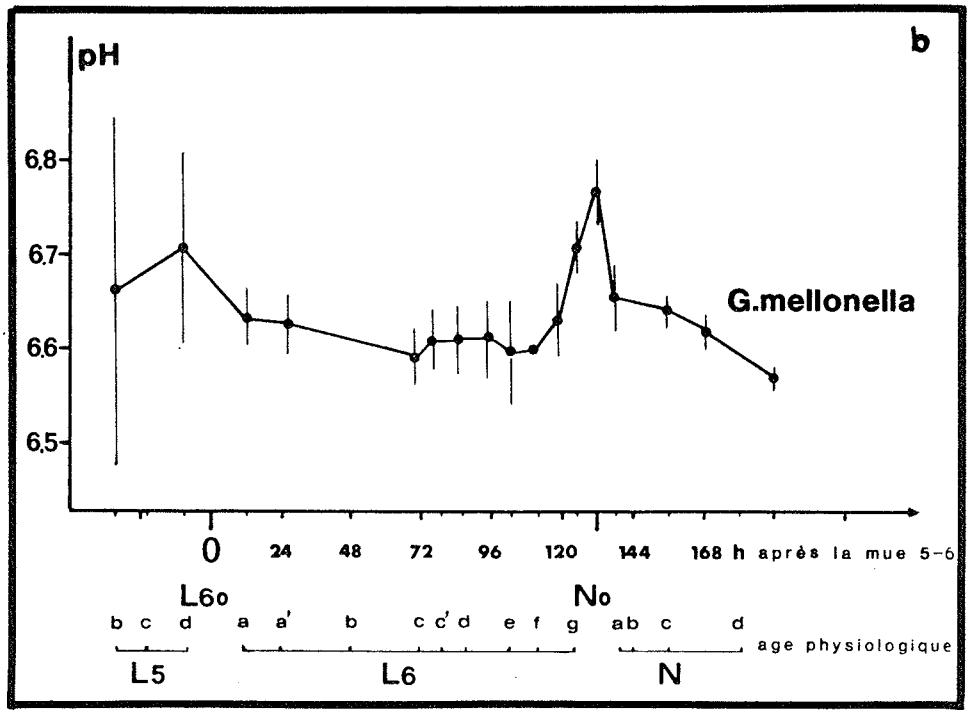


figure 34 : a. variations de la pression osmotique de l'hémolymphe avant la mue nymphale, chez S. littoralis et chez G. mellonella (d'après MESTRES, 1967)

b. variations du pH chez Galleria mellonella au cours de la même période (d'après MESTRES 67)

méthode employée par LEVENBOOK (1958 ; dilution d'inuline marquée), nous avons estimé, avec une précision qui semble bonne, les variations du volume hémolymphatique dans le dernier stade larvaire (figure 33). D'après les travaux de LEVENBOOK, qui travaillait sur une noctuelle voisine, le temps de diffusion utilisé (3 h) est largement suffisant. L'hypothèse de non absorption de l'inuline par les tissus n'a pas été testée ici mais semblait vérifiée par les résultats de LEVENBOOK. Enfin, les volumes calculés sont cohérents avec les résultats de ponctions totales, et leur sont toujours légèrement supérieurs.

1.3.2.2 Pression osmotique et pH : quelques mesures de pression osmotique ont été réalisées chez Spodoptera littoralis. L'amino-acidémie en étant une des principales composantes dans l'hémolymphe des insectes, nous avons trouvé utile de présenter aussi les valeurs plus complètes obtenues par MESTRES (1967) sur Galleria mellonella ; le pH de l'hémolymphe a aussi été étudié par cet auteur, et la figure 34 (a et b) montre les variations observées en fin de développement larvaire (les données sur Galleria sont reportées sur l'échelle de temps de S.littoralis pour comparaison ; la correspondance est effectuée grâce aux marqueurs de comportement).

1.3.3 Divers : les travaux d'ISHAAYA et NAVON de 1974 portent sur l'activité phénoloxydase de S.littoralis. Ayant trait au métabolisme de la tyrosine, nous avons jugé utile de porter ce résultat en figure 35. Il faut noter que cette activité O-diphénoloxydase est essentiellement cuticulaire, et que le pic d'activité du sixième stade, nettement plus important que les autres, a lieu pendant le "stade" prénymphe (l'activité dans une chysalide blanche étant significativement plus de deux fois plus faible).

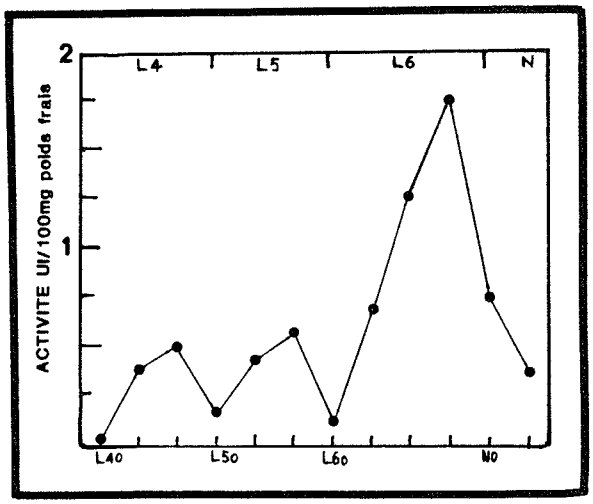


figure 35 : activité phénoloxydase cuticulaire pendant les trois derniers stades larvaires de S. littoralis (d'après ISHAAYA et NAVON, 1974)

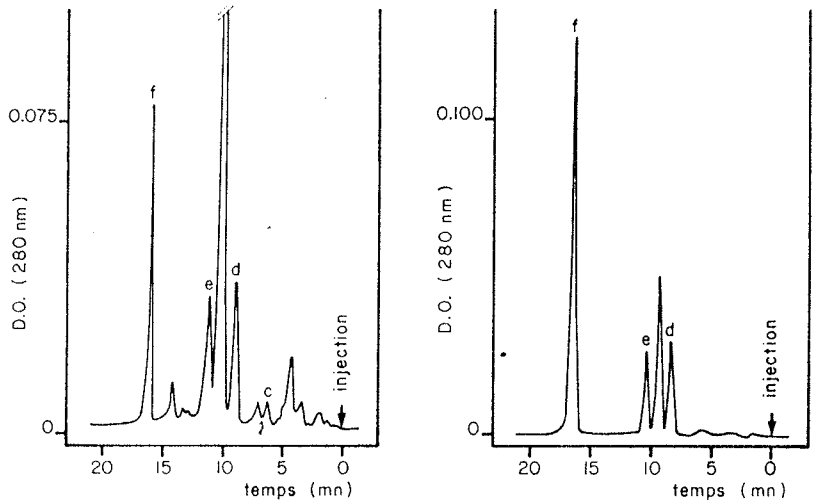


figure 36 : chromatogrammes HPLC de larves entières (a) et d'hémolymphe (b) de S. littoralis au stade L6 "c".
c : tryptophane d : tyrosine e : p amino phénylalanine f : B glucosyl tyrosine (entre d et e : pic d'acide urique)

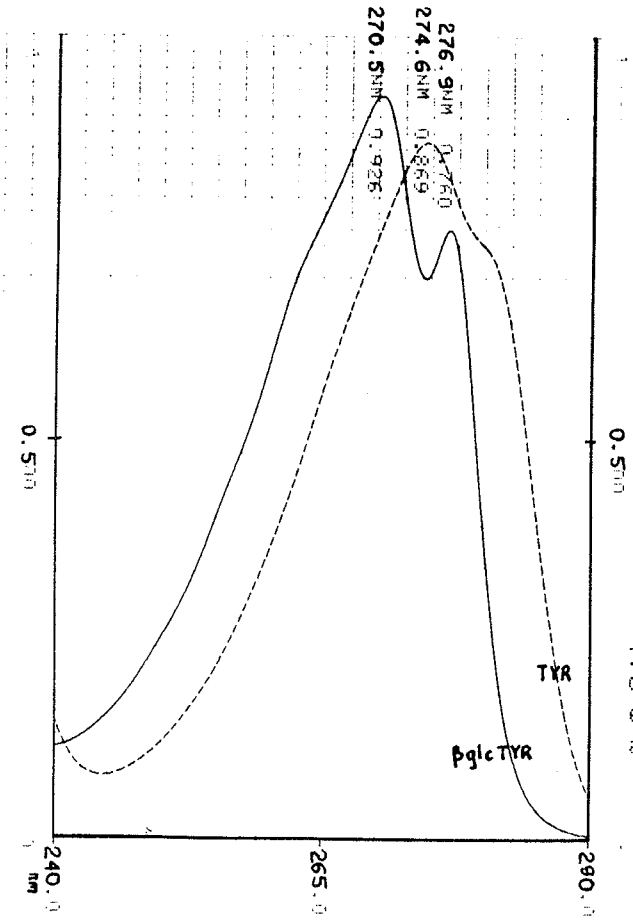


figure 37 : spectres dans l'U.V.proche du glucoside de tyrosine de synthèse et de la tyrosine (en solution aqueuse à pH neutre)

2. ACIDES AMINES ET PEPTIDES :

Ce compartiment étant l'objet principal de notre étude, notre démarche a été d'essayer d'identifier dans un premier temps les différentes formes de tyrosine présentes dans les tissus de S.littoralis, puis d'en quantifier la dynamique.

2.1. IDENTIFICATION DES PRINCIPALES FORMES DE TYROSINE DE PETIT POIDS MOLECULAIRE

Avant d'aller plus loin, précisons que nous désignons ici par "compartiment de petit poids moléculaire" l'ensemble des molécules qui ne sont pas précipitées par le TCA à 5 % (poids/volume). Il est clair que certaines protéines de petite taille peuvent ne pas être affectées par cette précipitation et seront comptabilisées comme peptides. Cependant, nos résultats de dosage des protéines de l'hémolymphe avec ou sans précipitation par le TCA (voir C.3.1.2) montrent que la majeure partie de ce qui est dosé comme protéine par la méthode de LOWRY-PETERSON, est précipitable par un mélange DOC-TCA. L'appellation de ce compartiment est donc sans trop d'équivoques.

2.1.1 La tyrosine libre : de la tyrosine libre a été identifiée à tous les stades et dans les différents tissus étudiés. L'identification est faite par co-chromatographie (en HPLC comme en autoanalyseur) avec de la tyrosine étalon. Des chromatogrammes HPLC "types" d'échantillons biologiques sont montrés en figure 36.

2.1.2 Le glucoside de tyrosine : identifiée récemment chez M.sexta (K.J. KRAMER et coll., 1980), cette molécule a été recherchée chez S. littoralis. Les chromatogrammes HPLC d'hémolymphe de larves en fin de développement présentaient un ou plusieurs pics supplémentaires (à 280 nm) par rapport à ceux de larves plus jeunes. Le principal et dernier de ces pics cochromatographiant avec du B-D- Glucopyranosyl-O-L-Tyrosine de synthèse, nous avons essayé d'isoler et de purifier ce composé. La méthode de séparation préparative a déjà été exposée (figure 20). Elle nous a permis d'obtenir environ 48 mg de cristaux à partir de quelques 50 g de larves de dernier stade. Le spectre U.V. du composé purifié est caractéristique et analogue à celui du glucoside de synthèse (figure 37). Les spectres I.R. et R.M.N. sont également identiques à ceux du produit synthétisé, de même que la température de décomposition des cristaux obtenus. Le tableau suivant compare quelques propriétés physico-chimiques du glucoside avec celles de la tyrosine.

	ESPECE	presence de BglcTYR	rapport molaire βglcTYR/TYR
1	Spodoptera littoralis	oui	5.5
2	Spodoptera frugiperda	oui	1.5
3	Sesamia nonagrioides	oui	3.2
6	Mamestra suaza	oui	6.7
7	Scotia segetum	oui	5.7
9	Mocis latipes	oui	5.5
10	Thaumetopoea pityocampa	oui	4.8
11	Ostrinia nubilalis	oui	3.4
12	Galleria mellonella	oui	14.7
16	Diatreae saccharalis	oui	21.6
17	Chilo suppressalis	oui	11.6
18	Chilo parteilus	oui	9.4
19	Chilo zacconius	oui	12.3
21	Aglais urticae	oui	11.7
22	Yponomeuta?	oui	2.0
23	Bombyx mori	non(?)	/
24	Philosamia cynthia	oui	4.3
25	Malacosoma neustria	oui	3.6
26	? ?	oui	0.4
27	Cossus cossus	oui	5.7

tableau 11 : détection de Bglc TYR par HPLC dans l'hémolymphe des différents Lépidoptères étudiés (voir annexe 8)

Propriété	TYR	BglcTYR
Poids moléculaire	181	343
point de décomposition	343°C	280°C
Max abs (UV proche)	275nm	271nm
Eabs (280nm) pH6	1150	1000
$[\alpha]_D^{20}$ H20	-10°	+249°
solubilité H20 pH7	2.5mM	60mM
pKa	2.20	2.28
t d'élution HPLC	8.6mn	17.4mn
t d'élution autoanal.	70mn	36mn

tableau 10: comparaison de quelques propriétés physico-chimiques de la tyrosine et de son glucoside.

La propriété physiologiquement la plus intéressante est la solubilité molaire, environ 24 fois plus importante pour le glucoside. Outre l'occupation de la position para du noyau aromatique (qui n'est cependant pas réalisée dans les formes de stockage de certains diptères: beta alanyl-tyrosine et gamma glutamyl-phenylalanine), cette substitution permet donc un stockage et une mobilisation en milieu aqueux bien plus importants que pour la tyrosine libre. Pour le dipeptide B alanyl-tyrosine, le substituant s'avèrait être aussi un constituant cuticulaire (LEVENBOOK et coll., 1969) ; dans notre cas, si le glucose peut très bien être utilisé dans la cuticule (N-acetylglucosamine de la chitine, par exemple), la réalité d'une telle incorporation reste totalement à prouver. Cela nécessiterait pour le moins que la B glucosyl tyrosine soit dégradée dans des structures tégumentaires ou cuticulaires, et cela ne semble pas le cas (voir C.4.2).

Nous avons voulu tester la généralité de ce système de stockage de la tyrosine chez les Lépidoptères. Pour cela, l'hémolymphe de larves de dernier stade en fin d'alimentation a été soumise à une perméation sur gel (B.3.3.1), et le pic des composés de petit poids moléculaire soumis à l'analyse HPLC. Toutes les espèces étudiées se sont avérées présenter un pic de temps de rétention égal à celui de Bglc-TYR, à l'exception de B. mori (tableau 11). Chez Bombyx, un pic d'importance analogue à celle du pic prévu de Bglc-TYR a été observé à un temps de rétention d'environ deux minutes inférieur à celui de ce dernier. Cette absence de Bglc-TYR serait en contradiction avec les travaux d'ISOBE et coll. (1981) chez ce même ver à soie, et détonne avec les résultats obtenus par ailleurs . Aucune explication satisfaisante ne peut être fournie sur cette observation, mais l'on peut malgré cela affirmer que les Lépidoptères semblent bien tous utiliser ce même moyen de stocker la

tyrosine, bien qu'à des degrés divers; la situation est donc ici différente de celle prévalant chez les Diptères.

2.1.3 Peptides contenant de la tyrosine : en comparant, sur les mêmes échantillons, les valeurs fournies par l'autoanalyseur sur la quantité de "tyrosine liée" (non libre) avec les valeurs fournies par HPLC sur la quantité de B Glucosyl Tyrosine, on peut en déduire le montant de tyrosine réellement peptidique :

	Concentration (nmoles/mg poids frais)							
	Temps (age dans L6 — v. tabl. 1)							
	a	b	c	d	e	f	g	N
A βglucosyl Tyrosine (HPLC)	0	8,3	18,9	20,9	20,3	16,4	18,4	3,1
B Tyrosine « peptidique » (analyseur)	0,5	8,7	20,5	23,5	29,5	21,2	25,2	3,4
Δ % (B-A/A × 100)	—	+ 4,8	+ 8,5	+ 12,4	+ 45,3	+ 29,3	+ 40,0	+ 9,7

tableau 12: évaluation de la quantité de tyrosine réellement peptidique au cours du dernier stade de S.littoralis.

Signalons d'abord que, par dosages de tyrosine en présence d'étalon interne (pNH2 PHE), les deux méthodes fournissent des résultats qui diffèrent rarement de plus de 5 %. Les écarts de 30 à 40 % constatés chez les prénymphes traduisent donc bien, à ce moment, la présence de peptides contenant de la tyrosine. Cependant, l'absence de pic supplémentaire important apparaissant à cette période sur les chromatogrammes HPLC laisse penser que nous ne sommes pas en présence d'une espèce peptidique unique, mais plutôt d'un pool hétérogène et non spécifique; il reste néanmoins quantitativement non négligeable. Nous ne pouvons cependant en dire plus sur la question en l'absence de données plus nombreuses.

2.1.4 Pics non identifiés : de nombreux pics (HPLC ; 280 nm), présents à différents moments sur les chromatogrammes de larves entières, n'ont pu être identifiés. Certains peuvent correspondre à des métabolites de la tyrosine du type pOH phenyl lactate ou acétate (voir fig. 19 a), mais sont de toute façon trop peu abondants et trop mal résolus pour être dosés. D'autres pics doivent sûrement représenter des composés nucléiques ou apparentés qui absorbent dans cette région de l'U.V. . De cette famille, le représentant de loin le plus abondant a été localisé en HPLC : c'est l'acide urique, que nous avons identifié par purification à partir de nos extraits. Nous n'aurions cependant pas pu le doser car notre protocole expérimental

Larves					Concentration (nmoles/mg de poids frais)		
âge			poids	état			
Temps (heures) après la mue		abrév.	moyen (mg)		TYR	βglcTYR	TRY
éclosion	− 12	ω	—		1,4	0	0,085
éclosion	+ 24	L1	0,11 ± 0,01	actives	1,3 ± 0,03	0	0,26 ± 0,03
1/2	+ 24	L2	1,69 ± 0,04	actives	5,95 ± 0,10	0	0,14 ± 0,02
2/3	+ 24	L3	6,92 ± 0,19	actives	5,2 ± 0,08	0	0,21 ± 0,01
3/4	+ 24	L4	25,4 ± 0,7	actives		0	0,10 ± 0,01
4/5	+ 12	L5a	88,7 ± 5,3	actives	3,2 ± 0,09	0	0,14 ± 0,00
4/5	+ 36	L5b	177 ± 5	actives	7,3 ± 1,4	0	0,27 ± 0,07
5/6	+ 24	L6a	295 ± 43	actives couleurs vives	3,9 ± 0,5	0,05 ± 0,03	0,07 ± 0,00
5/6	+ 51	L6b	482 ± 43	actives alimentation import.	2,3 ± 0,2	6,8 ± 0,8	0,05 ± 0,01
5/6	+ 78	L6c	417 ± 62	± actives couleurs ternes	4,3 ± 0,8	16,8 ± 1,5	0,13 ± 0,03
5/6	+ 86	L6d	377 ± 30	inactives en purge tête en rétraction	5,2 ± 0,7	16,9 ± 1,4	0,23 ± 0,04
5/6	+ 102	L6e	291 ± 34	immobiles ayant filé rétractées, annelées	6,3 ± 0,4	15,7 ± 1,5	0,32 ± 0,03
5/6	+ 112	L6f	279 ± 29	prénymphes sensibles	8,25 ± 0,6	15,6 ± 2,0	0,32 ± 0,04
5/6	+ 128	L6g	292 ± 18	prénymphes peu sensibles	9,3 ± 1,2	16,5 ± 1,0	0,27 ± 0,05
nymphose	+ 0	CB	300 ± 34	chrysalides blanches	7,5 ± 1,3	15,5 ± 0,9	0,27 ± 0,01
nymphose	+ 12	N	289 ± 36	chrysalides tannées	3,1 ± 0,6	7,6 ± 1,4	0,32 ± 0,04

Les moyennes sont effectuées sur n = 3 (ω — L4) ou n = 5(L5 — N) individus (ou groupes) et les temps sont déterminés à ± 3 h.

tableau 13 : évolution des concentrations en tyrosine, tryptophane et Bglc TYR au cours du développement larvaire de S. littoralis

débute par une étape en milieu acide très peu propice à son extraction quantitative.

Par ailleurs, en fin de dernier stade larvaire (temps f, g, N0), l'apparition de pics supplémentaires de temps de rétention juste inférieurs à celui de Bglc-TYR souligne éventuellement les transformations de la tyrosine à l'approche de la nymphose. Les travaux très récents de HOPKINS et coll. (1984) semblent impliquer des composés comme la B Glucosyl O-(N-B alanyl dopamine) dans les étapes ultimes pré-ecdysiales. Le comportement prévisible (?) de ce corps en HPLC le placerait en candidat pour l'explication de ces pics, par ailleurs pratiquement absents des analyses d'hémolymphe en début de stade . Ici encore, en l'absence de faits plus précis, nous ne pouvons nous avancer plus.

2.2 DOSAGE DE LA TYROSINE ET DE SON GLUCOSIDE AU COURS DU DEVELOPPEMENT

2.2.1 Concentrations :

2.2.1.1 Dans les tissus totaux : le tableau 13 montre l'évolution des concentrations de la tyrosine, de son glucoside et du tryptophane au cours du développement de *S. littoralis*. La principale remarque reste que le glucoside de tyrosine est une forme spécifique au dernier stade larvaire et à la nymphose. Nous n'avons pas poursuivi les dosages précis au delà du troisième jour après la nymphose, mais avons vérifié la présence de glucoside dans l'hémolymphe des chrysalides âgées (à un taux légèrement inférieur à celui des prénymphes), et son absence chez les adultes. Les travaux d'ISOBE et de ses collaborateurs sur les nymphes de *B. mori* (1981) montrent une accumulation hémolymphatique de "sucre A" qu'ils identifient à Bglc-TYR.

Pour la tyrosine libre, il faut noter qu'elle s'accumule jusqu'à des valeurs atteignant, pour les prénymphes, 9.3 nmol/mg. Cette concentration est largement au-dessus de la solubilité dans l'eau à pH neutre (2.5 nmol/mg) et suggère que ce facteur est sûrement limitant dans le contexte physiologique de la nymphose. A titre indicatif, les concentrations en tyrosine totale (protéines comprises) chez des holométaboles en fin de vie larvaire vont de 35 nmoles/mg (*Dacus oleae* ; MANOUKAS, 1972) à 100 (*Phryxe caudata* ; BONNOT et coll., 1976) ou même 115 nmoles/mg (*Sitophilus oryzae* ; WICKER et coll., 1984). Chez *S. littoralis*, on atteint 50 à 60 nmoles/mg en faisant la somme des différents compartiments étudiés. Le problème se pose donc dans les mêmes termes chez tous ces insectes.

Il est à noter que pour le tryptophane, on observe le même schéma évolutif que pour la tyrosine, avec une accumulation au cours de

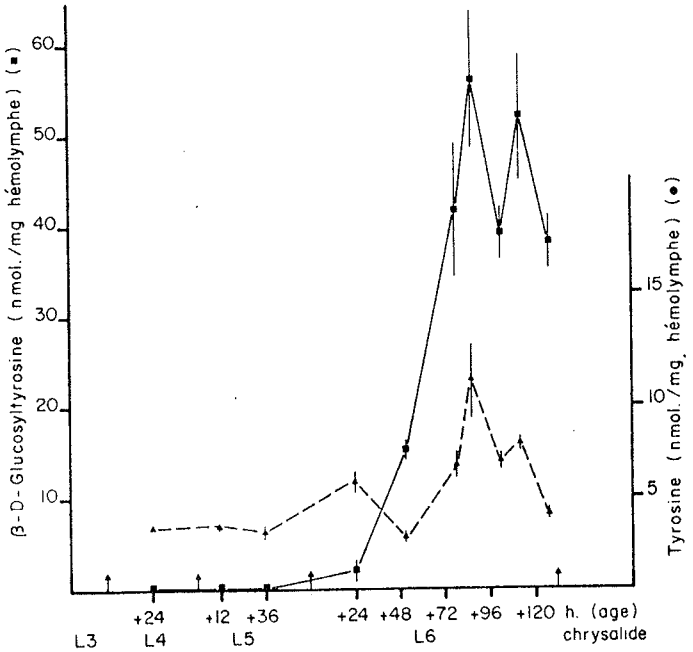


figure 38 : Concentrations en TYR et Bglc TYR dans l'hémolymphe de S.littoralis au cours des trois derniers stades larvaires

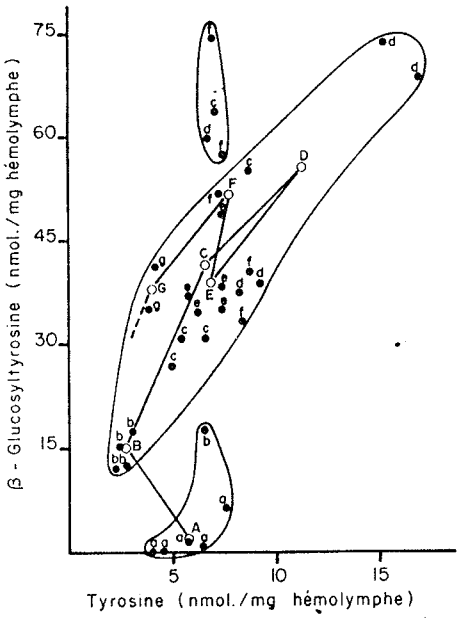


figure 39 : Corrélations des évolutions individuelles de TYR et Bglc TYR dans l'hémolymphe au cours du dernier stade larvaire (en majuscules figurent les points moyens pour chaque âge).

l'inter-mue et une utilisation ou une excrétion lors des mues larvaires. L'excrétion d'acide cynurénique, ou l'accumulation de pigments ommochromiques dans des structures spécialisées (tégument ou organes visuels) semblent en effet le principal devenir du tryptophane chez certains insectes, hormis son incorporation dans les protéines (L. migratoria ; BOUTHIER, 1984).

2.2.1.2 Dans l'hémolymphe : la figure 38 montre les variations de teneur hémolymphatique du glucoside et de la tyrosine pour les trois derniers stades larvaires. Les résultats sont les mêmes que précédemment, avec cependant des amplitudes de variation bien plus fortes ; Bglc-TYR est dans ce tissu accumulé à un taux près de six fois supérieur à celui de la tyrosine libre. L'interprétation des variations doit ici tenir grand compte des changements de volume du compartiment hémolymphatique (voir C.1.3.2.1 et le paragraphe suivant).

La figure 39 donne par ailleurs une idée du synchronisme des variations de TYR et Bglc-TYR dans l'hémolymphe (schéma de corrélation des deux formes surles données individuelles). Elle fait apparaître une bonne correspondance d'ensemble, excepté d'une part pour les points précédant la mise en place de la synthèse de Bglc-TYR, et de l'autre pour un petit groupe de points issus de périodes précédant les deux phases de dégradation du glucoside (voir plus loin).

Il faut aussi remarquer, tant pour le glucoside que pour la tyrosine, la chute très significative de concentration entre les âges d (+ 86 h) et e (+ 102 h). Etant donné que le volume hémolymphatique baisse aussi entre temps, on ne peut invoquer un effet de dilution. Pour la tyrosine, une explication pourrait résider dans une oxydation et/ou un transfert de compartiment tissulaire (vers les hémocytes qui sont précipités, le tissu adipeux ou plus probablement la cuticule). Rappelons que c'est à ce moment qu'apparaît le pic d'activté de la di-phénoloxydase cuticulaire (ISHAAYA et NAVON, 1974), et probablement aussi de la "tyrosinase" hémolymphatique. Pour le glucoside, l'oxydation semble peu probable mais une hydrolyse ou un transfert pourraient expliquer cette baisse. Nous en reparlerons plus loin.

2.2.2 Quantités :

2.2.2.1 Dans les animaux entiers : les résultats se trouvent en figure 40 et suscitent les remarques suivantes ;

- pendant la période d'alimentation, les intrants nets de tyrosine sont estimés par nos mesures nutritionnelles à 3.9 umoles/j et ceux de phénylalanine à 4.3 µmoles/j. La synthèse de Bglc-TYR consommant à elle seule plus de 3.5 µmoles de TYR/j, on voit que les autres besoins en tyrosine (synthèse des protéines, très active à cette période) devront être couverts à la fois par le stock protéique accumulé et par l'active conversion de phénylalanine en tyrosine. Notons ici que ni le bol alimentaire, ni les fécès ne contiennent de Bglc-TYR : cette forme

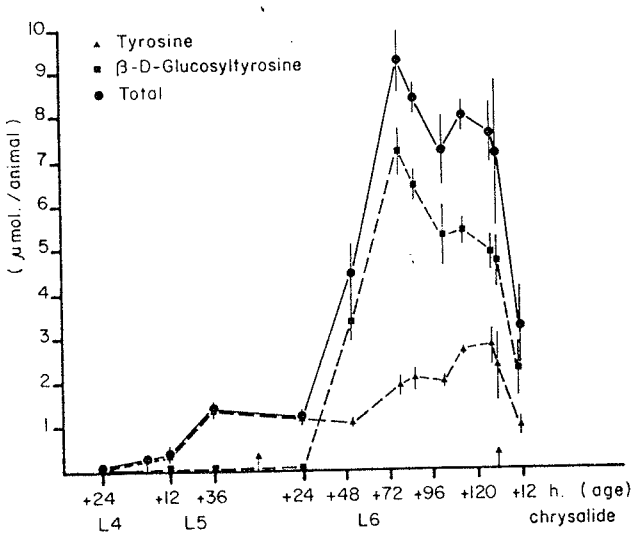


figure 40 : Quantités totales de tyrosine et de son glucoside par individu au cours des trois derniers stades larvaires de S.littoralis.

	ASX	THR	SER	GLX	PRO	GLY	ALA	VAL	MET	ILE	LEU	TYR	PHE	LYS	HIS	ARG	quantité par animal (µmol)
gl. séric.	9.1	4.7	5.1	11.6	-	11.3	10.1	8.3	-	4.8	9.1	3.5	3.5	10.9	2.7	5.6	2.2 (.08 TYR)
"soie"	15.4	3.1	8.9	11.7	3.7	17.1	11.9	3.2	-	2.8	3.7	1.9	1.1	6.9	4.2	4.5	?

tableau 14 : composition en acides aminés totaux (pourcentages molaires) des glandes sericigènes au stade "L6d" et des sécrétions totales ("soie") de S. littoralis au stade prénymphe (après la purge intestinale).

n'est donc pas excrétée.

- la dégradation du glucoside est assez précoce et présente deux phases : une dégradation assez légère entre les âges "c" et "e", et une chute drastique de la quantité à la nymphose.

- le compartiment tyrosine "total" (TYR + Bglc-TYR ; courbe haute de la figure 40) présente aussi ces mêmes phases. Si la seconde est évidemment liée aux transformations de l'ecdysis, la première doit être expliquée par un transfert à un autre compartiment (soit spatial, soit biochimique). La première hypothèse a été exclue par l'analyse du principal produit de secrétion durant cette période (tableau 14). Ni la quantité de soie secrétée, ni la teneur de cette soie en tyrosine ne peuvent expliquer ces pertes. La seconde hypothèse a déjà été évoquée précédemment avec l'oxydation de la tyrosine en dopa, et semble la plus probable.

2.2.2.2 Dans l'hémolymphe : une question importante est celle de la répartition tissulaire du glucoside. Les données que nous avons obtenues nous permettent d'appréhender la répartition entre l'hémolymphe et le reste des tissus au cours du dernier stade larvaire:

Age dans L6	b	c	d	e	f	g
Quantité calculée dans l'hémolymphe totale (concentrations x volume)	1.8	7.6	5.7	2.3	1.9	0.9
Quantité mesurée dans une larve entière	3.4	7.2	6.4	5.3	5.4	4.9

(en µmoles de B glucosyl tyrosine)

Ces résultats ne sont évidemment qu'indirects et portent sur des moyennes effectuées sur des animaux différents (ce qui explique la valeur plus forte pour l'hémolymphe totale que sur animaux entiers au temps "c"). La dissection et le dosage dans chacun des tissus auraient été beaucoup trop longs à réaliser ; cela a été cependant effectué sur M. sexta à un moment précis du dernier stade (fin d'alimentation - âge c) et donne la répartition suivante (AHMED et coll. 1983) :

hémolymphe : 97.7 ± 0.7 % tégument : 0.0 %
tissu adipeux : 2.0 ± 0.6 % intestin : 0.3 ± 0.2 %

Cette situation est cohérente avec la nôtre au même âge, puisque la quasi totalité du glucoside y est aussi présente dans l'hémolymphe. Cependant, cela ne permet pas de généraliser ce fait à tout le dernier stade. Il ressortirait plutôt de nos résultats que le glucoside synthétisé (ailleurs que dans l'hémolymphe ?) soit bien totalement déversé dans l'hémolymphe, mais ensuite éventuellement repris par d'autres tissus lors de la préparation de la nymphose. Cette interprétation est cependant à prendre avec toutes les précautions

Acide aminé (par groupes)		Concentration (ωmoles/animal) — Temps (age dans L6) a	b	c	d	e	f	g	N
G.A.B.A.	A	4,3	15,5	3,0	0,19	0	0	0	0
β Alanine		1,45	3,52	0,65	0,17	0	0,05	0,08	0,30
Cystathionine		0,27	1,28	0	0	0,05	0,04	0,05	0,08
Ornithine		0,13	1,02	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,08
Peptide **3** (4)		(0,25)	(1,00)	(0,33)	(0,31)	(0,18)	0	0	0
Glycine (1)	B	0,27	4,45	2,66	2,37	0,25	0,45	0,42	0,59
Thréonine (1)		0,55	1,68	1,34	0,71	0,51	0,58	0,30	0,42
Valine		0,46	1,57	1,02	0,85	0,42	0,51	0,31	0,57
Alanine		0,59	1,28	0,60	0,67	0,65	0,53	0,40	0,82
Leucine		0,46	1,15	0,69	0,98	0,25	0,46	0,17	0,44
Sérine (2)	C	1,59	6,62	8,31	8,92	0,95	2,88	1,25	2,52
Glycine (1)		0,27	4,45	2,66	2,37	0,25	0,45	0,42	0,59
Proline (1)		0	0,75	0,92	0,76	0,30	0,42	0,20	0,22
Isoleucine		0,14	0,41	0,40	0,46	0,21	0,27	0,18	0,35
Histidine	D	1,01	3,15	3,08	2,63	3,58	4,19	2,63	1,66
Tyrosine		0,61	1,07	2,07	1,45	1,85	2,36	1,88	0,79
Phénylalanine		0,16	0,18	0,44	0,40	0,32	0,35	0,20	0,10
Tryptophane (3)									
Arginine		0,66	1,47	1,15	1,07	1,01	1,63	1,11	1,37
Lysine		0,27	0,91	1,12	0,83	0,57	0,92	0,87	1,28
Ac. aspartique		0,07	0,12	0,08	0	0,19	0,08	0,08	0,12
Peptide **1** (4)		(0,52)	0	(0,77)	(0,44)	(0,72)	(0,87)	(1,00)	(0,66)
Peptide **2** (4)		(0,15)	(0,12)	(0,08)	(0,20)	(0,39)	(0,54)	(0,58)	(1,00)
Peptide **5** (4)		0	0	0	0	(0,49)	(0,54)	(1,00)	(0,77)
Peptide **6** (4)		0	0	0	0	(0,95)	(1,00)	0	(0,47)
Peptide **7** (4)		(0,65)	(1,00)	(0,54)	(0,53)	(0,39)	(0,35)	(0,78)	(0,38)

(1) GLY présente un profil intermédiaire entre les groupes 2 et 3.

(2) Le pic SER comporte un peptide (Peptide 4) et se trouve donc surestimé, notamment au temps « c » — 20 % environ.

(3) TRY présente le profil de ce groupe mais les valeurs ne proviennent pas de l'analyseur d'acides aminés (v. tabl. 1).

(4) « Peptides » ou composés « ninhydrine + » labiles à l'hydrolyse (v. texte) GLU et GlN ne peuvent être quantifiés directement par suite d'interférence avec βglcTYR.

tableau 15 : évolution des acides aminés libres dans les larves entières de stade 6.

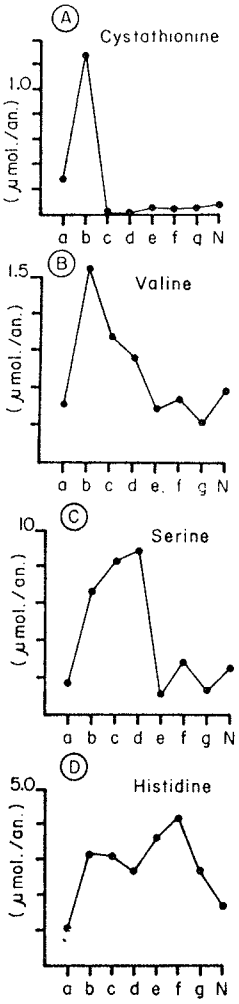


figure 41 : Profil type des quatre groupes principaux

liées au mode d'obtention des résultats.

2.3 EVOLUTION DE L'ENVIRONNEMENT EN ACIDES AMINES DANS LE DERNIER STADE LARVAIRE :

2.3.1 Acides aminés libres : pour situer les variations de la tyrosine dans un cadre plus général, des échantillons du sixième stade larvaire ont été analysés. Les acides aminés sont regroupés par comportement analogue au cours de cette période (tableau 15 et figure 41). Les pics non identifiés des chromatogrammes avant hydrolyse, et disparaissant après, ont été considérés comme peptides, numérotés par ordre de sortie, et évalués par rapport à leur concentration maximale notée 1 ; la B alanine et la phénylalanine sont assez mal séparées, et il peut en résulter quelques imprécisions. D'autre part, le peptide 4 ayant le même temps de rétention que la sérine, cette dernière est surévaluée (20% minimum en début de stade). GLU, GLN et ASN ne peuvent être évalués directement pour cause d'interférence avec Bglc-TYR.

Le groupe d'acides aminés comprenant GLY, THR, VAL, ALA et LEU constitue, avec les acides aminés diacides (GLU et ASP) et diaminés (LYS, ARG), l'essentiel de l'apport alimentaire (plus de 75 % - molaire). Les fortes concentrations au deuxième jour doivent donc correspondre à l'apport digestif maximal, et leur décroissance ultérieure à une utilisation non spécifique.

Un autre groupe d'acides aminés est lié à la période d'alimentation (G.A.B.A. ; B ALA...) ; présent presqu'uniquement au deuxième jour, il pourrait s'expliquer par un métabolisme actif des acides aminés digérés : transformations respectives de la méthionine et de l'arginine en cystathionine et ornithine, décarboxylation des acides aminés dicarboxyliques en β alanine et alpha amino butyrate. Leur turn-over très rapide les ferait disparaître dès la fin de l'alimentation.

Un troisième groupe, dominé par la sérine et la glycine, présente la caractéristique d'une très forte chute de concentration entre + 86 h et + 102 h, moment où se produit entre autres le filage d'une soie (peu abondante) et la constitution d'une case nymphale. Ce moment semble aussi coïncider avec un changement du catabolisme azoté, où s'installe une accumulation d'acide urique dans le corps adipeux (chez M. sexta ; BUCKNER et CALDWELL, 1980).

Parmi les acides aminés à profil d'accumulation de type tyrosine, on trouve la phénylalanine et le tryptophane. Le cas de l'histidine, dont la teneur augmente considérablement, peut s'interpréter comme une accumulation d'un acide aminé à très faible catabolisme (NAKAMURA et coll., 1977) et/ou comme un résidu basique, donneur de groupements NH2, incorporé dans les protéines cuticulaires (RICHARDS, 1978).

Acide aminé (par groupes)	Concentration (µmoles/animal) — Temps (age dans L6)							
	a	b	c	d	e	f	g	N
Ac. aspartique	0,42	**1,72**	0,45	0,57	0,64	0,71	0,74	**1,01**
Proline	0,28	**0,75**	0,20	0,22	0,18	0,24	0,18	**0,47**
Thréonine	0,06	**0,34**	0	0,12	0,09	0,01	0,06	**0,24**
Lysine	0,15	**0,86**	0,13	0,36	0,18	0	0,21	**0,47**
Alanine	0,09	**0,40**	0	0,15	0,03	0,05	0,14	**0,26**
Isoleucine	0,15	**0,33**	0,14	0,21	0,16	0,15	0,13	**0,26**
Leucine	0,24	**0,50**	0,12	0,28	0,10	0,08	0,09	**0,34**
Valine	0,09	**0,29**	0,14	**0,31**	0,19	0,19	0,20	**0,25**
Glycine	2,25	**4,90**	3,21	**5,67**	3,50	3,70	2,90	**4,98**
Arginine	0,23	0,36	**0,42**	0,27	**0,52**	0,38	0,56	**0,65**
Histidine	0,10	**0,46**	0,18	**0,72**	**0,84**	0,07	0,14	**0,34**
Tyrosine (1)	0,09	4,28	**9,30**	**9,03**	8,52	7,62	6,54	1,08
Phénylalanine	0,15	0,24	**1,05**	0,27	0,13	0,07	0,05	0,11
G.A.B.A.	**1,79**	**2,52**	0,81	0,06	0,17	0,21	0,18	0
β Alanine	**0,29**	**0,11**	0	0	0	0	0	0
Ac. Glutamique (2)	2,31	**7,07**	3,87	4,41	3,21	3,68	3,02	2,94

(1) Les valeurs de ce tableau sont obtenues par différence — après et avant hydrolyse —. La tyrosine « peptidique » comprend donc βglcTYR (v. tabl. 4).
(2) Somme des acides aminés libres et peptidiques (GLU et GLN).

tableau 16: évolution des acides aminés peptidiques dans les larves entières de stade 6.

Notons enfin que, d'un point de vue global, les variations de pression osmotique de l'hémolymphe vont dans le même sens que celles du volume, ce qui indique l'existence d'une régulation effective de la p.O. ; de plus le maximum de p.O. correspond au maximum de teneur en acides aminés libres dans les animaux entiers, suggérant le rôle osmorégulateur des acides aminés chez les Lépidoptères (SUTCLIFFE, 1963).

2.3.2 Acides aminés peptidiques : ils sont dosés par différence (après et avant hydrolyse) et sont aussi regroupés par analogies de profils (tableau 16). Les groupes sont cependant moins nets que pour les acides aminés libres, et la plupart d'entre eux montrent une concentration maximale au deuxième jour, ainsi qu'à la nymphose.

Quantitativement, on retrouve les principaux acides aminés signalés dans les peptides de diptères (GLY, GLU + GLN, ASP + ASN), lesquels sont considérés comme des formes de stockage non spécifiques des acides aminés hémolymphatiques régulés par des peptidases (COLLET, 1976).

Le G.A.B.A. peptidique est probablement dû à la décarboxylation d'acide glutamique peptidique, et il faut noter, en plus de Bglc-TYR, la présence en quantités non négligeables de tyrosine et de phénylalanine peptidiques. Par ailleurs, on remarque les acides aminés basiques arginine et histidine dans un groupe non lié à l'alimentation, peut-être analogue à ceux intervenant dans les dipeptides de diptères riches en histidine et en lysine (BODNARYK, 1978).

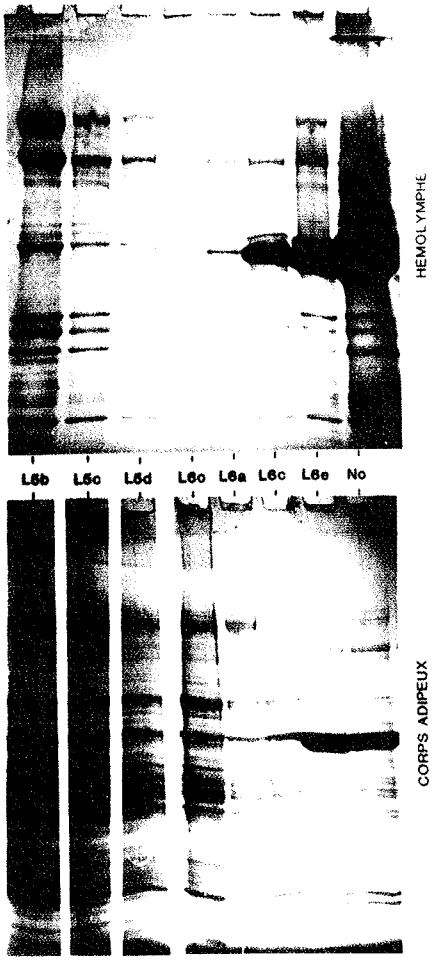


figure 42 : comparaison des profils protéiques de l'hémolymphe et du corps adipeux au cours des 2 derniers stades larvaires (électrophorèses sur gradient d'acrylamide 5 - 15 % en présence de SDS)

3. PROTEINES

3.1 IDENTIFICATION D'UNE PROTEINE DE STOCKAGE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES :

Les besoins nutritionnels de la nymphe et même du Lépidoptère adulte sont exclusivement ou majoritairement couverts par ce qui a été accumulé au cours de la vie larvaire. Or, le taux de tyrosine libre ou conjuguée (de faible P.M.), dans l'hémolymphe comme dans les tissus totaux, tombe après la nymphose à des niveaux extrêmement bas (moins de 2 nmoles/individu). Ces quantités semblent par exemple incapables d'assurer le déroulement normal de la mue imaginale, et doivent être doublées d'un stockage sous une forme que nous n'avons pas encore abordée jusque là : les protéines. Un certain nombre de protéines de l'hémolymphe des insectes les plus étudiés avaient été regroupées sous le terme général de protéines de stockage (L.S.P. - "larval storage proteins" - de la drosophile, S.P. de B. mori). Par la suite, les fonctions et propriétés de certaines d'entre elles ont été mieux cernées, et il semble s'avérer qu'une classe de protéines joue, par sa richesse en résidus aromatiques, un rôle particulier dans la gestion de ces acides aminés au cours du développement (S.J. KRAMER et coll., 1980 ; TELFER et coll., 1983 ; LEVENBOOK, 1983). Nous avons donc entrepris la recherche des formes protéiques de stockage de la tyrosine chez S. littoralis pour compléter les renseignements acquis sur les formes de petit poids moléculaire.

3.1.1 Mise en évidence :

3.1.1.1 Electrophorèses : cherchant une forme protéique de stockage à priori assez abondante, nous avons effectué des électrophorèses sur une période incluant une phase alimentaire intense et le début des transformations de la métamorphose. Nous avons choisi des gradients d'acrylamide (S.D.S. P.A.G.G.E.) pour une meilleure résolution dans une gamme étendue de P.M. . Les résultats de ces premières électrophorèses de protéines de l'hémolymphe et du tissu adipeux sont présentés en figure 42. Le trait marquant est l'accumulation dans l'hémolymphe de deux ou trois protéines (de poids moléculaires entre 75 et 90 KD). La plus petite, déjà faiblement présente dans l'hémolymphe au 5ème stade, s'y accumule dès le début du dernier stade, alors que la ou les plus lourdes n'apparaissent que chez la prénymphe. Dans le corps adipeux, on ne trouve par ailleurs en quantité que la plus petite de ces protéines ; assez faiblement représentée pendant les périodes d'alimentation (cinquième et début du sixième stade), elle s'accumule par contre fortement dans le corps gras

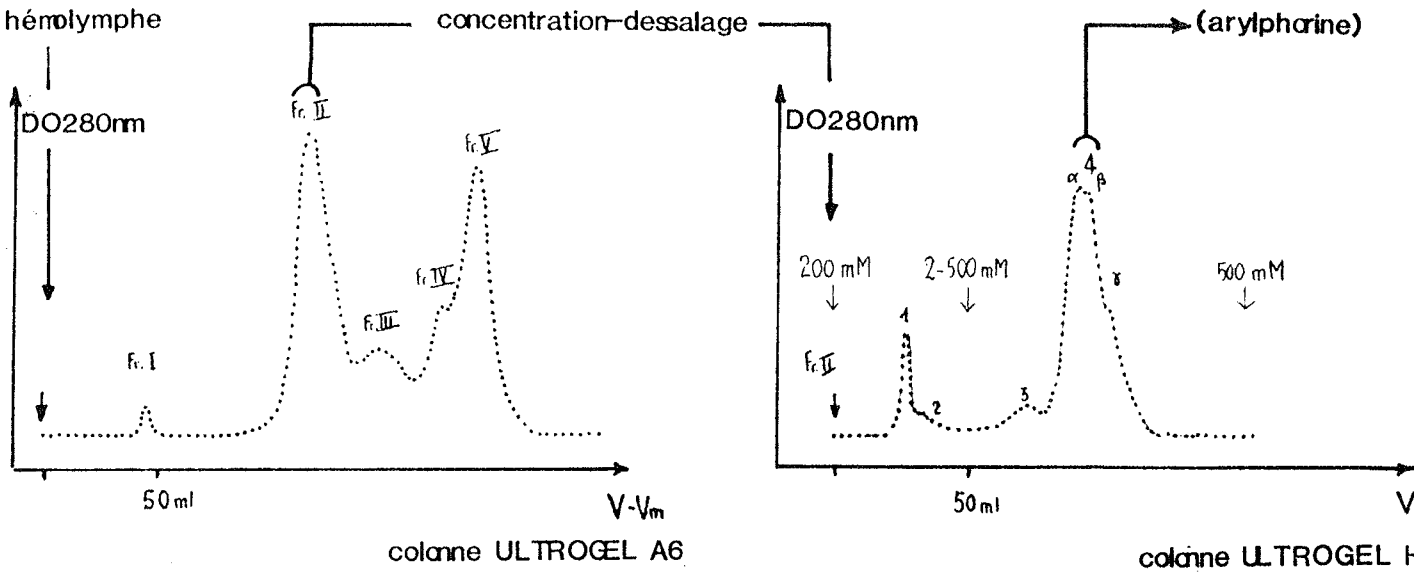


figure 43 : étapes de la purification de l'arylphorine de S. littoralis

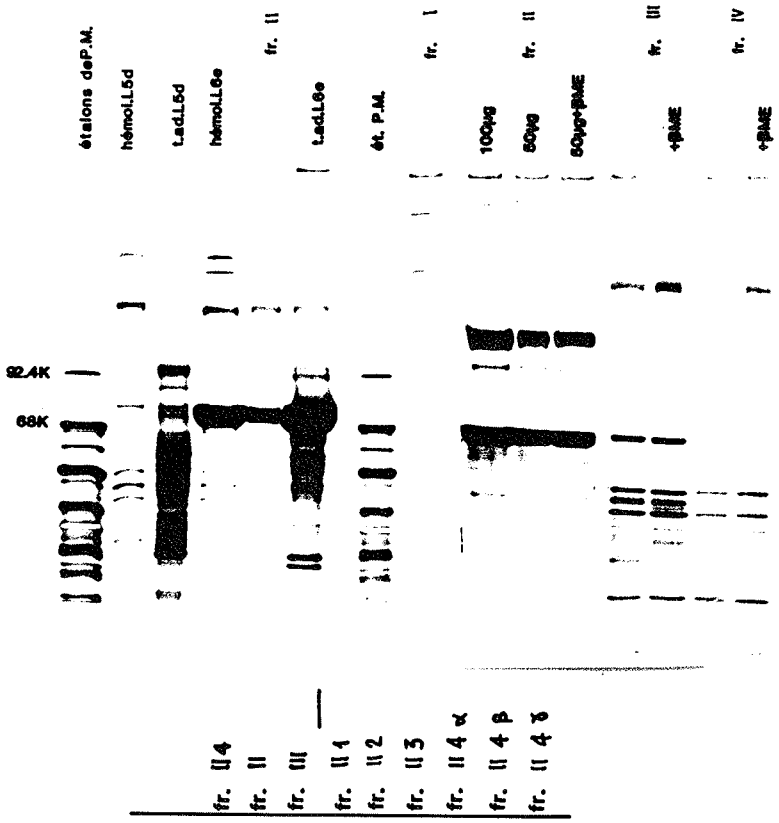


figure 44 : électrophorèses (en gradi d'acrylamide en présence de SDS), des protéines ou sortie de colonne de perméation sur gel (Ultrogel A6) ; comparaison avec des extraits bruts (hémol. = hémolymphe tad. = tissu adi et influence d'un réducteur des ponts disulfures (BME = B mercapto éthanol)

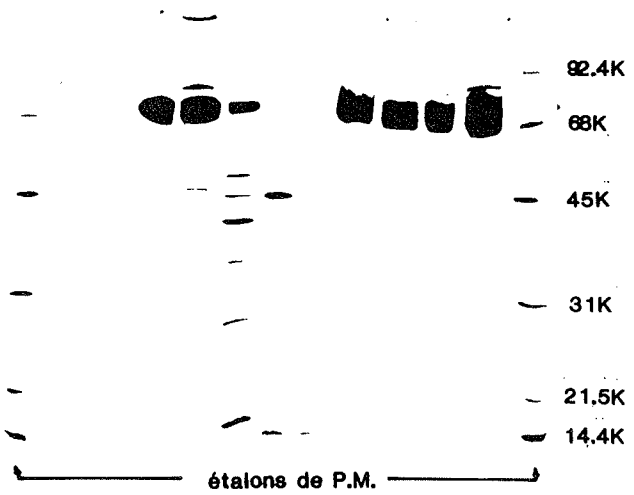


figure 45 : électrophorèses (en gel d'acrylamide à 10 % en présence de SDS), des protéines en sortie de colonne d'hydroxyapatite (ultrogel HA)

de la prénymphe et de la nymphe. Ce "comportement" correspond à celui d'une protéine de stockage, et nous avons essayé de purifier puis de mieux caractériser cette protéine.

3.1.1.2 Purification : cette protéine étant majoritaire dans l'hémolymphe de larves en fin d'alimentation (L6 c - c' ; voir figure 47 au § 3.1.2.2), nous sommes partis de ce matériel pour la purification. Le processus est illustré en figure 43. Le profil de perméation sur gel est comparable à celui de M. sexta et la congélation / décongélation de l'hémolymphe permet d'éliminer du pic II une fraction des lipoprotéines (S.J. KRAMER et coll., 1980), donnant en une étape une protéine relativement "propre" ; sa pureté électrophorétique varie en effet pour le pic II de 60 à 75 %. La figure 44 montre le profil de monomères protéiques des différents pics en sortie de perméation sur gel.

La deuxième étape de purification, sur colonne d'hydroxyapatite, permet de se débarasser d'une protéine (par ailleurs accompagnée d'une grande partie de la pigmentation verte de l'hémolymphe) éluée en pic 1 (figure 43). Les électrophorèses de cette seconde série de pics constituent la figure 45. La caractérisation de la protéine recherchée étant une forte teneur en résidus aromatiques, nous avons analysé les différents pics de nos chromatographies. Les résultats, exprimés en pourcentages molaires en résidus aromatiques, sont les suivants :

pic :	I	II	III	IV	...	II-1	II-3	II-4α	II-4 γ
% TYR:	4.3	9.4	3.9	4.9		5.4	5.8	10.4	11.4
% PHE:	3.1	7.4	4.5	3.5		5.0	5.2	7.5	8.4

Le pic II-4 s'avère donc bien contenir l'arylphorine de S. littoralis ; en électrophorèse dénaturante, la principale protéine de cette fraction (pure à plus de 90 % - figure 45) n'est jamais résolue en plus d'une bande de poids moléculaire estimé à 79-80 KD. La disparité de composition des différentes portions du pic 4 peut être attribuée soit à la fraction contaminante, soit à l'existence de deux protéines peu différentes (en composition et en poids moléculaire), légèrement séparées sur la colonne d'hydroxylapatite. Nous en rediscuterons plus loin.

3.2.2 Dosages en fin de vie larvaire

3.1.2.1 Protéines totales : le dosage des protéines totales de l'hémolymphe par la méthode de BRADFORD donne les résultats présentés en figure 46. Du point de vue technique, il faut noter ici que le dosage des protéines hémolymphatiques par la méthode de LOWRY-PETERSON ne donne de résultats fiables que si l'étape de précipitation par le mélange D.O.C.-T.C.A. est réalisée. Elle donne dans ce cas des valeurs tout à fait comparables à celles de la méthode de BRADFORD (moins de 5 % d'écart sur les mêmes échantillons). Le

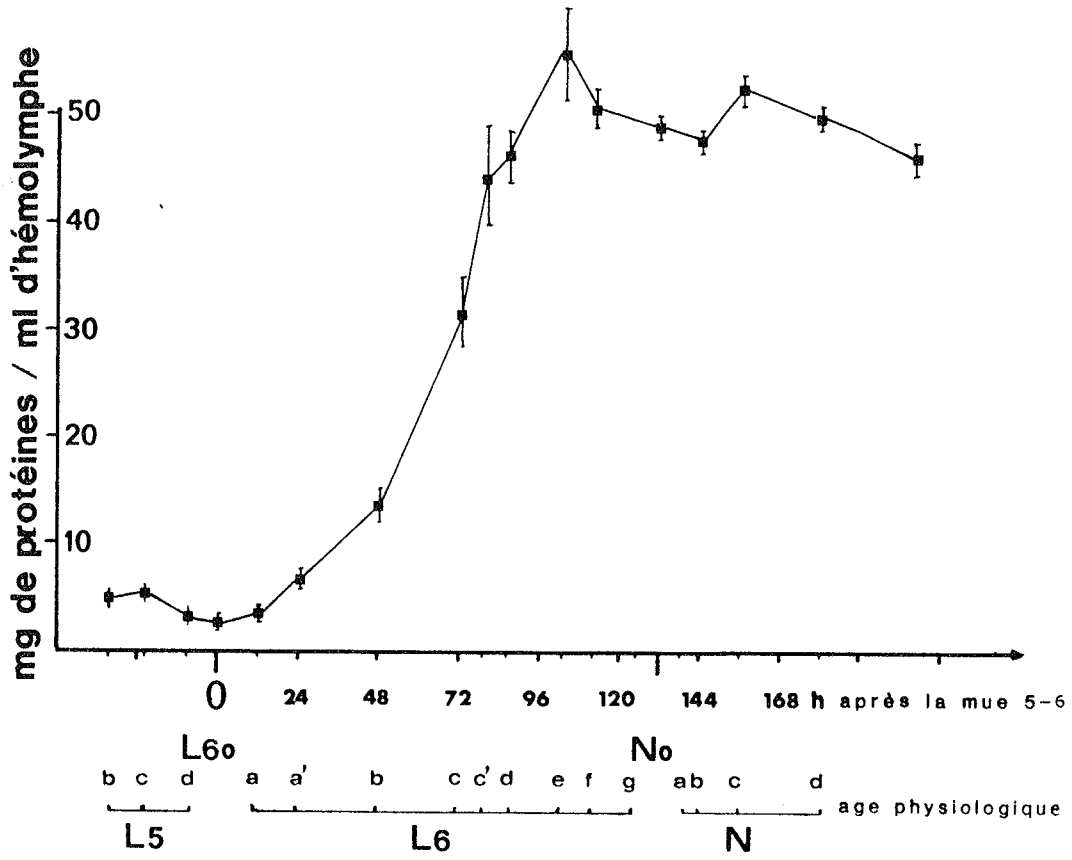


figure 46 : dosage des protéines hémolymphatiques totales de S. littoralis par la méthode de BRADFORD (n = 5).

tableau suivant rassemble les résultats de dosages sur les mêmes échantillons par la méthode de LOWRY-PETERSON complète ou non:

µg de prot. / µl d'hly	âge													
	L5			L6								N		
	b	c	d	0	a	a'	b	c	c'	d	e	0	b	c
$\bar{X}$ sans précip.	5.05	9.1	7.2	12.6	12.6	8.2	14.3	31.7	45.7	48.1	63.8	57.4	44.2	46.2
$\bar{X}$ avec précip.	5	5.2	2.9	2.6	3.5	6.2	13.7	31.1	44.9	46.8	54.9	49.3	44.7	46.1
différence (%)	1	43	60	79	72	24	4	2	2	2	14	14	/	0

tableau 17 : influence de la précipitation des protéines dans le dosage de "LOWRY-PETERSON" des protéines hémo lymphatiques de S. littoralis (n = 2).

On voit nettement qu'aux alentours des mues, des résultats aberrants sont obtenus si les protéines ne sont pas précipitées, indiquant des interférences notables de substances solubles avec la réaction colorée.

On assiste au cours du dernier stade à une accumulation très importante de protéines dans l'hémolymphe, qui renferme en fin de stade 6 environ 50 mg de protéines par ml, soit dix fois plus qu'en fin de stade 5. Si cette situation est tout à fait analogue à celle de M. sexta (58 mg/ml chez la prénymphe ; S.J. KRAMER et coll. 1980), elle diffère quantitativement de celle de G. mellonella qui en accumule à cet âge à des concentrations considérables (375 mg/ml ; MILLER et SILHACEK, 1982 a). La différence entre ces Lépidoptères provient probablement d'un volume relatif d'hémolymphe beaucoup plus réduit chez G. mellonella (apparemment plus près de 10 % de poids du corps que des presque 30 % chez S. littoralis au stade L6c) ; les conséquences de telles différences de concentration et de pression oncotique ne peuvent être négligeables et réflètent peut être des particularités physiologiques chez G. mellonella au niveau de l'osmorégulation (voir figure 34a); on peut logiquement invoquer ici comme explication les différences de teneur en eau des aliments de ces espèces.

Une dernière remarque concerne les quantités de protéines présentes dans l'hémolymphe totale d'un individu. Un calcul rapide nous montre que cette quantité est d'environ 180 µg par individu à l'âge L6a, passe à plus de 5 mg en fin d'alimentation et retombe à moins de 1,5 mg juste avant la nymphose. Nous n'avons effectué dans ce travail aucune recherche sur la biosynthèse, le turn over ou la séquestation des protéines hémolymphatiques, mais les résultats d'autres travaux sur les Lépidoptères (MILLER et SILHACEK, 1982 b ; J. LOCKE et coll., 1982) montrent que les protéines de stockage, dont pobablement les arylphorines, sont synthétisées dans le corps adipeux, exportées dans l'hémolymphe, puis en partie réincorporées dans le corps gras de la prénymphe.

3.1.2.2 Profils protéiques : les électrophorèses (S.D.S. P.A.G.G.E.) de protéines hémolymphatiques à différents âges

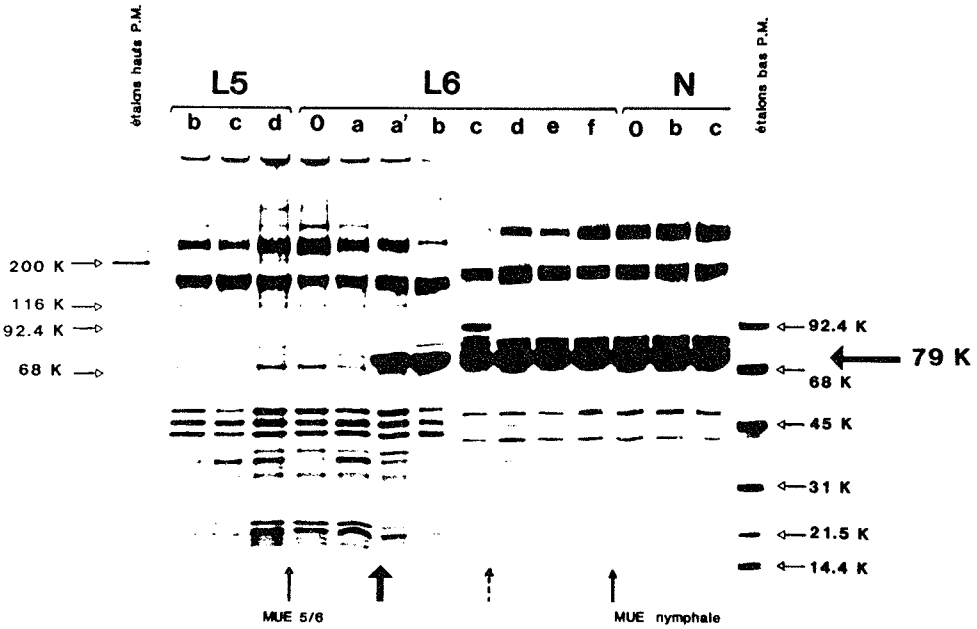


figure 47: évolution des profils protéiques de l'hémolymphe au cours du dernier stade larvaire de S.littoralis. Les flèches verticales indiquent le début de l'accumulation importante de l'arylphorine (79 kD) dans l'hémolymphe (↑) et dans le corps adipeux (⇡).

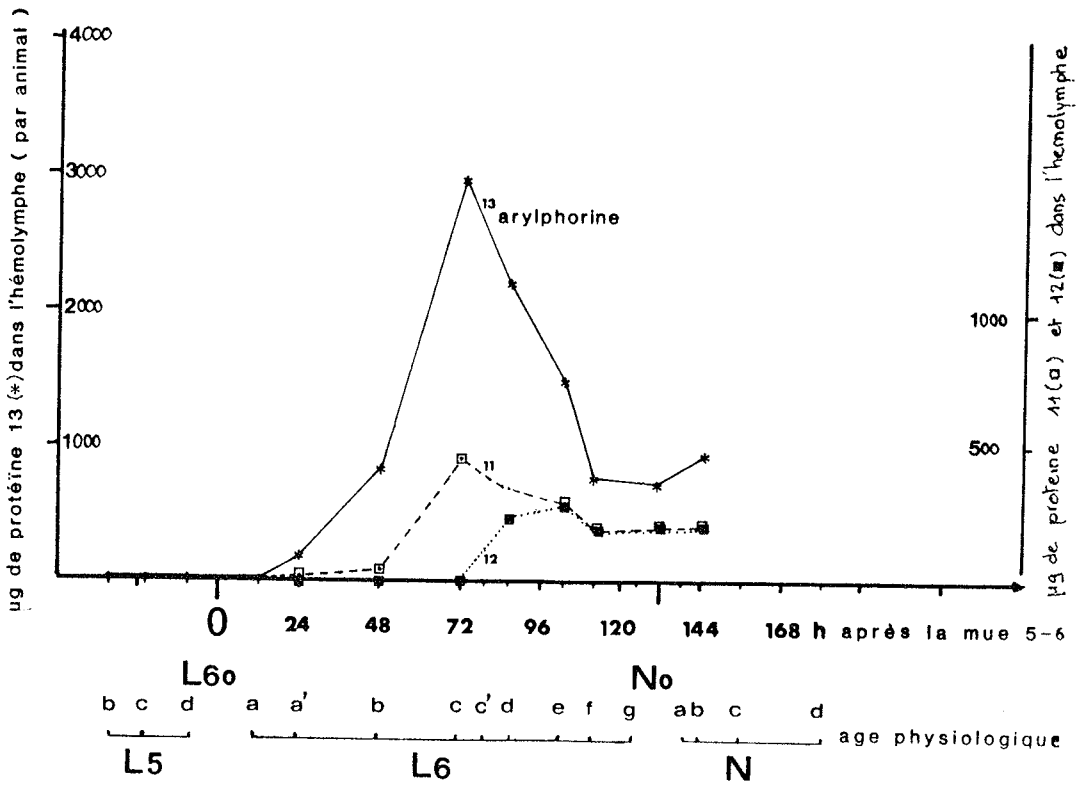


figure 48: évolution des quantités totales dans l'hémolymphe de trois protéines "de stockage" au cours du dernier stade larvaire. Les quantités sont estimées à l'aide de leurs concentrations dans l'hémolymphe (annexe 17) et du volume de ce dernier compartiment (v. figure 33).

dans le dernier stade (figure 47) ont été analysées par lecture et intégration des pics, et les profils quantifiés. Les principales protéines ont été repérées par numérotation de leur bande et estimation de leur poids moléculaire. Les résultats exhaustifs figurent en annexe 17 et comprennent le repérage des bandes (page 1 d'annexe 17) et les concentrations calculées de chacune des protéines (page 3 d'annexe 17). Nous n'en retiendrons ici que l'utile à notre propos.

La résolution, meilleure ici que sur les gels précédents (figure 42), confirme l'accumulation de 3 monomères différents dans la gamme 75 - 90 kD : l'arylphorine de S. littoralis, correspondant à la bande 13, ainsi que deux autres protéines apparaissant un peu plus tard dans l'hémolymphe (temps c et d), et correspondant aux bandes 11 (88.5 kD) et 12 (86 kD). Chez Calpodes ethlius (J. LOCKE et coll., 1982) comme chez G. mellonella (MILLER et SILHACEK, 1982), plusieurs de ces protéines sont réincorporées dans le corps gras ; notre observation de la figure 42, où seule l'arylphorine semble présente dans le tissu adipeux (d'où elle a été aussi isolée) serait à confirmer par un suivi plus fin au cours du temps. Toujours est-il que l'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une séquestration différentielle de certaines protéines de stockage. Par ailleurs, une différence de dynamique selon le sexe existe pour l'une d'entre elles chez B.mori. La protéine S.P.1 de Bombyx, qui n'est pas l'arylphorine, est spécifique de la femelle mais semblerait différente de la vitellogénine (TOJO et coll., 1980 ; KAWAGUSHI et DOIRA, 1973). Cependant, ce résultat n'est pas confirmé chez G. mellonella (MILLER et SILHACEK, 1982).

Nous voyons donc que, si tous les Lépidoptères et Diptères étudiés possèdent bien des protéines dites de stockage au comportement global homologue, des différences existent soit dans leur nombre, soit dans leur évolution, compliquant sérieusement une vision synthétique du problème. L'identification des homologies passe donc par l'étude, d'une part de caractères structuraux de chaque protéine (P.M., composition en acides aminés...), et d'autre part de leurs propriétés dynamiques (lieux de synthèse et d'utilisation, profil ontogénique...). Ce dernier aspect, étudié par des expériences de radiomarquage et de culture organotypique, permettrait en outre de faire le lien avec les déterminismes endocriniens des événements observés. Les travaux les plus avancés dans ce domaine sont ceux effectués sur les Diptères; ils font apparaître que la synthèse de l'arylphorine (D. melanogaster, L.S.P.1 beta) n'est pas stimulée par l'ecdystérone (LEPESANT et coll., 1982) contrairement à celle d'autres polypeptides de stockage (LSP2, LSP1 alpha et gamma). Par contre, la séquestration de protéines hémolymphatiques sous forme de granules dans le corps gras nymphal serait sous contrôle ecdystéroïdien (COLLINS, 1974).

La figure 48 représente l'évolution des quantités totales des protéines 11, 12 et 13 dans l'hémolymphe de S.littoralis. Elles sont

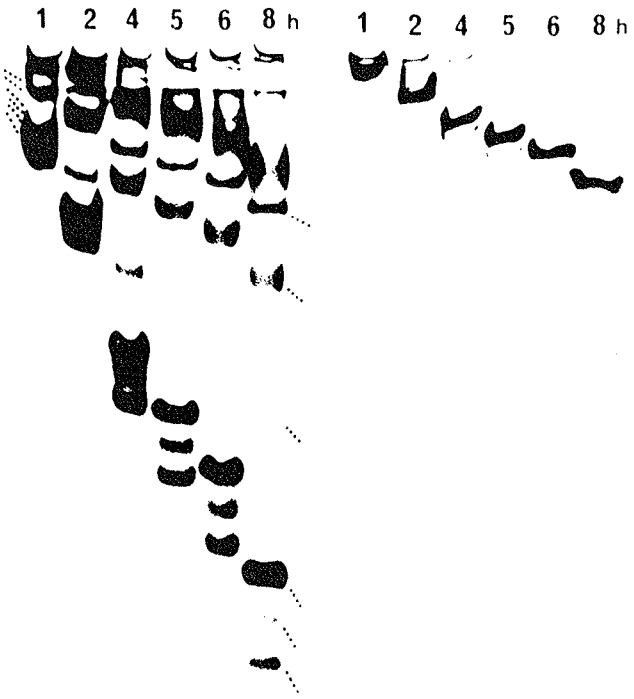
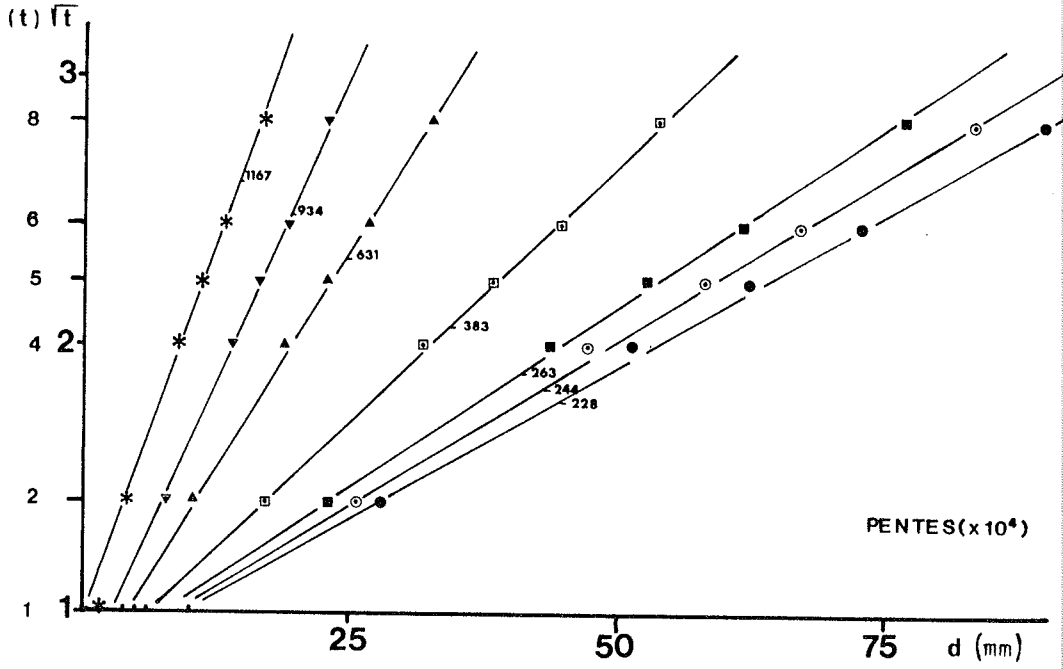


figure 49: electrophorèses en gradient d'acrylamide (5 à 10%; sans SDS) selon la méthode de LAMBIN et FINE (1979). Evolution de la distance de migration en fonction du temps d'électrophorèse, pour l'arylphorine et pour des étalons de poids moléculaires. (protéines natives: voir B.3.4.2).

figure 50a: relations linéaires liant la distance de migration à la racine carrée du temps d'électrophorèse . Le chiffre accompagnant chaque droite (arylphorine -*- ou autres protéines étalons) représente sa pente.



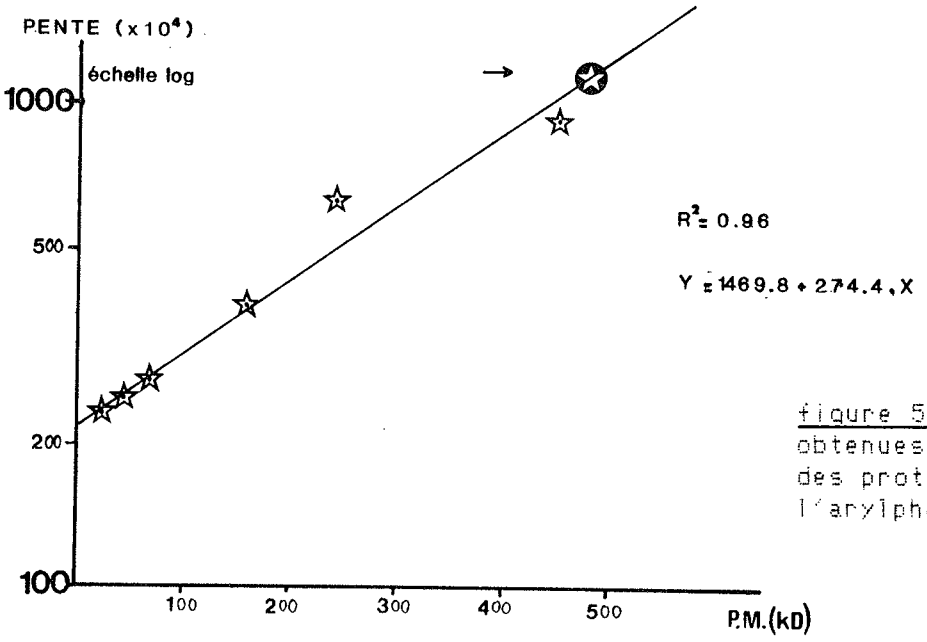


figure 50b: relation liant les pentes obtenues en "a" au poids moléculaire des protéines natives étudiées (dont l'arylphorine ✪).

calculées d'après les valeurs de la "page 3 d'annexe 17" et celles du volume d'hémolymphe dans le dernier stade (étant donné ce mode d'évaluation, l'unité utilisée - µg de protéine - est en fait assez approximative). La bande 13, pour autant qu'elle corresponde bien partout à la seule arylphorine, est bien largement majoritaire; après avoir atteint près de 3 mg dans l'hémolymphe, elle tombe à près de 4 fois moins dans la prénymphe au temps "f". En l'absence de changement notable des activités protéasiques de l'hémolymphe (APIZYM), l'hypothèse de la séquestration de l'arylphorine par le corps gras est la plus probable.

Pour ce qui est du reste des protéines plasmatiques apparaissant sur les gels de la figure 47, on peut dire brièvement que :

- les protéines les plus abondantes après celles de stockage sont d'assez haut poids moléculaire (bande 3 à 220 kD ; bandes 5 et 6 vers 150 - 160 kD). Elles sont présentes à tous les âges et pourraient être des glycoprotéines (bande 3) ou des constituants de lipoprotéines circulantes (de type HDL pour les bandes 5 et 6 au vu de leur élution en perméation sur gel).

- un bon nombre des protéines de petit P.M. ne sont plus visibles au stade 6. La baisse la plus flagrante est celle de la bande 17 de 46 kD environ, et il ne reste plus de protéines de moins de 30 kD que la bande 27 à 17.5 kD (nous en reparlerons plus loin).

- certaines protéines sont manifestement associées à des événements physiologiques assez brefs. C'est le cas des bandes 9 et 10 (101 et 94 kD) qui présentent un pic en fin d'alimentation (L6 c.d), ou des bandes 14 et 15 (70 et 52 kD) qui paraissent liées à la mue nymphale.

3.2 PROPRIETES DE L'ARYLPHORINE DE S. LITTORALIS

3.2.1 Poids moléculaire : l'arylphorine de *S. littoralis* semble être constituée d'un seul monomère de poids moléculaire estimé à 79 kD par électrophorèse sur gradient d'acrylamide ou sur gel à 10 % (en présence de SDS). La mesure du volume d'élution du pic II en perméation sur gel permet d'estimer le poids moléculaire de la protéine native à 500-550 kD.

Les électrophorèses en milieu non dénaturant selon le protocole de LAMBIN et FINE (1979) permettent de mieux préciser le poids moléculaire de la "spodoptérine" native purifiée (470 kD), et confirment sa nature héxamérique à pH neutre (figures 49 et 50). Elle ressemble en cela aux trois arylphorines de Lépidoptères déjà décrites ; elle se rapprocherait cependant plus du type de celle de *Hyalophora cecropia* (homohexamère, sous unités de 73 kD ; TELFER et coll., 1983) que des

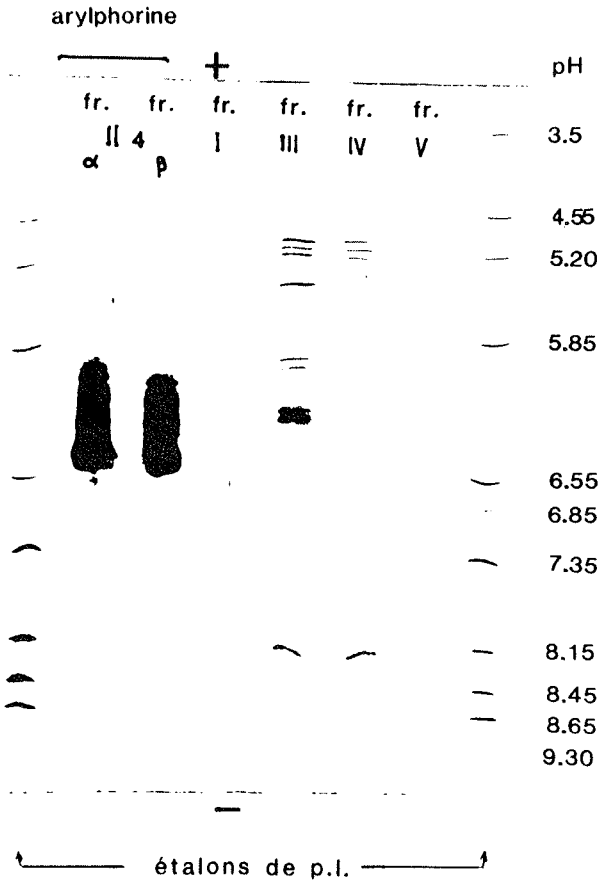


figure 51: electrofocalisation en milieu non dénaturant des fractions de sortie de colonne de perméation sur gel (ULTROGEL A6; v. fig.43) et de l'arylphorine purifiée.

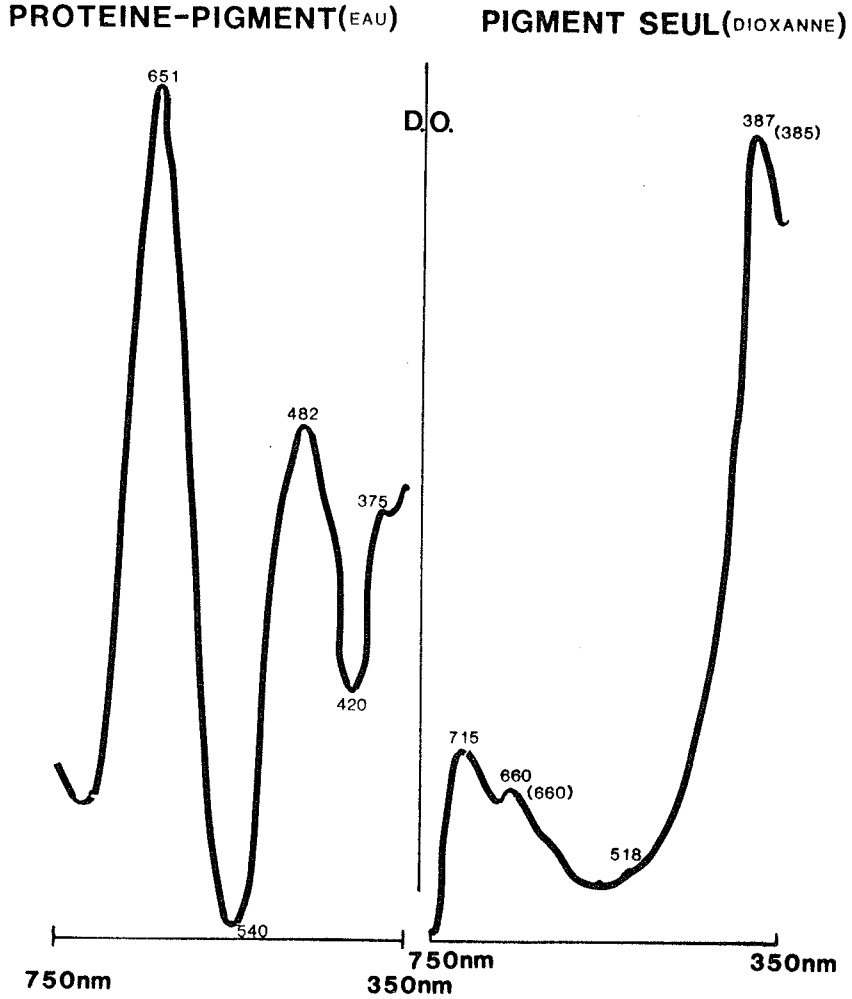


figure 52: Spectres d'absorption dans le visible de la protéine pigmentée et de son pigment isolé. Les chiffres entre parenthèses sont ceux fournis par CHOUSSY et coll. (1973) pour les maximas d'absorptions des pigments biliaires accompagnant les chromoprotéines bleues de la processionnaire du pin.

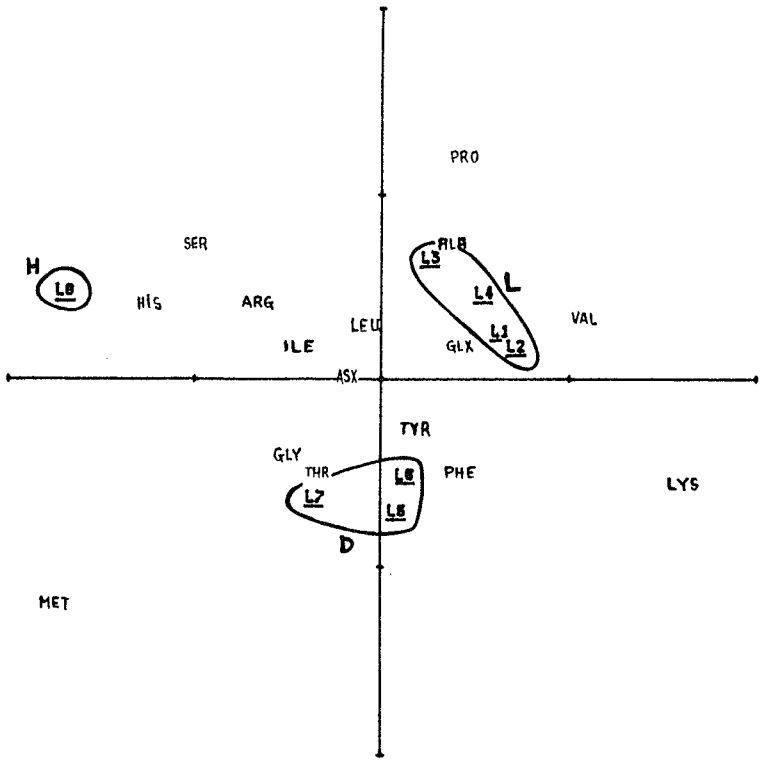
hétérohexamères de B. mori (83-89 kD) et M. sexta (87-92 kD).

Des isoélectrofocalisations d'arylphorine purifiée de S. littoralis ont été effectuées en milieu non dénaturant (figure 51), comme en présence d'urée. Dans les deux cas, aucune bande nettement focalisée n'a été obtenue; le p.I. de la zone colorée se situe entre 6 et 6.5 pour le gel sans urée, et entre 5.2 et 5.4 pour l'autre. Ces résultats suggèrent l'existence soit de modifications post-traductionnelles non spécifiques du polypeptide d'arylphorine, soit des artéfacts de dégradation au cours de la purification. Cette dernière hypothèse ne doit cependant pas être retenue car de l'hémolymphe fraîche de S. littoralis (et de B. mori - CALVEZ, communication personnelle) produit des résultats analogues dans cette zone de pH.

3.2.2 Pigment associé : l'hémolymphe de S. littoralis est progressivement colorée en vert lors des intermues. Or, lors de la perméation sur gel, la fraction verte se sépare des autres chromoprotéines (jaunes) et se retrouve totalement dans le pic II contenant l'arylphorine. Par contre, la deuxième étape de purification sépare la majeure partie de la coloration verte de l'arylphorine qui élue dans le dernier pic (elle garde cependant une très légère teinte verte en solution). Cette fraction verte se trouve être accompagnée de deux protéines de faible poids moléculaire (pic 1-ou II 1-de la figure 43). L'un ou l'autre de ces polypeptides (ou les deux) doit constituer ce que LAMY a décrit comme "chromoprotéines vertes" dans l'hémolymphe de la processionnaire du pin, Thaumetopoea pityocampa. Les poids moléculaires de ces protéines sont d'environ 15 et 45 kD et devraient correspondre aux bandes numérotées 27 et 17. Notons que chez M. sexta, une chromoprotéine bleue a été isolée et purifiée (insecticyanine, CHERBAS, 1973) ; trimère de sous-unités de 23 kD, elle serait associée, comme les protéines décrites par LAMY, à un pigment de type biliaire.

Nous avons réalisé le spectre d'absorption dans le visible en milieu aqueux de cette protéine pigmentée (figure 52) qui pourrait bien être l'homologue de l'insecticyanine de Manduca. Un fait intéressant est qu'elle est transportée dans l'hémolymphe soit en complexe avec l'arylphorine, soit sous une autre forme (multimère, lipoprotéine) de poids moléculaire voisin de 500 kD; on ne la retrouverait en effet pas dans cette zone de P.M. si cela n'était pas le cas.

3.2.3 Composition en acides aminés : la composition en acides aminés est montrée dans le tableau 18. La cystéine et le tryptophane, partiellement détruits par nos conditions d'hydrolyse, n'ont pas été dosés.



PLAN FACTORIEL 1-2
contenant 77% de l'inertie totale

figure 53a: Analyse factorielle des correspondances.
Projections sur le premier plan factoriel des acides aminés et des huit insectes étudiés:

L1= Spodoptera littoralis	L2= Bombyx mori	
L3= Hyalophora cecropia	L4= Manduca sexta	Lépidoptères
L5= Calliphora erythrocephala	L6= Calliphora vicina	
L7= Drosophila melanogaster		Diptères
L8= Apis mellifera		Hyménoptère

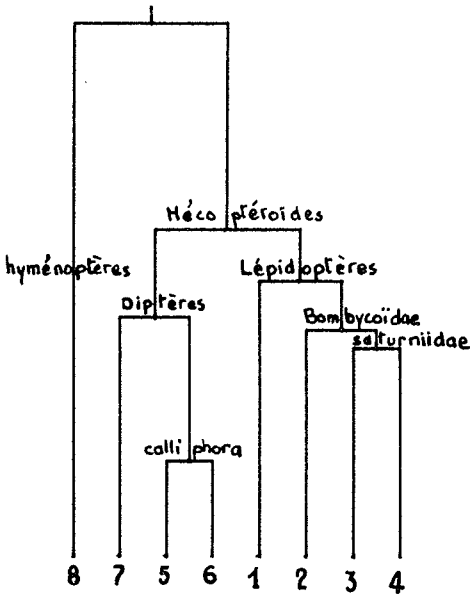


figure 53b: Classification hiérarchique ascendante sur les mêmes données qu'en "a"; comparaison avec la classification taxinomique.

ASX	THR	SER	GLX	PRO	GLY	ALA	VAL	MET	ILE	LEU	TYR	PHE	LYS	HIS	ARG
10.9	2.1	3.8	12.1	3.9	4.5	5.2	7.3	2.1	3.6	8.9	11.4	8.4	8.5	3.2	4.1

tableau 18: Composition en acides aminés de l'arylphorine purifiée de S.littoralis .

Pour comparaison avec les arylphorines décrites par ailleurs, nous avons réalisé une analyse des correspondances, ainsi qu'une classification hiérarchique sur les compositions molaires en acides aminés (l'intégralité des valeurs est donnée en annexe 18).

Les résultats de ces analyses se présentent sous la forme d'une projection sur le premier plan factoriel (figure 53a) et d'un arbre hiérarchique regroupant les différents insectes (figure 53b).

S'il apparait bien que les teneurs en TYR et PHE sont un point commun entre ces protéines (positions assez centrales dans le plan factoriel), certains acides aminés contribuent à la constitution de groupes distincts:

- C'est le cas du triplet SER, HIS / LYS qui différencie bien les hyménoptères des deux autres groupes (valeurs élevées en sérine et en histidine et très faibles en lysine).

- Une situation analogue lie le triplet PRO, VAL / MET à la séparation des lépidoptères du reste du nuage.

Les résultats de la classification automatique de la figure 53b font apparaître des regroupements respectant tout à fait la classification taxinomique. Ce n'est pas à priori un résultat trivial, car les mécanismes évolutifs agissant au niveau des séquences nucléotidiques pourraient bien être masqués à la seule observation de cette résultante qu'est la composition en acides aminés. Les conclusions de telles analyses ne permettent cependant pas d'aller aussi loin que les comparaisons de séquences d'acides aminés (autorisant l'établissement plus direct des parentés).

Signalons que le type de protéines choisi devrait logiquement être le plus adapté à ce genre d'analyse. En effet, le haut poids moléculaire peut être considéré comme un "tampon" à des variations "intempestives" de composition (cas des peptides et petites protéines dont la composition en acides aminés est très sensible à un petit nombre de mutations).

D'autre part, le caractère de protéine de stockage, aux propriétés fonctionnelles à priori moins strictement définies que pour des molécules enzymatiques, doit conférer une plus grande sensibilité à la varabilité évolutive; qui plus est, s'il existe une pression de sélection sur un tel type de protéines, il parait logique qu'elle s'exerce en partie sur leur composition en acides aminés.

Cependant, nous verrons par l'exemple traité un peu plus loin (C

3.3) que les résultats ne sont pas aussi probants lorsqu'on s'attache à un niveau d'observation taxinomique plus fin (en deçà de l'ordre des lépidoptères par exemple).

3.2.4 Propriétés diverses: Divers calculs nous permettent de préciser quelques propriétés de l'arylphorine de S.littoralis : Une molécule héxamérique (470 KD environ) contient près de 450 résidus de tyrosine ; un microgramme de protéine transporte 0.94 nmole de tyrosine, et la "spodoptérine" peut totaliser jusqu'à 3 µmoles de tyrosine par animal (à comparer avec les 6 µmoles par animal du glucoside de tyrosine). Cette valeur est donc loin d'être négligeable, et pose le problème de la solubilité d'une protéine aussi riche en acides aminés aromatiques. Plusieurs hypothèses sont envisageables, dont celle d'un masquage à l'intérieur de la protéine d'une grande partie des résidus aromatiques peu favorables à la solubilité; les protéines cuticulaires riches en tyrosine, qui sont très peu solubles, possèdent par exemple tous leurs groupements tyrosyl accessibles (HACKMANN et GOLDBERG, 1979). Une autre possibilité est celle d'une modification post-traductionnelle par greffage de groupements hydrophiles. Les arylphorines de M.sexta et de H.cecropia portent en effet des résidus mannose et N-acetyl glucosamine. Nulle mention n'est par contre faite de la possibilité de phosphorylation des résidus tyrosine, mais cela pourrait être le cas et expliquer les profils d'isoélectrofocalisation obtenus.

Quant aux lipides, certains auteurs (S.J. KRAMER et coll.; 1980) en signalent l'association à hauteur de 2% avec l'arylphorine native. Différentes classes sont identifiées (phospholipides, cholestérol, diglycérides), mais l'hypothèse d'une contamination n'est pas vraiment exclue. Seule une étude des propriétés d'association intrinsèques de l'arylphorine purifiée avec les lipides pourra lever ce doute. Par ailleurs cependant, des travaux récents font état d'un transport d'ecdystéroides par la calliphorine (ENDERLE et coll.; 1983); un tel faisceau d'arguments, auquel on peut rajouter l'association éventuelle avec une insecticyanine et son pigment, plaide en faveur d'une structure supramoléculaire de type lipoprotéine, toutefois très riche en protéines (V.H.D.L.).

3.3 PROTEINES DE STOCKAGE ET METAMORPHOSE : LES ARYLPHORINES DE LEPIDOPTERES.

La même analyse que précedemment a été conduite sur des protéines que nous avons purifié à partir d'hémolymphe de chenilles de Lépidoptères en fin d'alimentation. Faute de temps et à la suite d'ennuis techniques (détéroration des performances de la colonne d'hydroxyapatite après un certain nombre de passages),nous n'avons pû pousser la purification aussi loin que pour l'arylphorine de S. Littoralis. Nous avons néanmoins obtenu des fractions correspondant au pic II (perméation sur gel, voir figure 43) chez tous les lépidoptères

étudiés. Le volume d'élution correspondant toujours à des poids moléculaires de 400 à 500 kD, et les compositions en acides aminés étant assez comparables (avec des taux élevés de tyrosine - entre 7.5 et 10.5 %, voir annexe 19), nous pouvons affirmer qu'il s'agit bien des arylphorines de ces Lépidoptères. Evidemment, leur taux de pureté n'ayant pas été controlé, nous ne pourrons discuter les résultats sans tenir compte de cette incertitude.

Etant donné l'absence de structure facilement interprétable et la complexité des graphiques obtenus, nous avons préféré consigner tous ces résultats en annexe 19. Nous ne retiendrons ici que les principales conclusions:

- Une vision d'ensemble des résultats bruts de composition en acides aminés (page 1 d'annexe 19) montre que nous avons affaire à des protéines à priori très semblables (profils complets tout à fait analogues).

- L'allure de l'arbre de classification obtenu (page 2 d'annexe 19) indique une mauvaise qualité d' agrégation (les premiers regroupements se font assez "haut", indiquant l'absence de groupes "serrés" et significatifs).

- Contrairement à l'exemple précédent, la tyrosine et la phénylalanine participent à l'étalement du nuage et ne constituent pas un véritable point commun (relativement). La tyrosine est même l'acide aminé ayant la meilleure contribution à la formation du deuxième axe factoriel.

En résumé, nous pouvons dire que l'information contenue dans le tableau des compositions en acides aminés est distribuée de façon assez aléatoire et ne fait pas ressortir de groupements forts et significatifs.

Nous pouvons citer deux raisons à cet état de fait:

D'une part la purification insuffisante introduit vraisemblablement un "bruit parasite" nuisible à une bonne interprétation de l'information;

D'autre part la nature même de la protéine peut la rendre inapte à être un bon outil de discrimination au niveau d'analyse où nous nous situons ici (information intrinsèque insuffisante pour une analyse à un niveau taxinomique correspondant aux familles).

Les résultats que nous avons exposé mettent en tout cas l'accent sur la nécessité d'accorder le plus grand soin au choix de l'outil d'analyse pour un but donné (l'outil étant ici le couple "analyse des correspondances / arylphorine de pureté donnée).

4. ENZYMOLOGIE - ENDOCRINOLOGIE - MARQUAGE :

4.1 ACTIVITE B GLUCOSYL-TYROSINE SYNTHETASE :

Aucune des incubations effectuées sur homogénats de tubes digestifs ou de corps adipeux n'a permis de révéler une telle activité. Avec la tyrosine (resp. 1-Naphtol) comme substrat, aucune détection sans équivoque de Bglc TYR (resp. 1-Naphtyl glucoside) n'a été possible par HPLC ; il faut préciser que l'incubation d'UDPG avec des extraits tissulaires entraîne l'apparition de nombreux pics importants en HPLC, perturbant ainsi le chromatogramme. Beaucoup de produits de dégradation de l'UDPG sont en effet séparés dans notre système HPLC et absorbent à 280 nm. De très faibles quantités de Bglc TYR ont éventuellement pu être synthétisées mais ne sont pas identifiables par notre protocole expérimental (l'utilisation de 14C tyrosine aurait par exemple pû lever ce doute). Une explication pourrait être que l'activité recherchée soit localisée dans d'autres tissus (hémocytes...). Pourtant, chez la blatte, le corps adipeux contient la quasi-totalité d'une activité UDPG - phénol (/catéchol) glucose transférase ; elle est localisée dans une fraction centrifugeable de l'homogénat et son rôle y est de synthétiser le B glucoside de l'acide protocatéchuïque transporté alors vers les glandes collétérales (TAKAHASHI ; 1971 - méthode au 14C-UDPG). Nos résultats négatifs pourraient aussi s'expliquer par une inactivation de l'enzyme recherchée (excès d'UDPG ?, enzyme membranaire fragile ?).

Dans le but de mieux conserver l'intégrité cellulaire, nous avons aussi procédé à des incubations sur tubes digestifs intacts (figure 24 a et b). L'incubation "en sac" (24 a) n'a pas permis non plus de révéler de synthèse et de transfert de Bglc TYR (du compartiment luminal au compartiment extérieur - in vivo = hémolymphe -). Des problèmes techniques de dimensions de la verrerie nous ont par ailleurs contraints à abandonner l'expérience de perfusion (24 b).

En conclusion, nous pensons que l'activité glucosyl-transférase doit pouvoir être identifiée dans des tissus de S. littoralis, mais que la sensibilité de détection doit être accrue (radiomarquage) et les conditions d'homogénéisation et d'incubation mieux définies.

4.2 ACTIVITE B GLUCOSYL TYROSINE HYDROLASE :

4.2.1 Analyses enzymatiques rapides : des plaquettes APIZYM permettant la détection qualitative de nombreuses activités ont été utilisées pour détecter la présence de B glucosidase (voir annexe

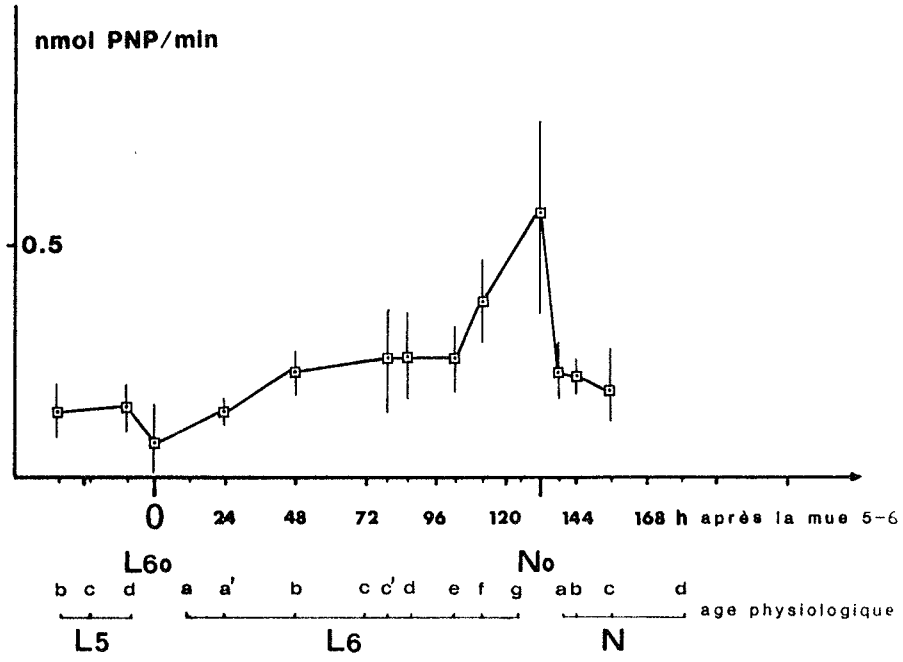


figure 54a: évolution de l'activité "B glucosidase" dans l'hémolymphe (n=5).

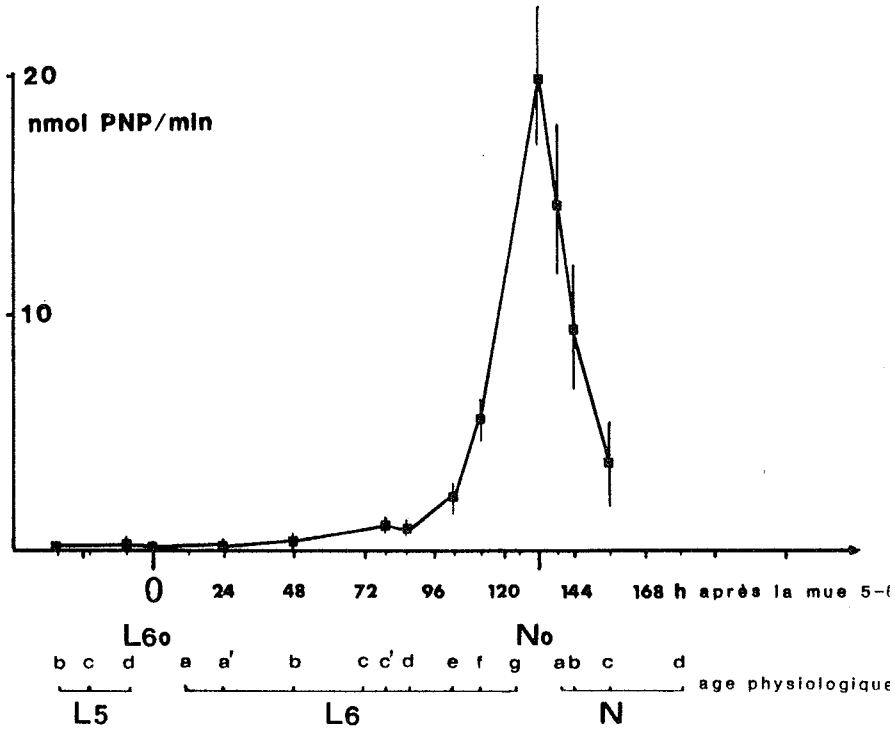


figure 54b: évolution de l'activité "B glucosidase" dans l'ensemble des tissus (hémolymphe non comprise).

15 ; puits 17 - hydrolyse du 6 Bromo-2-naphtyl B-D-glucopyranoside). Jusqu'au stade prénymphe, aucune hydrolyse du substrat par des extraits tissulaires n'est observable. Ont été testés, à différentes concentrations, des extraits de tissus totaux, de tube digestif, de corps gras, d'hémolymphe, de tubes de malpighi et de tégument. Pour les prénymphes et les chrysalides, nous avons testé séparément le tégument et le reste des tissus. Les prénymphes et les chrysalides trouvées présentent une activité non nulle, et les chrysalides "blanches" (moins de 3 à 4 heures après la mue nymphale) montrent une nette hydrolyse du substrat ; l'activité est présente à plus de 90 % dans les structures non tégumentaires.

4.2.2 Mise en évidence de l'activité hydrolasique sur Bglc TYR : sur chrysalides "blanches" de moins de trois heures, des extraits tissulaires totaux ont été testés pour la dégradation de Bglc TYR et d'un glucoside phénolique chromogène, le p-nitrophényl B glucoside (voir B.4.1.3.1). L'activité B glucosidase constatée précédemment semble bien être responsable de la dégradation de Bglc TYR, puisqu'on détecte l'apparition de tyrosine dans les incubations (mais pas si les extraits sont dénaturés par la chaleur). Pour Bglc TYR, on obtient environ 17 µmoles de tyrosine en une heure (soit près de 28 nmoles de TYR libérées par individu et par minute). Pour le pNPG, l'activité constatée est d'environ 21 nmoles de pNP libérées par individu et par min. .

4.2.3 Dosage de la B glucosidase au cours du développement : les résultats des dosages au pNP sont présentés en figure 54a pour l'hémolymphe "totale" (ponction complète) et en figure 54b pour le reste des tissus. Deux traits principaux apparaissent :

- l'hémolymphe ne contient qu'une très faible partie de l'activité totale (moins de 2.5 % au temps No). Ce résultat est cohérent avec celui d'AHMED et coll. (1983 b) attribuant plus de 75 % de l'activité Bglc TYR hydrolase au corps gras chez M. sexta au même stade.

- l'activité est manifestement très localisée dans le temps : on note un faible mais significatif plateau vers 80 - 100 heures après la mue (filage), puis un considérable accroissement de cette activité dès 24 heures avant la mue nymphale. Enfin, une chute brutale survient dès l'ecdysis, ramenant les valeurs 24 heures après la mue à moins de 10 % de l'activité maximale.

La dynamique, spatiale et temporelle, de la dégradation de Bglc TYR semble bien être la suivante : accumulé presqu'exclusivement dans l'hémolymphe pendant la phase d'alimentation, il semblerait devoir être progressivement repris par le corps gras de la prénymphe où il serait hydrolysé pour libérer la tyrosine nécessaire au déroulement de la mue. Comme pour les protéines, les arguments pour ces transferts

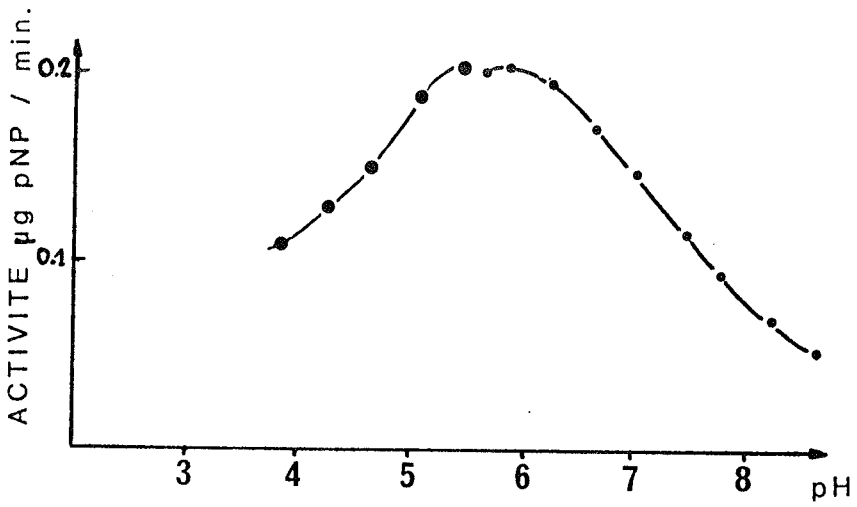


figure 55: variation de l'activité "B glucosidase" des chrysalides "blanches" de S.littoralis en fonction du pH du milieu d'incubation.

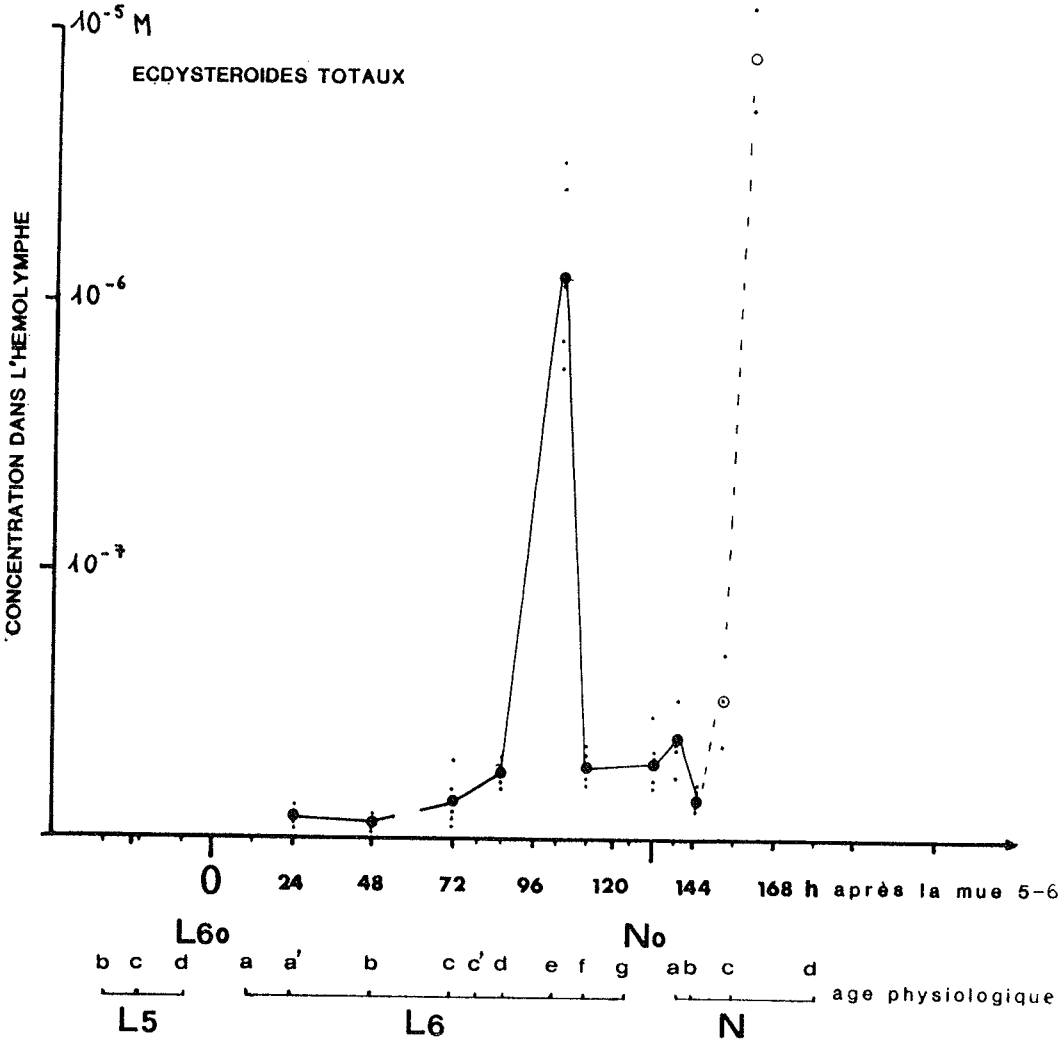


figure 56: taux hémolymphatiques des ecdystéroides totaux au cours du dernier stade larvaire de S.littoralis.

tissulaires sont indirects :

1. baisse de la quantité de Bglc TYR dans l'hémolymphe - voir figure 38 - sans activité hydrolytique notablement renforcée ;

2. localisation de la glucosidase dans le tissu adipeux - et non dans l'hémolymphe ou la cuticule - rendant le passage dans ce tissu nécessaire à l'utilisation du glucoside.

4.2.4 Propriétés : un début de caractérisation de la B glucosidase a été tenté pour en comparer les propriétés avec les autres B glucosidases (de type cellobiases ou phényl-B-glucosidases) déjà isolées de tubes digestifs d'insectes (CHARRARAS et CHIPOULET ; 1982).

La courbe de pH de l'enzyme extraite de chrysalides "blanches" est montrée en figure 55. Le maximum se situe vers un pH de 5.8, voisin de l'optimum (5-5.5) de l'enzyme digestive du scolytidae étudié par les auteurs précédents.

4.3 CONTEXTE HORMONAL :

Afin de positionner les pics d'activité B glucosidasique et les autres grandeurs étudiées par rapport aux principaux événements hormonaux de S. littoralis, nous avons effectué sur les mêmes échantillons le dosage radioimmunologique des ecdystéroïdes totaux et des hormones juvéniles de l'hémolymphe au cours du dernier stade larvaire.

4.3.1 Ecdystéroïdes : la figure 56 montre l'importance et la position du pic majeur d'ecdystéroïdes provoquant la mue nymphale. Nos échantillonnages sont évidemment trop espacés pour suivre très précisément toutes les variations hormonales (PLANTEVIN et coll., 1984). Le petit pic d'ecdysone qui est maintenant classique n'est par exemple pas mis en évidence, mais doit se situer vers les 60-70 heures après la mue 5-6 (travaux de MALEVILLE et coll. sur une noctuelle voisine : Heliothis armigera).

Chez M. sexta, l'injection de 20-OH ecdysone entraîne une chute brutale du taux hémolymphatique de Bglc TYR (AHMED et coll., 1983 b). Cela suggère donc un contrôle plus ou moins direct de l'activité glucosidasique par l'ecdysone, et le profil d'activité de l'enzyme est conforme à un tel schéma (décalage d'environ 24 heures entre un éventuel signal hormonal et la réponse enzymatique). Cependant, les fortes valeurs d'ecdystéroïdes détectées 24 heures après la mue ne semblent pas provoquer de reprise d'activité hydrolasique chez les chrysalides tannées (48 ou 72 heures après la mue - APIZYM).

Une régulation plus complexe qu'une simple réponse à un stimulus

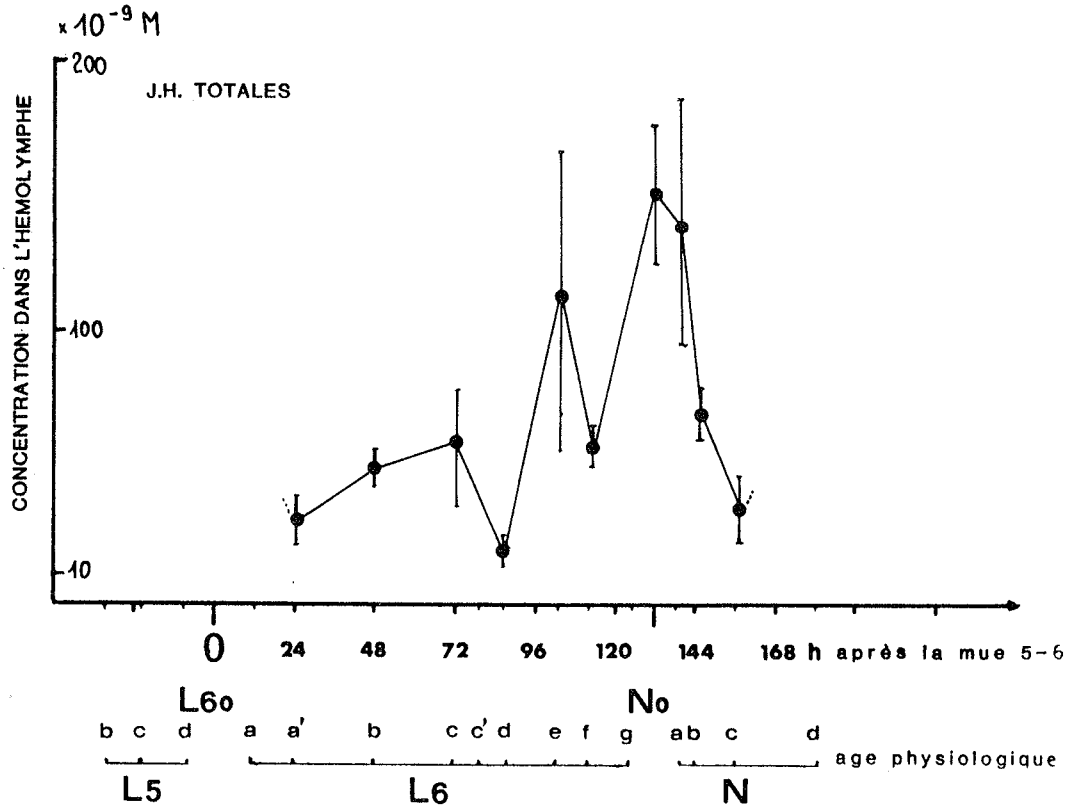


figure 57: taux hémolymphatiques des hormones juvéniles totales au cours du dernier stade larvaire de S.littoralis.

(c.p.m. corrigés)	INGESTION	%	INJECTION	%
Dose fournie	31503200	100	31503200	100
fécès	6494004	20.6	5039788	16
CO2	142470	.5	906390	2.9
hémolymphe	4744800	15.1	4908000	15.6
autres	20121926	63.8	20649022	65.5
-proteines 500K	963944	3.1	1164665	3.7
- B glc TYR	2374813	7.6	1153601	3.7
- TYR	256085	.8	58478	.2
-autres (dans l'hemolymphe)	1149958	3.6	2531256	8

tableau 19: Distribution de la radioactivité 24 heures après l'injection ou l'ingestion d'une même dose d' U-14C-tyrosine à deux lots de 10 larves en début de dernier stade larvaire.

ecdystéroïdien doit donc exister au moins après la mue nymphale.

4.3.2 Hormones juvéniles : les taux de J.H. totale circulante ont aussi été mesurés (figure 57). Les variations sont assez conformes aux résultats chez d'autres Lépidoptères (G. mellonella ; PLANTEVIN et coll., 1984), avec une valeur faible atteinte vers la fin de l'alimentation et deux pics, en fin de filage et en tout début de vie nymphale. La signification de ces variations reste encore mal connue.

La séparation de différentes J.H. (I, II et III) a été réalisée sur quelques échantillons mais les résultats sont trop peu nombreux pour être fiables ; les proportions de J.H. varient au cours du dernier stade larvaire, avec présence des trois espèces en début de stade, prédominance de la JH III lors du filage et à nouveau présence des trois JH en proportions semblables lors du pic de début de stade nymphal.

4.4 MARQUAGE RADIOACTIF:

Les résultats de l'expérience de marquage sont résumés dans le tableau 19. Les valeurs sont toutes corrigées pour le "quenching" de l'échantillon et les pourcentages expriment la fraction de la radioactivité (et non de la tyrosine) retrouvée dans les différents compartiments.

La partie basse du tableau regroupe les résultats obtenus après fractionnement des aliquotes d'hémolymphe sur les deux colonnes HPLC (colonne SW300, figure 58; colonne de silice greffée amino). Notons que les valeurs pour l'hémolymphe ont été corrigées pour représenter l'hémolymphe totale des larves au moment du prélèvement (volume pour une larve" L6b": 120 µl). Il faut de plus noter que si le volume sous lequel est injecté la tyrosine (8µl) peut perturber la physiologie de la larve, la quantité de tyrosine injectée (4.4 nmol.) est assez faible par rapport au pool endogène de tyrosine libre à cet âge (1 µmol./animal).

Les principales remarques à tirer de ces premiers résultats sont:

a- La radioactivité retrouvée dans les fécès des larves injectées est étonnamment abondante. Elle est certes inférieure à celle retrouvée dans les fécès de l'autre lot, et ne représente pas forcément de la tyrosine libre.

Par ailleurs, nos résultats sur l'assimilation des acides aminés (C 1.2.2) donnent pour la tyrosine une valeur (81%) tout à fait cohérente avec les 20.6% de radioactivité retrouvée dans les fécès du lot "INGESTION". Deux hypothèses peuvent donc expliquer l'excrétion de radioactivité par les larves injectées:

- L'excrétion de tyrosine libre, soit spontanément (et les valeurs d'assimilation de 80% seraient alors le résultat d'une

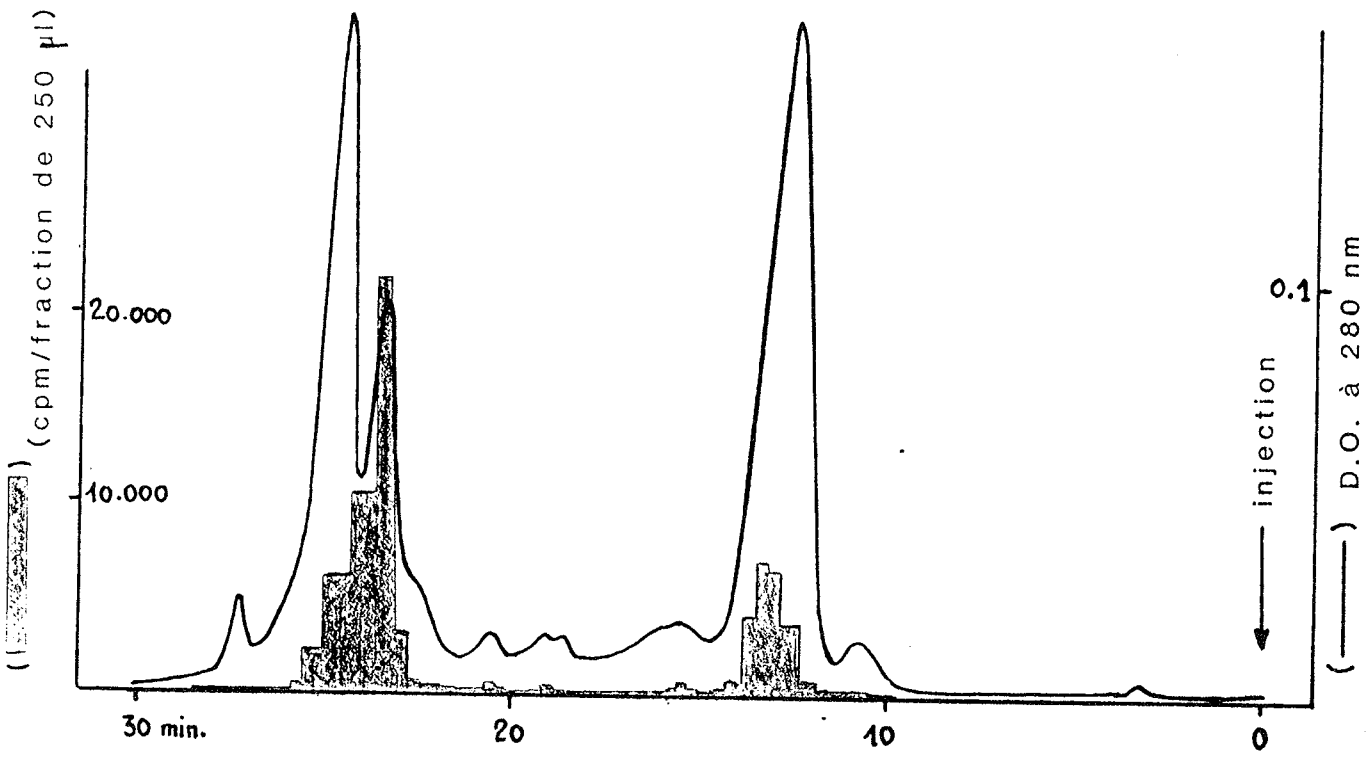


figure 58: Chromatogramme HPLC d'hémolymphe de larves du lot "INGESTION" 24 heures après le début de l'expérience.
Colonne de type "protéines" (SW300); détection UV à 280 nm, et par fractionnement et comptage en sortie du détecteur.

absorption exceptionellement efficace, suivie d'une perte assez importante), soit sous l'effet du choc occasionné par l'accroissement (près de 10%) du volume hémolymphatique lors de l'injection.

- L'excrétion de métabolites de la tyrosine consécutivement au traumatisme de l'injection, par exemple à la suite de l'activation des phénoloxydases hémolymphatiques en partie responsables des phénomènes de "cicatrisation" et d'encapsulation des particules exogènes.

Cela serait d'ailleurs plutôt confirmé par les valeurs élevées du CO_2 marqué dégagé par le lot des larves injectées (5 fois plus fortes que pour l'autre lot). Dans le cadre de cette hypothèse, la comparaison des pourcentages de radioactivité excrétés sous forme de CO_2 ou dans les fécès doivent tenir compte du catabolisme de la chaine latérale de la tyrosine (le cycle n'étant pas dégradé). Une molécule d'U-14C-tyrosine peut donc fournir de 1/9° à 3/9° de sa radioactivité sous forme de CO_2 (et par conséquent de 8/9° à 6/9° sous forme d'un métabolite quelconque); la valeur du rapport de radioactivité de ces deux formes d'excrétion peut donc varier théoriquement de 2 à 8; la valeur observée (16/2.9 = 5.5) est donc tout à fait compatible avec cette hypothèse.

b- Les quantités de radioactivité retrouvées dans l'hémolymphe et dans les autres tissus sont du même ordre dans les deux lots: la perte "digestive" du premier lot est compensée par une vraisemblable perte métabolique "parasite" dans le deuxième lot.

c- Au niveau de la tyrosine libre de l'hémolymphe, on retrouve au bout de 24 heures 0.18% de la tyrosine marquée injectée. Cela indique un "turn-over" actif de la tyrosine dans ce compartiment (demi-vie d'environ 2h 35mn), et qui ne doit pas être très différente dans les deux lots: la valeur de 0.81% observée dans le lot "INGESTION" s'explique par le fait que l'apport n'y est pas instantané mais s'échelonne sur 24 heures.

d- La comparaison de la répartition de la radioactivité entre Bglc-TYR et la fraction protéique contenant l'arylphorine fait apparaître une différence nette: l'incorporation dans le glucoside est deux fois plus forte dans le cas de l'ingestion de la tyrosine, alors que son incorporation dans l'arylphorine est comparable et même légèrement supérieure si la tyrosine est injectée. Si cette observation n'est pas artéfactuelle, elle souligne l'existence d'un rôle de la paroi intestinale dans l'élaboration du glucoside de tyrosine.

e- Un dernier point à souligner est la valeur assez faible de l'incorporation totale de radioactivité dans l'hémolymphe. En effet, le schéma établi jusqu'ici indique pour cette période un intense transfert

de tyrosine vers l'hémolymphe (sous ses deux formes de stockage). Or, nous ne retrouvons, dans un cas comme dans l'autre, que 15 à 16% de la tyrosine administrée dans l'hémolymphe. Cette valeur, très faible au vu des "besoins" en tyrosine du compartiment hémolymphatique, pose problème. Elle pourrait s'expliquer, soit par le démarrage tardif (en cours d'expérience) des synthèses de formes de stockage, soit par un détour obligé par un compartiment tissulaire jouant un rôle de stockage temporaire, et retardant l'apparition de la tyrosine marquée dans l'hémolymphe .

Cette expérience a été aussi entreprise dans le but de préparer et de purifier des formes marquées de stockage de la tyrosine (Bglc-TYR et arylphorine). Ces composés, stockés à -40°C, devraient permettre d'étudier leur devenir lors d'une injection 24 heures avant la mue nymphale. La quantification de leur répartition (biochimique et tissulaire) à l'issue de cette mue permettra de cerner avec plus de précisions leurs différents rôles respectifs.

D. DISCUSSION GENERALE :

Essai de synthèse sur la physiologie du "système tyrosine" au cours du développement d'un Lépidoptère.

Avant de conclure, nous essaierons de présenter dans ce chapitre une vision d'ensemble des solutions adoptées par les Lépidoptères pour manipuler leur pool d'acides aminés aromatiques et adapter constamment leurs capacités d'offre à une demande en tyrosine ontogéniquement très diversifiée. Nos résultats, mais surtout la plupart des données actuellement disponibles dans la littérature, seront intégrés dans cet exposé assez court .

Contrairement à notre approche qui a jusque là privilégié, pour des raisons méthodologiques, une certaine compartimentation biochimique, nous aborderons ici la question d'un point de vue plus chronologique. En effet, les diverses phases de développement des insectes holométaboles présentant des métabolismes parfois très différents, nous avons préféré choisir ici une compartimentation temporelle. Certains stades du cycle des Lépidoptères n'ont pas suscité beaucoup de travaux dans notre domaine d'intérêt ; soit que les recherches y ont été entreprises d'un point de vue différent de celui du biochimiste physiologiste (cas du développement embryonnaire) ; soit encore que les potentialités du stade dans le métabolisme étudié aient été jugées peu importantes (stade adulte). Nous essaierons cependant d'en discuter aussi.

1. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE :

En dehors de l'approche purement embryologique qui a été très étudiée, par exemple chez B. mori (voir TAZIMA, 197), relativement peu de travaux à finalité biochimique ont été éffectués. Et si l'endocrinologie embryonnaire suscite un intérêt croissant (initiation des synthèses hormonales, biochimie de la diapause embryonnaire ...), les métabolismes plus généraux ou nutritionnels de ce système "fermé" qu'est l'embryon sont peut-être apparus comme plus secondaires. Pourtant, chez les Lépidoptères en tout cas, des métabolismes tels que celui de la tyrosine doivent jouer un rôle certain dès le début du développement, par exemple lors de la formation de la cuticule ou de la sclérotisation de la capsule céphalique de la larve néonate.

La forme sous laquelle la tyrosine est transmise à l'oeuf n'est pas bien connue. Le glucoside de tyrosine y est complètement absent, de même semble-t-il que l'arylphorine, tout au moins dans sa forme complète ; chez B. mori, en effet, les oeufs diapausant ou non ne présentent pas de protéines majeures dans la région de P.M. de

l'arylphorine, ou "SP 2" chez cette espèce (DOREL et COULON, communication personnelle).

Il se pourrait très bien que l'oeuf ne contienne pas de forme de stockage spécifique aux acides aminés aromatiques et nourrisse son pool de tyrosine libre avant l'éclosion par la consommation de ses protéines principales, E.S.P.et vitellines. La concentration de tyrosine libre dans les oeufs 12 heures avant éclosion n'est cependant pas très forte comparée à celle précédant les mues larvaires (1.4 nmole/mg contre 5 à 7 nmoles/mg). Cela traduit peut-être le fait que les processus d'oxydation de la tyrosine sont déjà bien avancés à ce moment là.

ISHAAYA et NAVON (1979) ont par ailleurs montré que l'activité phénoloxydase responsable des premières étapes de la sclérotisation augmentait au cours du développement embryonnaire, mais aussi qu'elle était présente à un taux relativement élevé dans les oeufs fraîchement pondus, qu'ils soient d'ailleurs fertiles ou non. Cela indique donc pour cette enzyme un apport maternel conséquent.

2. LES PREMIERS STADES LARVAIRES:

2.1 La croissance :

Avec le début de l'alimentation commence après chaque mue larvaire une phase d'accumulation des acides aminés aromatiques, avec probablement une conversion assez active de la phénylalanine libre en tyrosine. Mais après les premières mues larvaires ne se produit apparemment pas la mise en place du système de synthèse du glucoside de tyrosine observé au dernier stade. Les premières observations sur la tyrosine de l'hémolymphe de Lépidoptères laissaient apparaître un accroissement sensible de son taux hémolymphatique au cours du stade (DUCHATEAU-BOSSON et coll., 1962). Nos observations au cinquième stade larvaire de S. littoralis s'accordent bien avec ce schéma, qui laisse penser à une accumulation plus ou moins passive de tyrosine libre dans ce dernier compartiment.

Cependant, des travaux récents et plus précis combinent des observations histologiques et biochimiques sur l'hémolymphe et le tissu adipeux de l'avant dernier stade larvaire de Calpodes ethlius (Mc DERMID et LOCKE, 1983) :

Ces auteurs mettent clairement en évidence un système subcellulaire de stockage de la tyrosine au niveau du corps gras larvaire. En effet, parallèlement à l'apparition de vacuoles aqueuses et à l'extension de leur volume, la proportion de tyrosine parmi les acides aminés libres du corps gras augmente considérablement pour atteindre près de 65 % des acides aminés décelables environ 20 heures avant la mue. La forme analysée par ces auteurs est la tyrosine libre mais ils n'excluent pas un artéfact de l'extraction acide réalisée; l'hypothèse de l'existence d'un conjugué labile de la tyrosine est avancée. En effet la concentration estimée de la tyrosine dans ces vacuoles atteint plus de 40 fois la saturation dans l'eau à pH neutre.

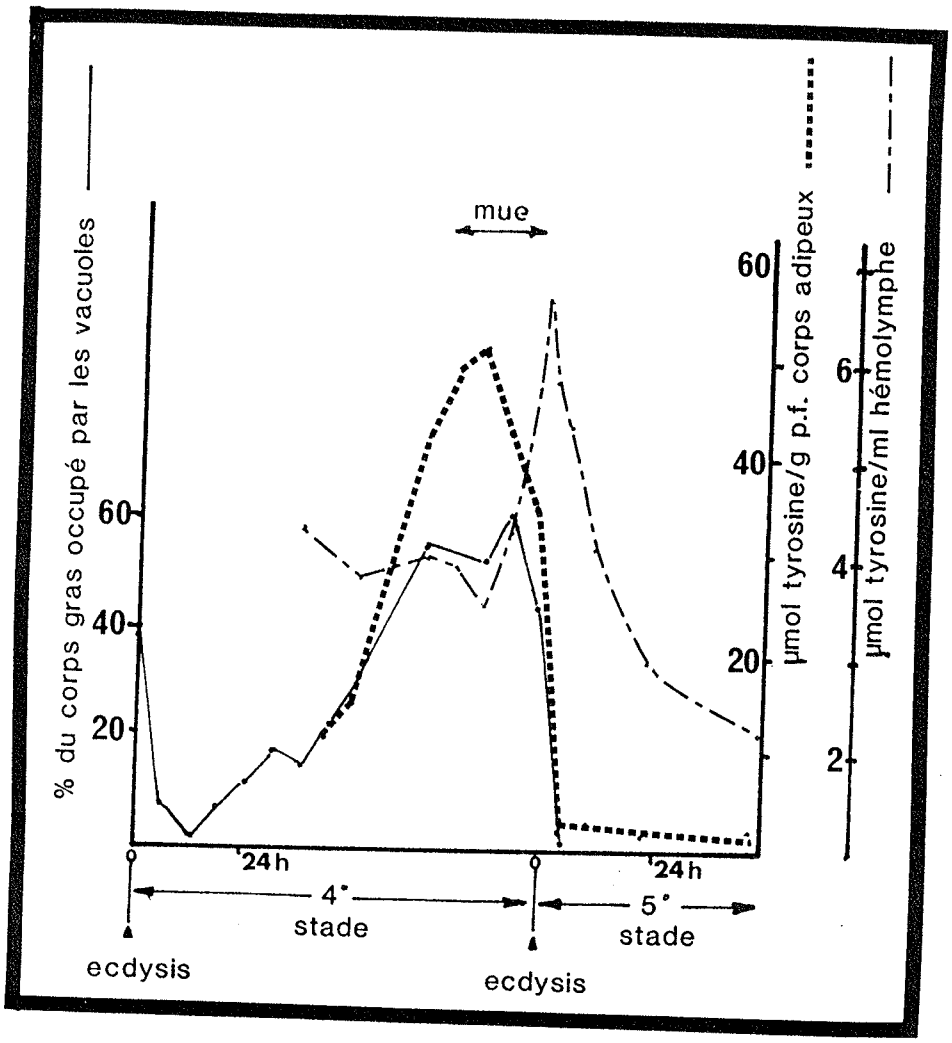


figure 59: évolution des vacuoles du corps gras, de sa teneur en tyrosine et de la tyrosine hémolymphatique au cours d'un cycle larvaire mue/intermue de Calpodes ethlius (d'après McDERMID et LOCKE, 1983).

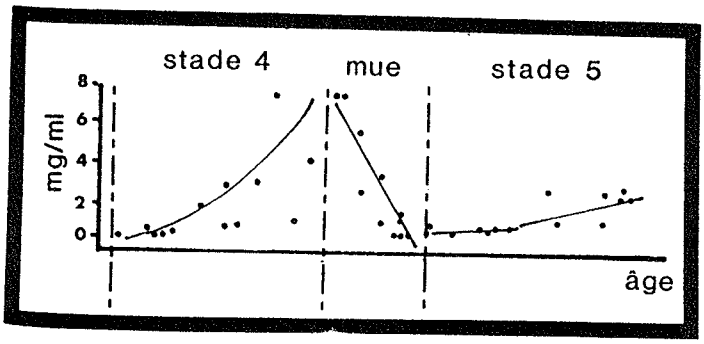


figure 60: évolution de la teneur hémolymphatique en arylphorine au cours de la dernière mue larvaire de Hyalophora cecropia (TELFER et coll.; 1983).

Comme l'hypothèse d'une sursaturation est jugée peu probable, malgré les observations de cristallisaion de tyrosine lors de l'éclatement des vacuoles, ces auteurs ont pensé à la présence de conjugués fragiles (phosphate, sulfate, glucoside).

Notons quand même qu'aucun de ces conjugués déjà connus (O-conjugués) n'est suffisamment fragile pour expliquer ces résutats. Par ailleurs, la tyrosine a une solubilité nettement accrue à pH faibles, et l'hypothèse d'une ségrégation à forte concentration dans un compartiment acidifié n'est pas à exclure.

2.1 Les mues larvaires :

Le devenir des vacuoles précédentes est suivi de la même façon par les auteurs cités : la figure 59 résume les résultats obtenus sur un cycle intermue/mue. Dès la mise en place du processus de la mue, les vacuoles du corps gras se déchargent de leur contenu (tyrosine, mais aussi tryptophane, leucine et phénylalanine) dans l'hémolymphe qui présente donc un pic de tyrosine pré-ecdysial. Aussitôt après, le taux de tyrosine baisse très fortement, par suite de son utilisation dans les processus de sclérotisation puis de mélanisation de la cuticule larvaire.

Pour ce qui est du détail de ces derniers, il semblerait que les mues larvaires impliquent chez les Lépidoptères des composés tannants (ou des proportions de composés tannants, dérivés des catécholamines) assez variés et en tout cas différents des espèces chimiques rencontrées à la mue nymphale (HOPKINS et coll., 1984).

Des trois composés dopamine (DA), N-B-alanyldopamine (NBAD) et N-acétyldopamine (NADA), c'est ce dernier qui est le plus représenté dans l'hémolymphe au cours d'une mue larvaire (probablement sous forme 4-OH glucolysée et dans des proportions NADA/NBAD et NADA/DA d'environ 5/1 - Id.Ibid.). La composition des nombreux types de cuticule larvaire en ces différentes catécholamines est très variable et pourrait rendre comte de leurs propriétés physiques variées. Enfin, et toujours chez M. sexta, il semblerait que la dopamine soit un précurseur de la mélanisation qui affecte la cuticule larvaire dans les heures suivant l'ecdysis (ASO et coll;, 1984).

Ayant passé en revue le devenir de la tyrosine libre lors des mues larvaires, il nous faut dire quelques mots sur le compartiment protéique, très peu étudié à ces périodes. Quelques renseignements concernant l'arylphorine sont cependant disponibles (TELFER et coll., 1983) et font état d'une intéressante baisse de son taux hémolymphatique au cours d'une mue larvaire (figure 60). Les taux relativement faibles de cette protéine avant le dernier stade larvaire permettent de mettre en évidence cette baisse que l'on peut attribuer soit à une hydrolyse, soit à une incorporation dans le tissu adipeux ou la cuticule. Cette dernière hypothèse serait à tester pour éprouver l'idée d'une utilisation de l'arylphorine dans l'élaboration de la cuticule (larvaire en l'occurence).

3. LE DERNIER STADE LARVAIRE :

3.1 L'accumulation :

Comme pour les autres stades larvaires, mais à une échelle plus importante, la période alimentaire correspond pour la tyrosine à un anabolisme actif. Nous avons vu précédemment que la quantité de tyrosine ingérée ne pouvait suffire à alimenter simultanément les deux formes de stockage glucosidique et protéique. Une contribution d'une part des réserves (assez faibles) accumulées aux précédents stades larvaires, et d'autre part du pool de phénylalanine ingérée paraît donc indispensable. Le suivi d'injections de phénylalanine marquée comme de l'activité phénylalanine 4-hydroxylase au cours de cette période devrait permettre de répondre assez facilement à cette interrogation.

Si la synthèse de l'arylphorine semble bien s'effectuer dans le corps gras, celle du glucoside de tyrosine n'est pour l'heure pas localisée. Les principaux tissus "candidats" sont l'intestin, le tissu adipeux mais aussi éventuellement les hémocytes. Un des arguments pour la localisation dans l'épithélium intestinal est qu'il reste une voie de passage obligée pour les aminoacides en question, et qu'un système de transport pourrait bien être associé à une transférase membranaire comme c'est le cas chez certains Diptères (gamma glutamyl transpeptidase des muscidae ; BODNARYK et coll., 1974).Le taux de transport apparemment élevé de la tyrosine à travers l'épithélium intestinal pourrait suggérer l'existence d'un tel mécanisme.

Cependant, l'occurence d'une synthèse de Bglc TYR au stade nymphal et la glucosylation d'autres composés que la tyrosine (catécholamines) seraient plutôt en faveur des hypothèses de synthèse par le corps adipeux ou les hémocytes. Les deux directions de recherche restent donc ouvertes et l'existence de plusieurs mécanismes ou localisations n'est pas non plus à exclure à priori.

Pendant toute cette période, l'activité biosynthétique du corps gras s'accompagne d'une intense exportation de molécules, faisant de l'hémolymphe le compartiment presqu' exclusif de stockage à la fois de l'arylphorine et de la B glucosyl tyrosine.

3.2 LA PRENYMPHE :

A cette période, dont le métabolisme spécifique semble débuter dès la fin de l'alimentation, est associé non pas un catabolisme, qui caractérise plutôt la phase suivante, mais un remaniement "spatial" de notable importance. En effet, l'arylphorine hémolymphatique, tout comme certaines autres protéines, est activement séquestrée par le corps gras en pleine croissance de la prénymphe. Les mécanismes cellulaires de cette séquestration au sein de structures spécialisées

("multivesicular bodies") ont été décrits par LOCKE et COLLINS (1968) ; de plus, la différenciation de ces structures selon la nature de la protéine renfermée (granules protéiques denses non cristallins pour l'arylphorine de B. mori : TOJO et coll., 1980), traduit une compartimentation biochimique étroite nécessitant peut-être des structures de reconnaissance telles que des récepteurs membranaires.

Chez la prénymphe les protéines ne sont pas seules à être "déplacées" et des arguments indirects incitent à admettre un transfert partiel du glucoside de tyrosine dans le corps gras : en effet, la quantité de Bglc TYR présente dans le compartiment hémolymphatique baisse de façon notable avant le début du pic important d'activité B glucosidasique ; de plus, si cette dernière est bien compartimentée dans le corps gras, celui-ci est donc un lieu de passage obligé pour l'utilisation du glucoside lors de la phase suivante du développement.

3.3 LA MUE NYMPHALE :

C'est en fait un des moments cruciaux affectant le métabolisme de la tyrosine chez les Lépidoptères et les autres insectes holométaboles ; elle a de ce fait attiré les travaux de la plupart des équipes travaillant sur le sujet. Nous essayerons de les rassembler au mieux.

Notons d'abord que le compartiment protéique n'a pas reçu à cette période toute l'attention qu'il méritait. Une des raisons en est que le stockage survenu dans la période précédente masque (dans les esprits comme à un certain nombre de techniques) d'éventuels phénomènes fins et quantitativement moins importants. Ce n'est que récemment qu'un intérêt semble renaître à ce propos, plus particulièrement chez les équipes travaillant sur les Diptères et sur la calliphorine (LIPKE et coll., SCHELLER et coll.). Comme les idées sont plus à l'état de questions que de faits établis chez les Lépidoptères, nous n'en citerons que quelques-unes des plus significatives :

- quelle est la nature de certaine(s) protéine(s) transportant des agents tannants de l'hémolymphe dans la cuticule de la chrysalide (KOEPPE et GILBERT, 1974).

- l'arylphorine a-t-elle un rôle de transport d'ecdystéroïdes chez les Lépidoptères, et quelles conséquences physiologiques cela peut-il impliquer lors de la mue nymphale ?

- chez les Diptères, la cuticule nymphale contient des polypeptides très riches en tyrosine (jusqu'à 35 % pour l'un d'entre eux - LIPKE et HENZEL, 1981). Sont-ils présents chez les Lépidoptères ? Si oui, quels rôles exacts ont-ils dans le processus de sclérotisation et quel lien peuvent-ils avoir avec l'arylphorine circulante ?

- quel est le mécanisme réel des liaisons covalentes protéines / agents tannants dans la cuticule nymphale des Lépidoptères ? (rôles

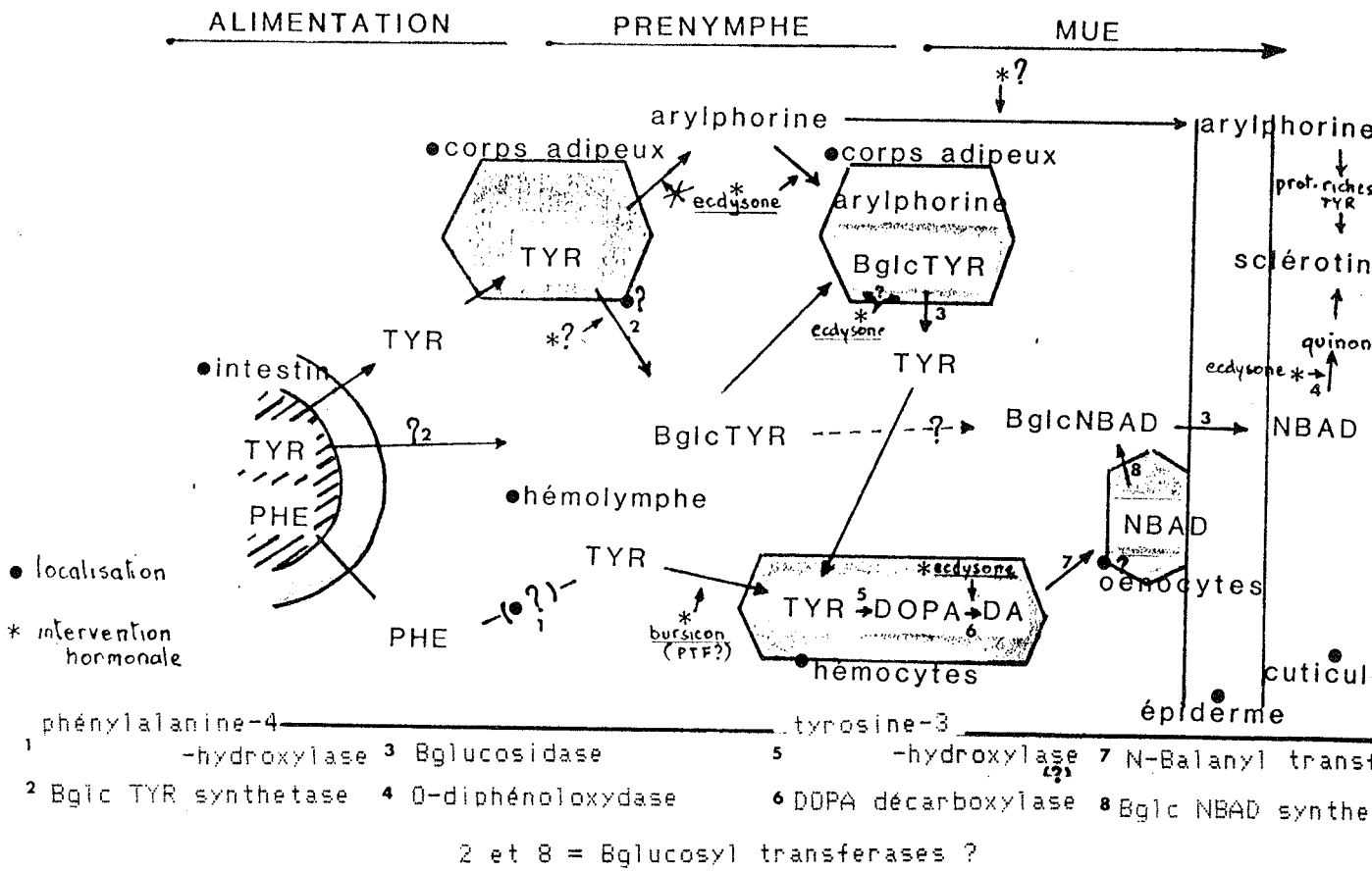


figure 61: Transformations affectant la tyrosine au cours du dernier stade larvaire d'un lépidoptère. Localisation et interventions hormonales éventuelles.

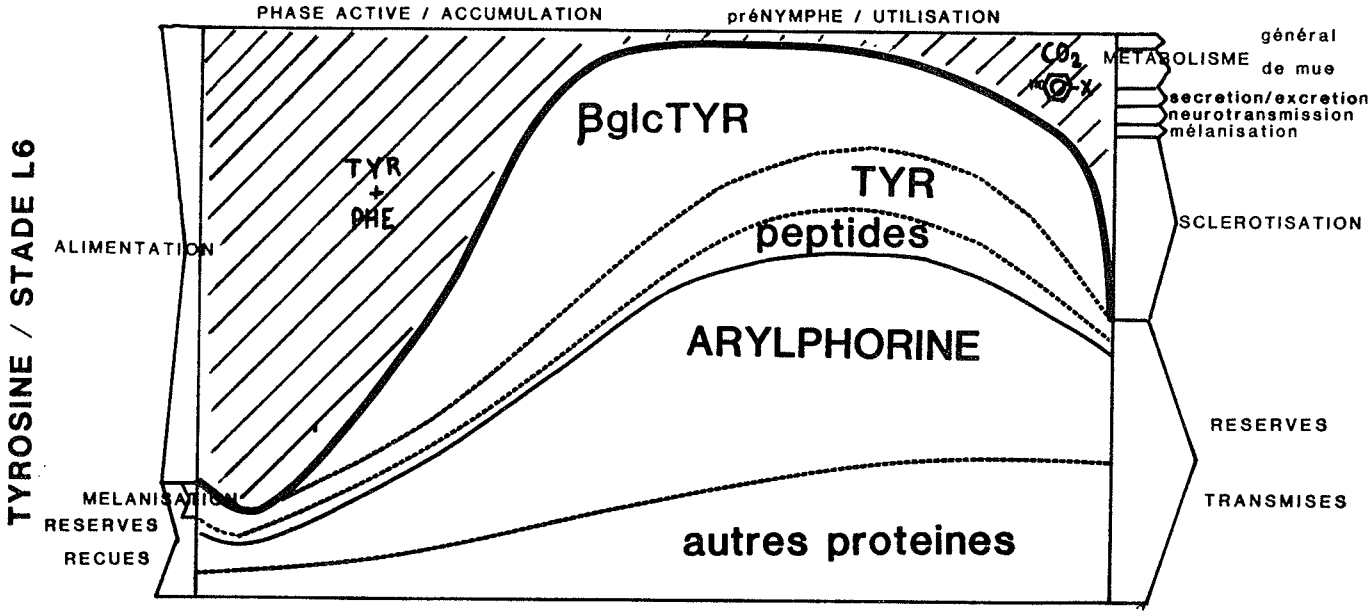


figure 62: Bilan de la tyrosine au dernier stade larvaire de S.littoralis . Le trait gras situe la quantité globale de tyrosine présente à un moment donné dans une larve (sous toutes ses formes conjuguées). L'amplitude verticale représente le flux total de tyrosine correspondant à une larve au cours du dernier stade.

de la B alanine et des résidus porteurs de groupements aminés dans les chaines polypeptidiques).

Ces dernières questions nous ramènent au compartiment de faible P.M. et au devenir de la tyrosine, dont le pool hémolymphatique est très probablement alimenté par la forte dégradation de son glucoside à ce moment. Sous l'influence de facteurs endocrines encore très peu étudiés, du type P.T.F. (Puparium Tanning Factor des Diptères, homologue probable du bursicon responsable des mêmes phénomènes à la mue imaginale - WHITEHEAD, 1972), de la tyrosine serait intégrée dans les hémocytes pour y subir les oxydations l'orientant vers la voie de la sclérotisation.

Cette dernièree s'effectue lors de la mue nymphale par l'intermédiaire d'un composé différent de celui prédominant lors des mues larvaires (NADA) ; en effet, la cuticule dure et foncée des chrysalides semble sans équivoque associée à la présence dans l'hémolymphe de la N-B alanyl-tyrosine (NBAD - HOPKINS et coll., 1984). La différence de structure avec la cuticule larvaire pourrait s'expliquer par ce fait, et serait donc dûe au remplacement de l'activité N-acétylasique (des oenocytes ? - MARANDA et HODGETTS, 1977) par une N-B-alanylase.

Le schéma présenté en figure 61 tente de regrouper les différents éléments que nous venons d'exposer, mais il est utile d'insister sur le grand nombre d'incertitudes régnant sur la réalité des compartimentations spatiales et temporelles et par conséquent sur les déterminismes hormonaux qui les sous tendent.

3.4 BILAN DE LA TYROSINE AU COURS DU DERNIER STADE LARVAIRE:

D'après les données que nous avons recueillies au cours de cette période, qui nous a plus particulièrement intéressé, nous pouvons élaborer un schéma synthétique semi-quantitatif sur le bilan en tyrosine . La figure 62 montre le résultat qui résume bien les différentes phases anaboliques et cataboliques observées. Signalons que la taille des compartiments a été estimée assez grossièrement mais doit néanmoins refléter la situation réelle. Un bilan complet aurait nécessité une étude poussée du catabolisme "complet" (CO_2 et formes d'excrétion du cycle notées.HO⟨⟩X.), de même qu'une évaluation précise des quantités de protéines non hémolymphatiques.

4. LA NYMPHE

4.1 LA "VIE" NYMPHALE :

Nous nommons ainsi la période séparant la mue nymphale des premiers événements déclanchant la mue imaginale.En fait cette période voit principalement la restructuration tissulaire conduisant progressivement

à la formation de l'adulte. Du point de vue de la tyrosine, on observe chez les Lépidoptères une nouvelle accumulation de Bglc-TYR (ISOBE et coll., 1981), dont l'origine est ici nécessairement dans les réserves aromatiques protéiques. En l'absence d'autres arguments, on ne peut préciser si le principal donneur de tyrosine est la calliphorine (celle du corps gras ou la callyphorine "résiduelle" de l'hémolymphe) ou bien le pool global de protéines de la chrysalide. Le lieu de synthèse du glucoside dans ce stade est à fortiori totalement inconnu.

4.2 LA MUE IMAGINALE :

Cette période n'a pas été très étudiée chez les Lépidoptères, mais les éléments à notre disposition indiquent un déroulement assez homologue à celui de la mue nymphale. Quelques faits y sont cependant mieux précisés et quelque peu différents :

- d'une part, l'initiation de certains phénomènes a été mise en évidence à ce moment chez les Lépidoptères. C'est en particulier le cas de la perméabilisation de la membrane des hémocytes à la tyrosine sous l'action de l'hormone protéique Bursicon (POST, 1972). Par ailleurs, des observations sur le contrôle neurosécrétaire de cette activité ont été réalisées chez les Lépidoptères (voir la synthèse de GIRARDIE, 1980).

- d'autre part, la nature des catécholamines présentes dans l'hémolymphe de l'adulte à la mue se rapproche plus de la composition des cuticules larvaires que nymphale. On observe même une prédominance encore plus nette de la NADA, avec des taux extrêmement faibles de NBAD.

5. L'ADULTE :

C'est la période du cycle qui a été la moins étudiée. Cette situation est à priori logique puisque les principaux métabolismes typiquement adultes, reproduction ou vol, ne sont pas directement concernés par les transformations de la tyrosine. Cet état de fait est corroboré par les résultats de LEVENBOOK et BAUER (1984) chez *C. vicina*, qui indiquent que la calliphorine présente en quantité appréciable à l'émergence disparait presque totalement en moins de quatre jours. La phénylalanine et la tyrosine marquées de la protéine injectée avant la pupaison (calliphorine marquée à la 14-C PHE) se retrouve chez l'adulte majoritairement dans l'actine et la myosine des muscles thoraciques. Cette dernière étape de l'utilisation de l'arylphorine ne paraît donc pas liée à un métabolisme spécifique des acides aminés aromatiques.

CONCLUSION

Face à la diversité des problèmes et des questions qui restent posés, nous sommes bien conscients que notre travail n'a pu apporter que des réponses partielles. Mais, étant donné les motifs qui nous ont amenés à travailler sur ce sujet, nous avons choisi de ne pas nous cantonner à un seul des volets abordés (par exemple la forme Bglc TYR).

Ce choix nous a condamnés à ne pas pouvoir approfondir certaines voies intéressantes dans les délais imposés ; c'est notamment le cas de l'enzymologie de la synthèse du glucoside de tyrosine. La démarche suivie a par contre conduit à se faire une idée assez précise des diverses solutions adoptées par les Lépidoptères pour gérer leurs besoins en tyrosine au cours de la métamorphose. Il va sans dire que cela n'aurait pas été le cas sans l'aide d'une littérature relativement fournie dans des domaines connexes au nôtre.

Avec un certain recul, il apparaît par ailleurs que le choix de certaines méthodes aurait peut-être permis de répondre de façon plus précise ou complète aux questions posées. L'utilisation de radiomarquage aurait par exemple amélioré la résolution et la sensibilité permettant de détecter une synthèse de Bglc TYR. Par cette technique, nous envisagions aussi d'analyser quantitativement le devenir respectif du glucoside de tyrosine et de l'arylphorine lors de la mue nymphale. L'obtention de ces deux formes marquées a été réalisée mais l'expérience prévue n'a pas pu être poursuivie faute de temps. Nous avons signalé qu'il en allait de même pour la purification des arylphorines de différents Lépidoptères. Nous pouvons néanmoins résumer nos travaux par les principaux résultats acquis :

a - la forme glucosidique de stockage et de mobilisation de la tyrosine est bien caractéristique d'une part des Lépidoptères, d'autre part de leur métamorphose. En effet, le profil ontogénique de cette forme est différent de celui des molécules de stockage des Diptères ; nous sommes ici en présence d'un composé qui n'est ni "larvaire" (comme peuvent l'être les dipeptides des Diptères), ni "adulte", mais cantonné à la période de préparation et de déroulement de la métamorphose. Il serait intéressant dans cette optique de suivre la présence de la Bglc TYR au cours du développement chez le Diptère <u>Drosophila buskii</u> où elle a été mise en évidence (CHEN et coll., 1978). Cela permettrait de voir si sa présence n'est pas anecdotique et si son accumulation éventuelle est de type "Diptère" ou bien de type "Lépidoptère".

b - il existe chez les Lépidoptères, mais semble-t-il aussi plus généralement chez les insectes holométaboles, une classe parmi les protéines dites de stockage qui jouerait un rôle de premier ordre dans la gestion des acides aminés aromatiques au cours du développement. Ces arylphorines semblent pour l'instant jouer principalement le rôle de complément, pour le "long terme", à la forme de mobilisation rapide décrite précédemment. Ce rôle n'est cependant aucunement restrictif, et d'autres fonctions plus ou moins importantes sont actuellement aussi attribuées à ce groupe de protéines (SCHELLER, 1983).

Après ce que nous venons de dire, il est clair que les perspectives de travail sur ce sujet sont à la mesure de ce que nous avons laissé dans l'ombre ! Citons quand même les principaux axes de recherche qui nous paraissent prometteurs, d'une part dans une optique exploratoire ($) et de l'autre d'un point de vue plus appliqué ($$).

$- l'identification de l'activité Bglc-TYR synthétase, sa localisation tissulaire et ses propriétés apporteront des éléments sérieux à la compréhension de la dynamique fine de Bglc-TYR et permettront d'entreprendre l'étude des interactions moléculaires et cellulaires, notamment de type hormonal, gouvernant l'apparition de cette forme nouvelle. Par ailleurs, l'identification d'une nouvelle glucosyl transférase pourrait intéresser les chercheurs travaillant sur les glycosylations de protéines (voir BEYER et coll., 1981).

$- la même démarche, appliquée à la B glucosidase identifiée, permettrait de préciser si cette dernière activité est unique et sa localisation tissulaire constante. La récente mise en évidence de glucosides de catéchols cuticulaires chez les Lépidoptères (HOPKINS et coll., 1984) pose la question de leur dégradation lors de leur utilisation. Dans l'éventualité de la découverte de B glucosidases hémocytaires ou cuticulaires (WHITEHEAD, 1971), de telles enzymes pourraient-elles jouer un rôle régulateur clé dans le processus de sclérotisation et de mise en place des structures cuticulaires.

$- les insectes transportent à travers leurs divers compartiments des quantités considérables de tyrosine. L'étude des systèmes de transfert membranaires activés aux diverses étapes du développement pourrait révéler des propriétés intéressantes. Les mécanismes adoptés dans les divers tissus (hémocytes, tissu adipeux, intestin, cuticule ?) sont-ils analogues, et répondent-ils aux mêmes stimuli endocriniens ? Les réponses à ces questions devraient intéresser tant le biochimiste structural que le physiologiste.

$- un autre aspect important, et non des moindres, est celui de la biologie moléculaire de la synthèse et de l'incorporation de l'arylphorine. Cette protéine, quantitativement importante, permet

l'étude des mécanismes de sa synthèse sur le même tissu qui la réincorporera par la suite sous l'influence d'autres signaux hormonaux. C'est d'ailleurs ce modèle (calliphorine entre autres) qui a été choisi par des équipes de recherches allemandes et françaises (SCHELLER et coll. à WURZBURG; LEPESANT, SHENKEL et coll. à PARIS), pour éudier le mode d'action des ecdystéroïdes sur des cultures de corps adipeux.

$$- pour ce qui est de l'intérêt appliqué, plusieurs aspects peuvent être considérés ; l'objet initial de l'étude a été satisfait dès la synthèse chimique du composé Bglc TYR. Il a pu alors être incorporé aux taux voulus dans les milieux de cultures pour entomophages. Si les problèmes n'ont pas entièrement été résolus pour autant, cela a permis de s'affranchir (tout au moins quantitativement) du facteur réellement limitant que constituait l'apport en tyrosine.

$$- dans ce même cadre, il serait intéressant d'explorer un rôle éventuel de l'arylphorine dans les relations hôte-parasite. Si l'incorporation "commerciale" de cette protéine dans des milieux de cultures n'est pas envisageable comme pourrait l'être celle de Bglc TYR, des expériences dans cette optique permettraient peut-être d'éclairer et de préciser le rôle toujours bénéfique de l'incorporation d'hémolymphe d'insectes dans les milieux de cultures pour entomophages. La problématique est ici la même que celle rencontrée pour les cultures cellulaires avec l'adjonction de sérum de veau foétal. Ce n'est pas tant le rôle trophique que celui de facteur de croissance qui doit être apprécié ici.

$$- enfin, quelques autres aspects peuvent présenter des perspectives appliquées à plus long terme. Il s'agit d'une part des processus de sclérotisation et de formation de la cuticule. Les particularités des insectes dans ce domaine peuvent conduire à la mise en évidence de toxicités spécifiques intéressantes. A ce propos, signalons que l'attribution d'un certain mode d'action à une classe d'insecticides perturbant la mise en place de la cuticule a peut-être été un peu hative. En effet, des récents travaux (MAUCHAMP et coll., 1984) semblent montrer l'existence de chitine à des taux quasi-normaux dans des cuticules d'animaux traités par du diflubenzuron. Or, les benzoyl-urées avaient jusqu'alors été considérées comme agissant sur la synthèse de chitine. La remise en cause de cette donnée, de concert avec la structure chimique de ces insecticides, pourrait orienter les recherches sur des perturbations des voies de la sclérotisation.

$$- pour terminer, on peut théoriquement penser qu'une action au niveau de la B glucosidase pourrait perturber le déroulement normal de la mue des Lépidoptères (et d'eux seuls). Des essais de toxicité d'inhibiteurs de B glucosidases sont peut-être à envisager?

Ces dernières remarques un peu candides ont néanmoins la volonté de mettre l'accent sur une démarche somme toute assez récente dans les relations entre la physiologie de l'insecte et l'approche phytosanitaire. Jusque là, les physiologistes se "bornaient" à élucider les mécanismes d'action d'insecticides découverts par les chimistes, et éventuellement dans les meilleurs des cas à orienter les améliorations possibles. Les progrès de la biochimie et de la physiologie pourront-ils renverser ce shéma ? Ici, comme ailleurs, seuls les succès obtenus (par exemple avec les analogues ou antagonistes d'hormones des insectes) permettront de s'en assurer véritablement.

BIBLIOGRAPHIE

AHMED R.F.; HOPKINS T.L.; KRAMER K.J.(1983a)
Tyrosine and tyrosine glucoside titers in whole animals & tissues during development of the tobacco Hornworm Manduca sexta.
Insect Biochem. 13; 369-374

AHMED R.F.; HOPKINS T.L.; KRAMER K.J.(1983b)
Tyrosine glucoside hydrolase activity in tissues of Manduca sexta. effect of 20-OH ecdysone.
Insect Biochem. 13; 641-645

ALEXANDER P.; BARTON D.H.R. (1943)

Biochem. J. 37; 463-

ANDERSEN S.O.(1970)
Isolation of arterenone from hydrolysates of sclerotized insect cuticles
J. Insect Physiol. 16; 1951-1959

ANDERSEN S.O.(1976b)
Cuticular enzyme and sclerotization in insects
The Insect integument (ed. HEPBURN H.R.) 121-144; Elsevier

ANDERSEN S.O.(1979)
Biochemistry of insect cuticle
Ann. Rev. entomol. 29; 29-61

ANDERSEN S.O.; WEIS-FOGH T.(1964)
Resilin, a rubberlike protein in arthropod cuticle
Adv. Insect Physiol. 2; 1-65

ASHIDA M.; ISHIZAKI Y.; IWAHANA H.(1983)
Activation of pro-phenoloxydase by bacterial cell-walls or B 1;3 glucans in plasma of the silkworm Bombyx mori
Biochem. Biophys. Res. Comm. 113; 562-568

ASO Y.; KRAMER K.J.; HOPKINS T.L.; WHETZEL S.F.(1984)
Properties of tyrosinase and dopa quinone imine conversion factor from pharate pupal cuticle of Manduca sexta
Insect Biochem. 14; 463-472

ATLAN H.(1984)
Informatique et biologie
Biofutur 25; 13-14

BAKER C.R.D.; MILLER G.W.(1974)
Some effects of temperature and larval food on the development of S. littoralis (Boisd.) Lep. Noctuidae.
Bull. ent. Res. 63; 495-511

BALACHOWSKY A.(1950)
La destruction des insectes auxiliaires entomophages par les traitements insecticides et ses conséquences
C.R. Acad. Agric. 36; 6; 220-223

BENITO ESPINAL E.(1976)
Etude expérimentale et histologique de la réduction de fertilité de Spodoptera littoralis Boisduval par action de la température
Thèse de 3ème Cycle en Entomologie; Orsay 253

BENZECRI J.P.(1979)
L'analyse des données; T1 la classification / T2 l'analyse des correspondances
DUNOD (3ème éd.)

BERNAYS E.A.; CHAMBERLAIN D.J.; WOODHEAD S.(1983)
Phenols as nutrients for a phytophagous insect Anacridium melanorhodon
J. Insect Physiol. 29; 535-539

BEYER T.A.; SADLER J.E.; REARICK J.I.; PAULSON J.C.; HILL R.L.(1981)
Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure fonction relationship
Adv. Enzymol. 52; 23-176

BISHARA I.(1934)
The cotton worm; Prodenia litura in Egypt
Bull. Soc. Roy. Entomol. Egypte XVIII; 228-404

BODDNARYK R.P.(1972b)
A survey of the occurence of B alanyl tyrosine gamma glutamyl phenylalanine and tyrosine O phosphate in the larval stage of flies (Diptera)
Comp. Biochem. Physiol. 43b; 587-592

BODNARYK R.P.(1978)
Structure and function of insect peptides
Adv. Insect Physiol. 13; 69-132

BODNARYK R.P.; BRUNET P.C.J.; KOEPPE J.K.(1974)
On the metabolism of N acetyl dopamine in periplaneta americana
J. Insect Physiol. 20; 911-923

BONNOT G.; DELOBEL B.; GRENIER S.(1976)
Composition corporelle en acides aminés du parasitoide Phryxe caudata (Dipt.) au cours de sa croissance larvaire.
J. Insect Physiol. 22; 505-514

BOUTHIER A. (1984)
Metabolisme du tryptophane chez Locusta pendant le dernier stade larvaire
Communication 7ème Colloque Physiol. ins DIJON; sept. 84

BRADFORD M.(1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding
Anal. Biochem.72; 248-254

BRUNET P.C.J. ; COLES B(1971)
Tanned silks
Proc. R. soc. 187b; 133-170

BRUNET P.C.J.(1980)
The metabolism of aromatic aminoacids concerned in the cross-linking of insect cuticle
Insect Biochem. 10; 467-500

BRUNET P.C.J.; KARLSON J.(1979)
An enzyme in the cockreache Periplaneta americana that appears to be concerned with pheromone release
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360; 451-455

BRUNET P.C.J.; KENT P.W.(1955a)
Mechanism of sclerotin formation; the participation of a B glucoside
Nature; Lond. 175; 819-

BUCKNER J.S.; CALDWELL J.M.(1980)
Uric acid levels during last larval instar of Manduca sexta. An abrupt transition from excretion to storage in fat body
J. Insect Physiol. 26

BURSELL E.(1970)
Somatic physiology ; metabolism
An introduction to insect physiology; Acad. Press; p 3-27

BUTENANDT A.(1960)

Proc. 17ª int. Congr. pure & applied Chem. MUNICH 2; 11

BUTENANDT A.; GROSCHEL U.; KARLSON P.; ZILLIG W.(1959)
Uber N-acetyltyramin seine isolierung aus Bombyx-puppen und seine chemischen und biologischen eigenschaften
Arch. Biochem. Biophys. 83; 76-83

CALVEZ B.; HIRN M.; DE REGGI M.(1976)
Ecdysone changes in the haemolymph of two silkworms (Bombyx mori and Philosamia cynthia) during larval and pupal development
FEBS lett. 71; 57-61

CHARARAS C.; CHIPOULET J.M.(1982)
Purification by chromatography and properties of a B glucosidase from the larvae of Phoracantha semipunctata
Comp. Biochem. Physiol. 72 B

CHEESMAN D.F.; LEE W.L.; ZAGALSKY P.F.(1960)

Biol. Rev. 42; 132-160

CHEN P.S.; MITCHELL H.K.; NEUWEG M.(1978)
Tyrosine glucoside in Drosophila buskii
Insect Biochem. 8; 279-286

CHERBAS P.T.(1973)
Biochemical studies of insecticyanin
Thesis Harvard Univ. CAMBRIDGE. MASS

CHOUSSY M.; LARROUQUERE J.; BARBIER M.; LAMY M.(1973)
Les proteines de l'hemolymphe de la processionnaire du pin Thaumetopoea pityocampa. Etude des pigments associés aux chromoproteines.
C. R. Acad. Sc. PARIS 277; 365-368

COLLET J.R.(1976)
Peptidase mediated storage of aminoacids in small peptides
Insect Biochem. 6; 179-185

COLLINS J.V.(1974)
hormonal control of protein sequestration in the fat body of Calpodes ethlius (Stoll)
Can. J. Zool. 52; 639-646

CRAMER H.H.(1970)
La protection des plantes et les récoltes dans le monde
Pflanzenschutz-Nachrichten; Bayer 20

DADD R.H.(1973)
Insect nutrition; current developments and metabolic implications
Ann. Rev. Entomol. 18; 381-420

DAGNELIE(1969)
Théorie et méthodes statistiques; applications agronomiques I et II
Les Presses Agronomiques de Gembloux

DE REGGI M.L.; HIRN M.H.; DELAAGE M.A.(1975)
Radioimmunoassay of ecdysone; an application to Drosophila larva and pupa
Biochem. Biophys. Res. Commun. 66; 1307-1315

DELOBEL B.; ANKER D.; GRENIER S.(1984)
Synthèse chimique de la B-D-glucopyranosyl-O-tyrosine et utilisation par un insecte endoparasite
Soumis à Reprod. Nutr. Develop.

DUCHATEAU-BOSSON G.; JEUNIAUX C.; FLORKIN M.(1962)
Contribution à la biochimie du ver à soie. Variations de la concentration de la tyrosine de l'hémolymphe au cours du développement de Bombyx mori
Arch. Int. Physiol. Bioch. 70; 287-291

ENDERLE U.; KAUSER G.; REUM L.; SCHELLER K.; KOOLMAN J.(1983)
Ecdysteroids in the haemolymph of blowfly larvae are bound to calliphorin
Larval Serum proteins of insects (G. Thieme Verlag)

EVANS P.D.(1980)
Biogenic amines of the insect nervous system
Adv. Insect Physiol. 15; 318-474

FRAENKEL G.; RUDALL K.M.(1940)
A study of the physical and chemical properties of the insect cuticle
Proc. R. soc. 129 B; 1-35

FRAGOULIS E.G.; SEKERIS C.E.(1975)
Purification and characteristics of DOPA decarboxylase from the integument of Calliphora vicina larvae
Arch. Biochem. Biophys. 168; 15-25

FUKUDA T.(1956)
Conversion of phenylalanine into tyrosine in the silkworm larva (Bombyx mori)
J. Biochem. TOKYO 43; 137

GILMOUR D.(1961)
Intermediate metabolism of nitrogen compounds
The Biochemistry of insects; Acad. Press; 235-290

GIRARDIE A.(1980)
Controle neurosécrétoire du développement post embryonnaire des insectes
Bull. Soc. Zool. FRANCE 105; 1-

HACKMAN R.H.(1974)
Chemistry of insect cuticle
The physiology of insecta; Vol. 6 (ed. ROCKSTEIN); 216-270

HACKMANN R.H.; GOLDBERG M.(1979)
Some conformational studies of larval cuticular protein from Calliphora vicina
Insect Biochem. 9; 557-561

HAINES L.C.(1982)
External sexual characters of Spod. littoralis (Boisd.) and S. exempta (Walk) (Lep. Noct.) and their use for sexing live larvae
Bull. ent. Research 72; 3; 403-408

HASSAN A.S.; MOUSSA M.A.; NASR E.A.(1960)
Behaviour of larvae and adults of the cotton leaf worm Prodenia litura (Fabr.)
Bull. Soc. Entomol. Egypte XLIV; 337-343

HENRY(1962)
The significance of microorganisms in the nutrition of insects
Trans. N.Y. Acad. Sci. 24;676

HOPKINS T.L.; MORGAN T.D.; KRAMER K.J.(1984)
Catecholamines in haemolymph and cuticle during larval; pupal and adult development of M. sexta
Insect Biochem. 14; 533-540

HOPKINS T.L.; WIRTZ R.A.(1976)
DOPA and tyrosine decarboxylase activity in tissues of Periplaneta americana in relation to cuticle formation and ecdysis
J. Insect Physiol. 22; 1167-1171

HOPKINS; MURDOCK; WIRTZ(1971)
Tyrosine side chain metabolism in larval and adult cockroach in Periplaneta americana; post-ecdysial patterns
Insect Biochem. 1; 97-101

ISHAAYA I.(1972)
Studies of the hemolymph and cuticular phenoloxydase in Spodoptera littoralis larvae
Insect Biochem. 2; 409-419

ISHAAYA I.; NAVON A.(1974)
Phenoloxydase activity at various stages of development in the egyptian cotton worm Spodoptera littoralis
Insect Biochem. 74; 67-73

ISOBE M.; KONDO N.; MAI K.; YAMASHITA O.; GOTO T.(1981)
Glucosyltyrosine in silkworm haemolymph as a transcient metabolite of insects
Agric. Biol. Chem. 45

JACOBS M.E.(1978)
B alanine tanning of Drosophila cuticles and chitin
Insect Biochem. 8; 37-41

JARCZYK H.J.; JARCZYK M.; FLASCHENTRAEGER B.(1957)
Contribution to the biology and biochemistry of the cotton leaf worm Prodenia litura F. (I)
Bull. Soc. Entomol. Egypte XLI; 621-626

KAMINSKY M.(1979)
La pratique de l'immunoélectrophorèse
Coll. techniques de laboratoires; 1; MASSON

KARLSON P.; SCHLOSSBERGER-RAECKE I.(1962)
Zum Tyrosinstoffwechsel der insecten VIII Die sklerotisierung der cuticula bei der Wildform und der albinomutante von Schistocerca gregaria
J. Insect Physiol. 8; 441-452

KARLSON P.; SEKERIS C.E.(1962a)
N-acetyl dopamine as sclerotizing agent of the insect cuticle
Nature 195; 183-184

KARLSON P.; SEKERIS C.E.(1962b)
Zum Tyrosinstoffwechsel der insecten IX Kontrolle des Tyrosinstoffwechsels durch ecdyson
Biochim. Biophys. Acta 63; 489-495

KASTINGS R.; McGINNIS A.J.(1962)
Nutrition of the pale western cutworm Agrotis orthogonia Morr. IV Aminoacid requirements whith glucose -U-14C
J. Insect Physiol. 8; 97-103

KAWAGUSHI Y.; DOIRA H.(1973)
Gene-controlled incorporation of hemolymph protein into the ovaries of B. mori
J. Insect Physiol. 19; 2083-2096

KOEPPE J.K.; GILBERT L.I.(1974)
Metabolism and transport of a possible pupal cuticle tanning agent in Manduca sexta
J. Insect Physiol.; 981-992

KRAMER K.J.; HOPKINS T.L.; AHMED R.F.; MUELLER D.; LOOKHART G.(1980)
Tyrosine metabolism for cuticle tanning in the tobacco hornworm M. sexta & other Lepidoptera. Identification of B-D-glucopyranosyl O-L-tyrosine & other metabolites
Arch. Biochem. & Biophys. 205; 146-155

KRAMER S.J.; MUNDALL E.C.; LAW J.H.(1980)
Purification and properties of manducin an aminoacid storage protein of the haemolymph of larval & pupal M. sexta
Insect Biochem. 10; 279-288

LAEMMLI U.K.(1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4
Nature 227; 680-685

LAFON-CAZAL M.(1978)
Les neurotransmetteurs des insectes
Année biol. 17; 489-528

LAMBIN P.; FINE J.M.(1979)
Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in linear polyacrylamide gradient gels in the absence of denaturing agents
Anal. biochem. 98; 160-168

LEHNINGER A.L.(1981)
BIOCHIMIE
FLAMMARION MEDECINE / SCIENCES

LEPESANT J.A.; LEVINE M.; GAREN A.; KEJZLAROVA-LEPESANT J.; RAT L.; SOMME-MARTIN G.(1982)

J. molec. Applied Genetics 1; 371-383

LEVENBOOK L.(1958)
Intracellular water of larval tissues of the southern armyworm as determined by the use of 14C carboxyl inuline
J. Cell Comp. Physiol. 52; 329-339

LEVENBOOK L.(1983)
The structure and function of calliphorin
in "The larval serum proteins of insects"; G. Thieme Verlag NEW YORK; 1-17

LEVENBOOK L.; BAUER A.C.(1984)
The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of Calliphora vicina
Insect Biochem. 14; 77-86

LEVENBOOK L.; BODNARYK R.P.; SPANDE T.F.(1969)
B alanyl tyrosine; chemical synthesis properties and occurence in larvae of the fleshfly Sarcophaga bullata
Biochem J. 113; 837-841

LIPKE H.; FRAENKEL G.(1956)
Insect nutrition
Ann. Rev. Entomol. 1; 17-44

LIPKE H.; HENZEL W.(1981)
Arylated peptides of sarcophagid cutucle
Insect Biochem. 11; 445-451

LOCKE J.; McDERMID H.; BRAC T.; ATKINSON B.G.(1982)
Developmental changes in the synthesis of haemolymph polypeptides and their sequestration by the prepupal fat body in Calpodes ethlius
Insect Biochem. 12; 431-440

LOCKE M.(1969)
The localisation of a peroxidase associated with hard cuticle formation in an insect
Tissue & Cell 1; 555-574

LOCKE M.; COLLINS J.V.(1968)
Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect
J. Cell. Biol. 36; 453-483

LU P.W.; KRAMER K.J.; SEIB P.A.; MUELLER D.D.; AHMED R.F.; HOPKINS T.L.(1982)
B-D-glucopyranosyl O-L-tyrosine. Synthesis; properties and titer during insect development.
Insect Biochem. 12; 377-381

LUNAN K.D.; MITCHELL H.K.(1969)
The metabolism of tyrosine O phosphate in Drosophila
Arch. Biochem. Biophys. 132; 450-456

MANOUKAS A.G.(1972)
Total aminoacids in hydrolysates of the olive fruit fly Dacus oleae grown in an artificial diet and in olive fruit
J. Insect Physiol. 18; 683-688

MANSINGH A.(1976)
Physiological strategies in integrated pest management
Proc. Nat. Acad. Sci. INDIA 46B I&II; 77-100

MARANDA B.; HODGETTS R.(1977)
A characterization of dopamine acetyltransferase in Drosophila melanogaster
Insect Biochem. 7; 33-43

MASON H.S.(1948)
The chemistry of melanins
J. Biol. Chem. 172; 83-99

MAUCHAMP B.(1984)
La cuticule des insectes
Comm. Coll. Physiol. Insecte DIJON

MAXWELL G.D.; TAIT G.F; HILDEBRAND J.G.(1978)
Regional synthesis of neurotransmitter candidates in the C.N.S. of the moth M.sexta
Comp. Biochem. Physiol. 61C; 109-119

MEHENDALE H.M.; DOROUGH H.W.(1972)
In vitro glucosylation of 1 NAPHTOL in insects
J. Insect Physiol. 18; 981-990

MESTRES G.(1967)
Contribution à l'étude de l'hémolymphe d'un insecte; Galleria mellonella . pH et pression osmotique.
Thèse de 3ᵉ cycle; Univ. de LYON 261

MILLER G.W.(1977)
Mortality of Spodoptera littoralis at non freezing temperatures
Bull. Entomol. Res. 67; 143-152

MILLER S.G.; SILHACEK D.L.(1982)
Identification of storage proteins in tissues of the greater wax moth Galleria mellonella
Insect Biochem. 12; 277-292/293-300

MORINEAU A.; LEBART L.; FENELON J.P.(1981)
L'analyse des données
DUNOD

MUNN E.A.; FEINSTEIN A.; GREVILLE G.D.(1971)
The isolation and properties of the protein calliphorin
Biochem. J. 124; 367-374

McDERMID H.; LOSKE M.(1983)
Tyrosine storage vacuoles in insect fat body
Tissue & Cell 15; 137-158

NAKAMURA K.; INOKUCHI T.(1977)
Free aminoacids in the meconium and distribution of histidine in the pupa of the silkworm B. mori
J. Seric. Sci. Jap. 46; 125-129

NEDERGAARDS S.(1972)
Active transport of alpha amino isobutyric acid by the isolated midgut of Hyalophora cecropia
J. Exp. Biol. 56; 167-172

NEVILLE A.C.(1975)
Biology of the arthropod cuticle
Zoophysiology and ecology 4/5; Springer-Verlag NEW YORK

PASQUET;(DELOBEL B.)(1982)
Modalités de stockage des acides aminés aromatiques chez les larves de Lépidoptères
Mémoire de D.A.A. de l'I.N.A.-P.G.

PAU R.N.; ACHESON R.M.(1968)
The identification of 3 hydroxyl 4-O B D glucosidobenzyl alcohol in the left colleterial gland of Blaberus discoidalis
Biochem. Biophys. Acta 158; 206-211

PENCE R.J.(1963)
The antimetabolite imidazole as a pesticide
J. Econ. Entomol. 56; 1-7

PETERSON G.L.(1977)
A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.
Anal. Biochem. 83; 346-356

PLANTEVIN G.; DE REGGI M.; NARDON C.(1984)
Changes in ecdysteroid and juvenile hormone titer in the haemolymph of Galleria mellonella larvae and pupae
Gen. Comp. endocrinology 56

POITOUT S.; BUES R.(1974)
Elevage de chenilles de 28 espèces de Lépidoptères Noctuidae et de 2 espèces d'arctiidae sur milieu artificiel simple.Particularités de l'élevage selon les espèces
Ann. Zool. Ecol. Anim. 6; 3; 431-441

POITOUT S.; BUES R.; LE RUMEUR C.(1972)
Elevage sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton Earias insulana et Spodoptera littoralis
Ent. exp. & appl. 15; 341-350

POST L.C.(1972)
Bursicon. its effect on tyrosine permeation into insect haemocytes
Biochim. Biophys. Acta 290; 424-428

PRATT J.J.; HOUSE H.L.; MANSINGH A.(1972)
Insect control strategies based on nutritional principles; a prospectus
Insect and Mite Nutrition; 651-655 ; Ed. J.G. RODRIGUEZ; ELSEVIER

PROTA G.; THOMSON R.H.(1976)
Melanin pigmentation in mammals
Endeavour 35; 124-

PRYOR M.G.(1940)
On the hardening of the ootheca of Blatta orientalis
Proc. roy. Soc. B 128; 378-393

RICHARDS G.(1978)
The chemistry of insect cuticle
Biochemistry of insects ;ROCKSTEIN Acad. Press.; 203-232

RIDDIFORD L.M.; LAW J.H.(1983)
Larval serum protein of Lepidoptera
The larval serum protein of insects; SCHELLER K. Ed.; G. THIEME VERLAG BERLIN; p 75-85

ROTH L.M.; STAY B.(1958)

J.Insect Physiol. 1; 305-

RYAN R.O.; SCHMIDT J.O.; LAW J.H.(1984)
Arylphorin from the larval haemolymph of the honeybee Apis mellifera
Insect Biochem. 14; 515-520

SCHELLER K.(1982)
The larval serum proteins of insects
Eur. J. Cell Biol. 28; 281-282

SCHELLER K.; ZIMMERMANN H.P.; SEKERIS C.E.(1980)
Calliphorin. A protein involved in cuticle formation of the Blowfly
Z. Naturforsch. 35c; 387-389

SCHENKEL H.; MYLLEK C.; KONIG M.; HAUSBERG P.; SCHELLER K.(1983)
Calliphorin. Studies on its biosynthesis and function
in "The larval serum proteins of insects"; SCHELLER Georg Thieme Verlag NEW YORK; 18-39

SCHLORER J.(1970)
Uber die activitat der phenylalanin 4 hydroxylase und des N acetyl dopamine glucosid bildenden systems in vivo im Verlauf der Entwicklung von Colliphora erythrocephala (M.)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351; 1035-1040

SCHUSTER R.(1980)
Détermination of the aminoacids by high performance liquid chromatography
Anal. Chemistry 52; 617

SCHWARTZ D.(1983)
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes
Flammarion

SHILDKNECHT H. (1957)

Angew. Chem. 69; 62-

SIDIBE B.(1976)
Particularités du cycle biologique de Spodoptera littoralis Boisduval en fonction de différentes conditions thermophotopériodiques
Thèse de 3ème Cycle en Entomologie; Orsay 142

STRAMBI C.; STRAMBI A.; DE REGGI M.; HIRN M.H.; DELAAGE M.A. (1981)
Radioimmunoassay of insect juvenile hormones and their diol derivatives
Eur. J. Biochem. 118; 401-406£

SUGUMARAN M.; LIPKE H.(1982)
Crosslink precursors of the dipteran puparium
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79; 2480-2484

SUTCLIFFE D.W.(1963)
The chemical composition of haemolymph in insects and some other arthropods in relation to their phylegeny
Comp. Biochem. Physiol. 9; 121-135

TAKAHASHI S.Y.(1971)
Accumulation of 4-O B-D-glucoside of protocatechuic acid in the left colleterial gland of the cockroach Periplaneta americana. I Properties of glucoside synthetase
Devel. Growth Differ. 13; 131-139

TAZIMA Y.()
The silkworm; an important laboratory tool
KODANSSHA Tokyo

TELFER W.H.; KEIM P.S.; LAW J.H.(1983)
ARYLPHORIN.a new protein from Hyalophora cecropia; comparisons with calliphorin & manducin
Insect Biochem 13; 601-613

THOMSON J.A.; RADOK K.R.; SHAW D.C.; WHITTEN M.J.; FOSTER G.G.; BIRT L.M.(1976)
Genetics of lucilin a storage protein from the sheep blowfly Lucilia cuprina
Biochem. Genet. 14; 145-160

TOJO S.; NAGATA M.; KOBAYASHI M.(1980)
Storage proteins in the silkworm Bombyx mori
Insect Biochem. 10; 289-303

VAISANEN V.T.; MACKENZIE P.I.; HAININEN O.O.(1983)
UDP Glucosyl transferase and its kinetic fluorimetric assay
Eur. J. Biochem. 130; 141-145

VOLKNANDT W.; HARDELAND R.(1978)
Circadian rythmicity of tyrosine amino transferase activity in larval and prepupal fat body of D. melanogaster
J. interdiscipl. Cycle Res. 9; 283-291

VUILLAUME M.; DATTEE Y.(1980)
Photostimulation de la production d'ATP dans le tégument d'un insecte; interprétation physiologique des analyses in vivo et in vitro
Arch. Zool. exp. gén. 121; 159-172

WALDBAUER G.P.(1968)
The consumption and utilisation of food by insects
Adv. Insect Physiol. 5; 229-288

WEIS-FOGH T.(1961a)
Thermodynamic properties of resilin a rubber-like protein.
J. mol. Biol. 3; 520-531

WEIS-FOGH T.(1961b)
Molecular interpretation of the elasticity of resilin a rubber-like protein
J. mol. Biol. 3; 648-667

WELINDER B.S.; ROEPSTORFF P.; ANDERSEN S.O.(1976)
The crustacean cuticle IV Isolation and identification of cross-links from Cancer pagurus cuticle
Comp. Biochem. Physiol. 53 B; 529-533

WHITEHEAD D.L.(1971)
Some evidence for the likely mechanism of action of the hormone that initiates sclerotization
Insect endocrines ed. NOVAK et SLAMA; 156-166; Pergamon Press

WHITEHEAD D.L.(1972)
Ecdysone and the stabilization of insect cuticle
J. Endocrinol. 57; 1

WICKER C.; GUILLAUD J.; BONNOT G.(1984)
Comparative composition in free peptidic and proteic aminoacids of symbiotic and aposymbiotic Sitophilus oryzae (Coleoptera curculionidae)

Insect Biochem. sous presse

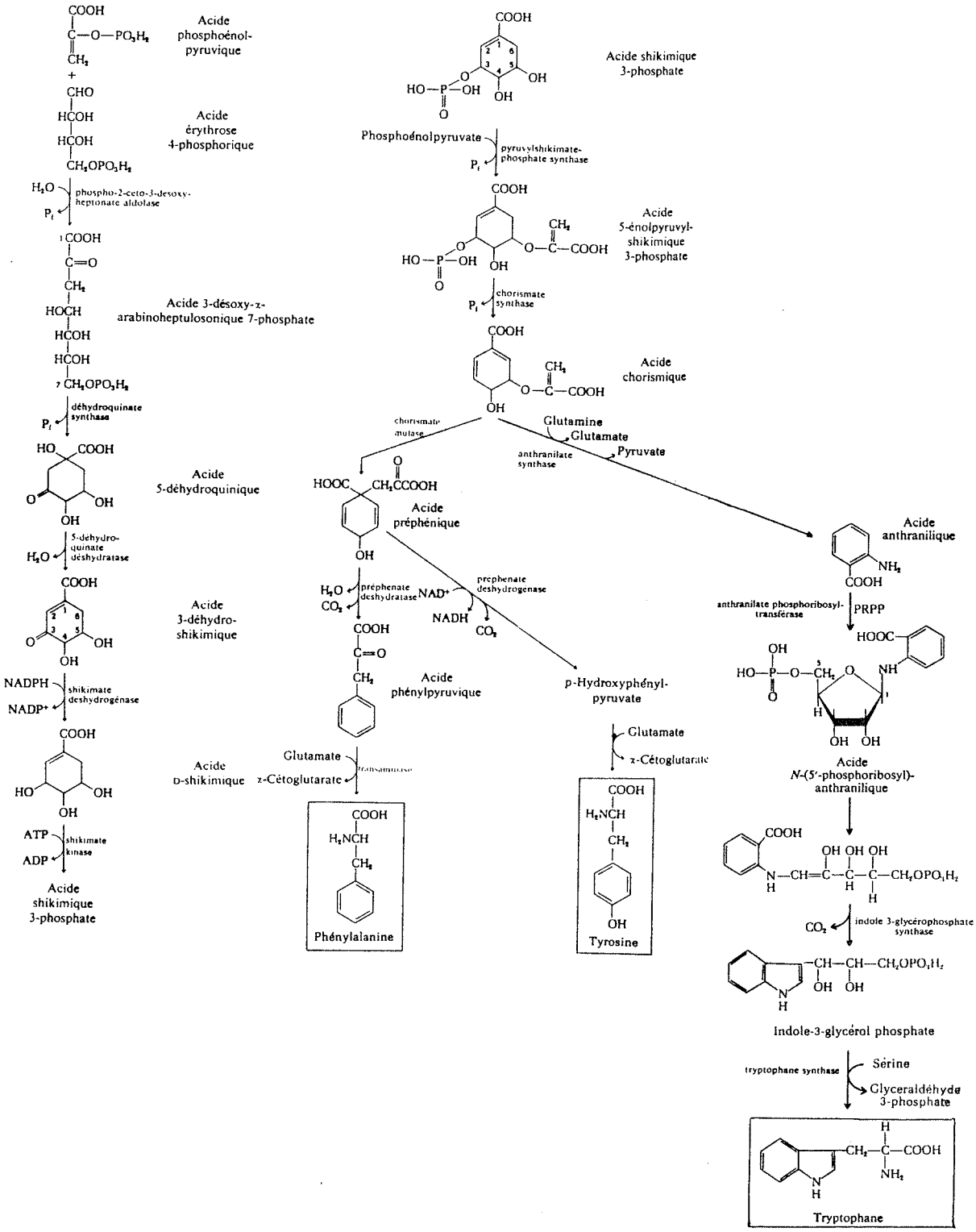
WICKER C.; NARDON P.(1982)
Development responses of symbiotic and aposymbiotic weevils Sitophilus oryzae (Col. curculionidae) to a diet supplemented with aromatic aminoacids
J. Insect Physiol. 28; 1021-1024

WIGGLESWORTH V.B.(1970)
Structural lipids in the insect cuticle and the fonction of the oenocytes
Tissue Cell 2; 155-179

WOLFE J.; AKAM M.R.; ROBERTS D.B.(1977)
Biochemical and immunological studies on Larval Serum Protein 1 the major haemolymph protein of Drosophila melanogaster
Eur. J. Biochem. 79; 47-53

ANNEXE n°1

Biosynthèse des acides aminés aromatiques chez les microorganismes (LEHNINGER, 1981)



ANNEXE n°2

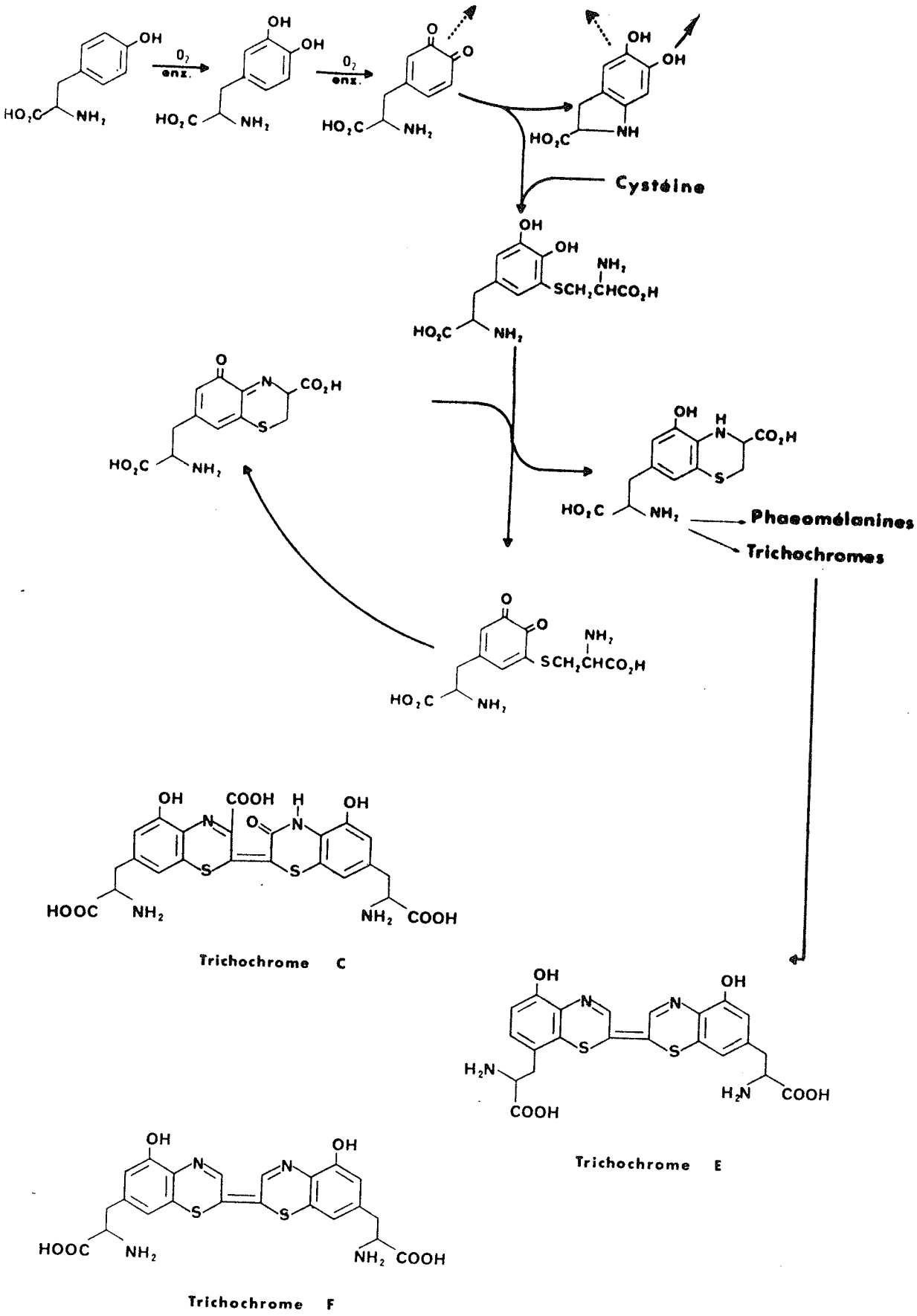
Références pour le chapitre A 2 :
Espèces étudiées
Auteurs des travaux
Commentaire succint sur les composés identifiés

xx	Espèce étudiée	référence	Commentaire
1	Schistocerca gregaria	WEIS-FOGH, 1961 a et b	résiline/ réseau par résidus TYR
2	Schistocerca gregaria	ANDERSEN et WEIS-FOGH, 1964	di et tri-tyrosine / résiline
3	Calliphora érythrocéphala	MUNN et coll., 1969	calliphorine
4	Manduca sexta	KRAMER SJ et coll., 1980	manducine
5	Manduca sexta	MAXWELL et coll., 1978	amines biogènes dans le S.N.C.
6		ALEXANDER et BARTON, 1943	p benzoquinone
7		ROTH et STAY, 1958	p benzoquinone
8	Brachinus	SHILDKNECHT, 1957	quinones de défense
9	Sarcophaga bullata	LEVENBOOK et coll., 1969	beta alanyl TYR
10	Musca domestica	BODNARYK, 1972 b	gamma glutamyl PHE
11		BRUNET et COLES, 1974	glucosides de composés phénoliques
12	Sarcophaga bullata	SEKERIS, 1964	Bglc NADA / cuticules de diptères
13	Drosophila buskii	CHEN et coll., 1978	Bglc TYR / hémolymphe de diptère
14	Manduca sexta	KRAMER KJ et coll., 1980	Bglc TYR / hémolymphe de lépido.
15	Periplaneta americana	BRUNET et KENT, 1955	glucoside d'acide catécholique
16	Blaberus discoidalis	PAU et ACHESON	glucoside d'alcool catécholique
17	Tenodera aridifolia	KAWASAKI et YAGO, 1983	glucosides d'N acyl dopamines
18	Mantis religiosa	YAGO et coll., 1983	dans les glandes collétérales
19	Hierodula patellifera	YAGO et KAWASAKI, 1984	de divers Mantides
20	Manduca sexta	HOPKINS et coll., 1982	glucoside d'N B alayl DA / lépido.
21	Drosophila melanogaster	LUNAN et MITCHELL, 1969	TYR-O-phosph./hémolymphe de diptère
22	Periplaneta americana	BODNARYK et coll., 1974	Ph. et sulfates de dopamine / "
23	Periplaneta americana	BRUNET et KARLSON, 1979	
24	Pieris brassicae	ANDERSEN, 1979	cétocatéchols de la cuticule
25	Mammestra configurata	WEATHERSON et PERCY, 1976	phéromone dérivée de PHE
26	Drosophila melanogaster	VOLKNANDT et HARDELAND, 1978	rythmicité de la synthèse de DA
27	Drosophila melanogaster	MARANDA et HODGETTS, 1977	localisation de la synthèse de DA
28	Calliphora érythrocéphala	SCHLORER et coll., 1970	Phénylalanine-4-hydroxylase
29	Spodoptera littoralis	ISHAAYA, 1972	O-diphénoloxydase / cuticule
30	Locusta migratoria	ANDERSEN, 1976 b	laccase cuticulaire
31	Calpodes ethlius	LOCKE, 1969	peroxydase cuticulaire / histologie

ANNEXE n°3

Synthèse des mélanines soufrées chez les vertébrés

(d'après PROTA et THOMSON, 1976)



ANNEXE n°4

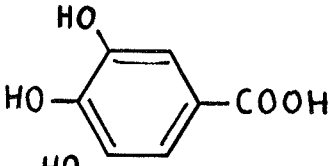
Fonctions et localisation des amines biogènes dans le système nerveux des insectes

(d'après EVANS, 1980)

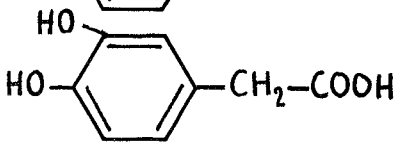
Système	action sur	amine	fonction
Périphérique "effets sympathiques"			
	muscles squelettiques	OCTOPAMINE	Neuromodulateur
	muscles viscéraux	DOPAMINE 5-OH TRYPTAMINE OCTOPAMINE	Neurotransmetteurs et Neuromodulateurs
	stimulation du métabolisme des glucides dans: muscles squel., corps gras, chaine nerveuse	OCTOPAMINE(?)	Neurohormone
"effets épithéliaux"			
	glandes salivaires	DOPAMINE 5-OH TRYPTAMINE	Neurotransmetteur Neurohormone
	organes lumineux	OCTOPAMINE	Neurotransmetteur
	épiderme (plasticisation de la cuticule)	5-OH TRYPTAMINE (?)	Neurotransmetteur
	épiderme (antenne moustique)	?	Neurotransmetteur
Central			
	cerveau et chaine nerveuse ventrale	OCTOPAMINE, DOPAMINE, NOR ADRENALINE(?)	Neurotransmetteurs et Neuromodulateurs(?)

ANNEXE n°5

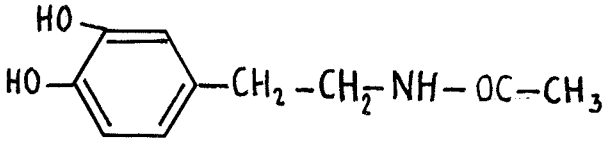
Structure chimique des aglycones des glucosides "phénoliques" du tableau 1. (glucosides "phénoliques" des insectes)



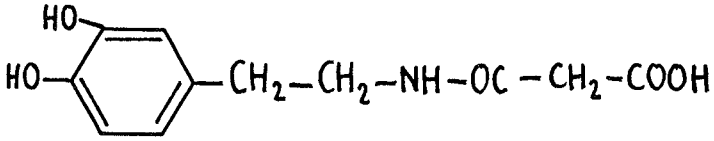
ACIDE PROTOCATECHUIQUE



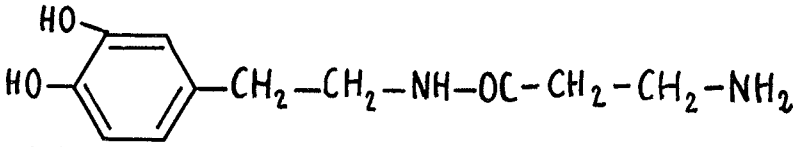
ACIDE DIHYDROXYBENZYLIQUE



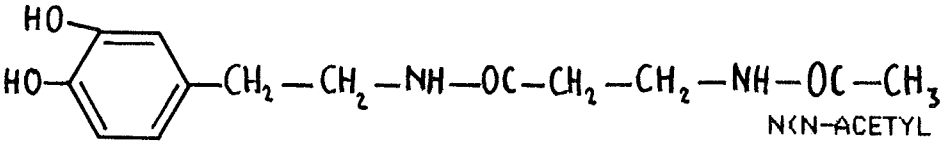
N-ACETYL DOPAMINE



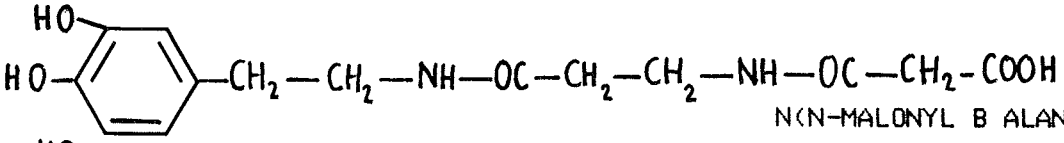
N-MALONYL DOPAMINE



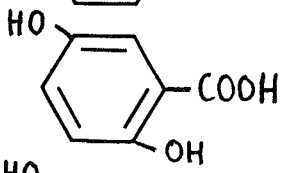
N B-ALANYL DOPAMINE



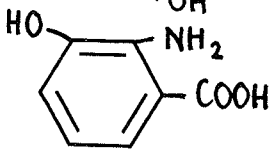
N(N-ACETYL B ALANYL) DOPAMINE



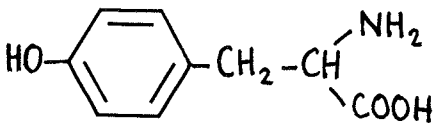
N(N-MALONYL B ALANYL) DOPAMINE



ACIDE GENTISIQUE



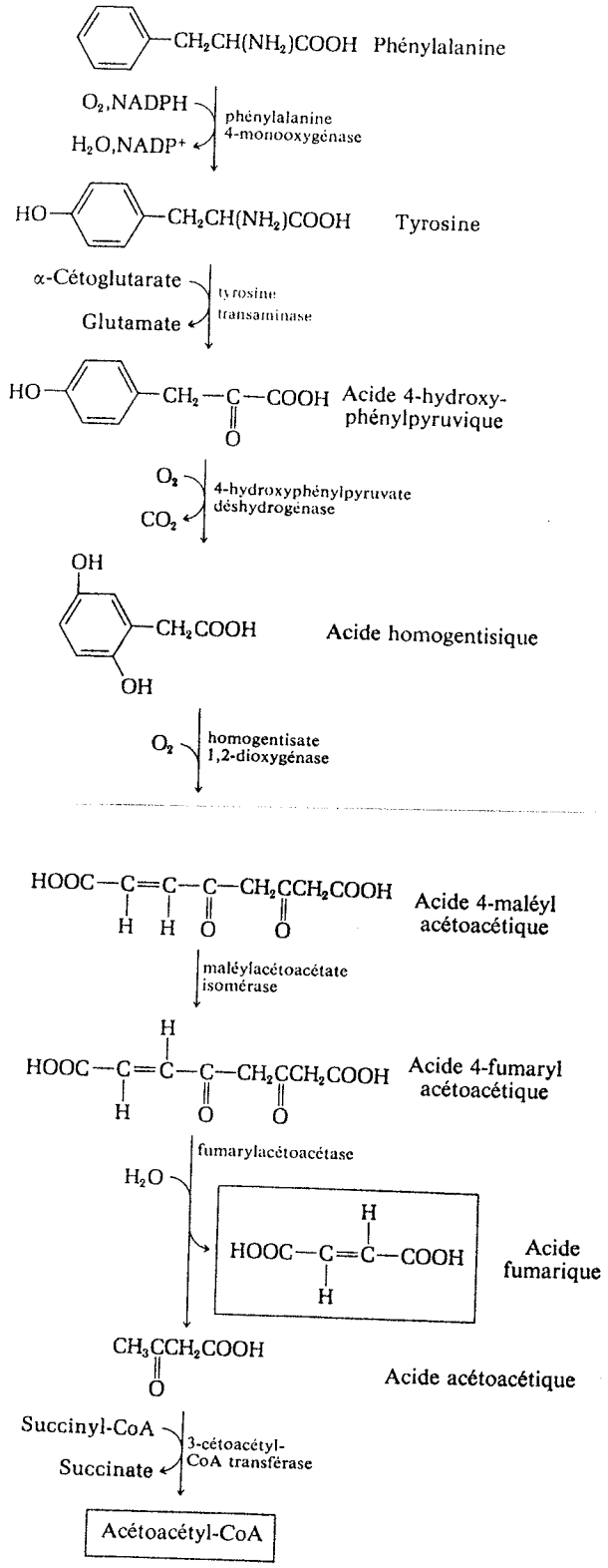
ACIDE 3-HYDROXYANTHRANILIQUE



TYROSINE

ANNEXE n°6

Voie de dégradation de la tyrosine chez les mammifères (LEHNINGER ; 1981)



ANNEXE n° 7

Texte et illustrations d'un article soumis en septembre 1984 à
ENTOMOLOGIA EXPERIMENTALIS ET APPLICATA

6 pages d'annexe

Utilisation d'un nouveau gel dans des milieux conditionnés, pour l'élevage d'un lépidoptère phytophage, Spodoptera littoralis (Boisd.)

RAHBE, Y.;BROCHON, M.J.(§); NARDON, P.

Laboratoire de biologie 406, INSA, 20 av.A.EINSTEIN 69621 VILLEURBANNE Cedex

(§) KORANO S.A., LA BALME-LES-GROTTES 38390 MONTALIEU VERCIEU

mots clés: consommation, croissance, développement, gélifiant, milieu d'élevage, Noctuidae, Spodoptera littoralis.

RESUME : La nutrition, la croissance, le développement et la mortalité de Spodoptera littoralis ont été évalués sur différents milieux artificiels. Par rapport au milieu témoin de POITOUT et coll.(1972), nos milieux présentent deux caractéristiques importantes : d'une part le remplacement de l'agar par deux nouveaux gélifiants moins couteux, et d'autre part ceux-ci permettent le conditionnement à sec des composants sous forme de doses ensachées prêtes à l'emploi (stockées à 4°C). Au moment de l'utilisation, il suffit de mélanger la dose choisie à de l'eau distillée stérile chauffée entre 60 et 70°C.

Nous avons vérifié que les deux gélifiants ne présentent aucun inconvénient par rapport à l'agar utilisé jusqu'alors. L'autoclavage du conditionnement à sec ne s'avère pas indispensable, ni la pasteurisation des éléments les moins stables. L'utilisation du cristal violet comme antiseptique a été testée.

Ces nouveaux milieux conditionnés en doses prêtes à l'emploi permettent une très grande facilité de stockage et de conservation, une grande souplesse d'utilisation, et un précieux gain de temps pour leur réalisation. La survie, le développement et la croissance de Spodoptera littoralis sur ces milieux (M1 et M2b) sont plutot meilleurs que sur ceux à base d'agar.

INTRODUCTION

De nombreux insectes, et notamment des Lépidoptères, peuvent s'élever en laboratoire sur des milieux nutritifs artificiels gélosés. Pour les Lépidoptères phytophages, ces milieux, bien que parfaitement maitrisés, sont cependant sources de nombreuses contraintes tant au niveau de la fabrication (problèmes d'homogénéité, mobilisation des personnels ...) que de la conservation, surtout si leur utilisation n'est pas nécessairement régulière. De nombreux laboratoires pourraient donc etre interéssés (SINGH, 1983) par des milieux polyvalents et souples d'emploi, stériles, stables et de composition constante.

Nous présenterons ici des essais d'élevage d'une noctuelle polyphage, Spodoptera littoralis, sur des milieux conditonnés (doses ensachées prètes à l'emploi) incorporant un gélifiant nouveau déjà utilisé en bactériologie. Le milieu témoin d'élevage, à partir duquel est tirée la composition de base des diverses formules testées, est celui de POITOUT et coll.(1972); il a été choisi pour sa composition assez simple, et ayant permis l'élevage de nombreux phytophages (POITOUT et BUES; 1974). Deux points devaient notamment être vérifiés :

-les nouveaux gélifiants (il en existe deux variantes) présentent-ils des inconvénients par rapport à l'agar?

-le conditonnement en doses stériles et prètes à l'emploi est-il possible, comme en bactériologie ?

Les critères biologiques retenus pour la comparaison des milieux sont relatifs au développement , à la mortalité, à la croissance et à la nutrition.

MATERIEL ET METHODES

Fabrication du gel: La substance gélifiante est constituée de chaines relativement courtes de polygalactanes non ramifiés ou alternent des formes D et L de galactose. Ces chaines réunissent des grains d'oxydes d'alumine, de titane ou de silice. Deux variétés ont été utilisées dans ce travail: le KORANO 411, à 66% de polygalactane, 17% d'Al O et 17% de TiO , donnant un gel opaque blanc à courtes chaines , et le KORANO 400, purifié des composants minéraux (moins de 1% d'Al O et de TiO), qui permet d'obtenir un gel beaucoup plus transparent et à chaines plus longues. A l'état sec, le gélifiant se présente sous forme de fines paillettes d'une épaisseur de l'ordre de 10 um.

Divers conditionnements: Pour tester d'une part l'utilisation des nouveaux gélifiants et de l'autre l'effet de différents conditionnements, sept milieux ont été confectionnés.

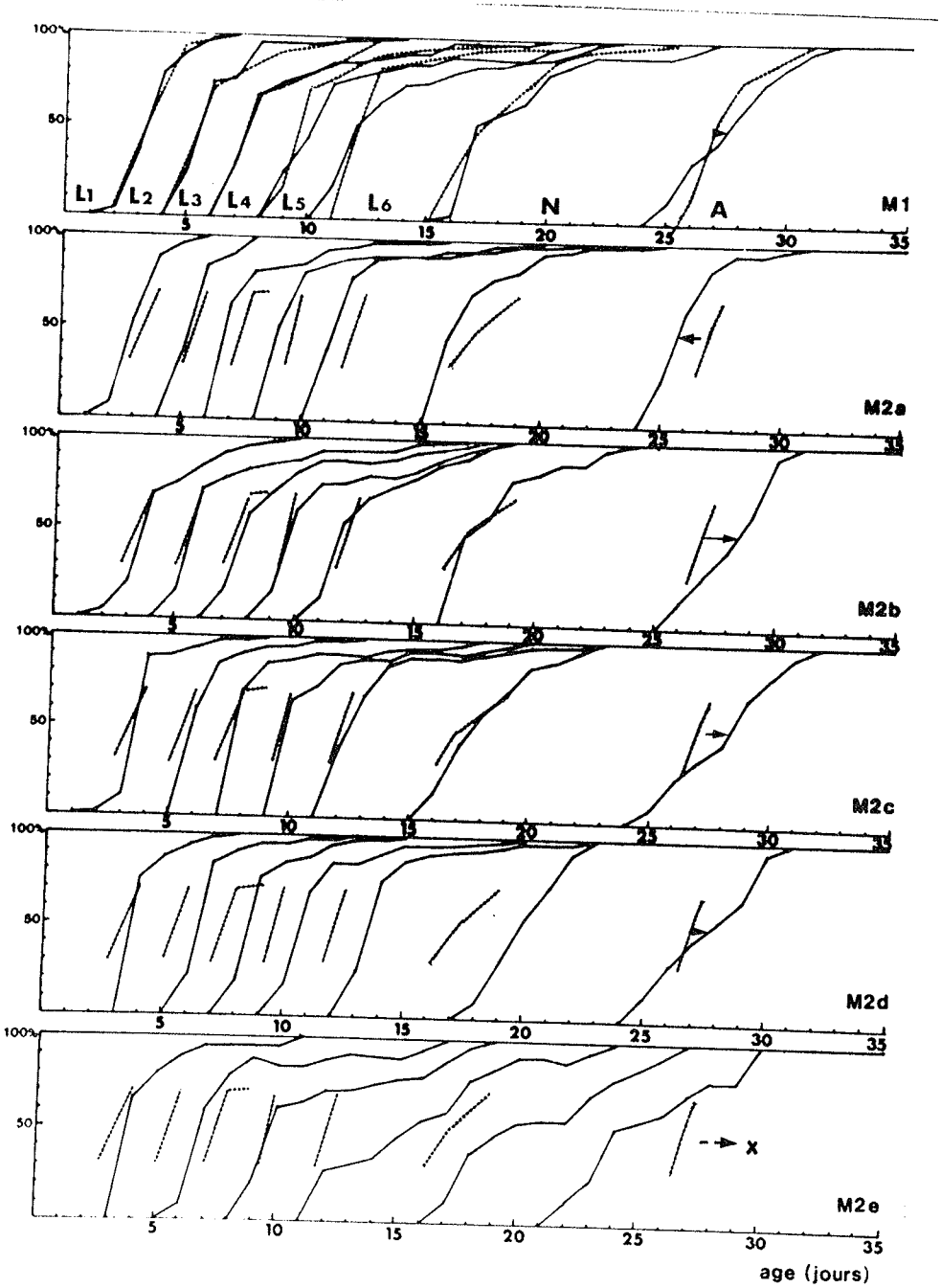
-milieu témoin: C'est le milieu "type" de POITOUT et coll.(1972), sans incorporation d'antibiotiques

(eau	170g)	semoule de mais	28,0g
agar	5,0g	germe de blé	7,0g
ac.benzoique	0,3g	levure de bière	7,5g
nipagine	0,25g	ac.ascorbique	1,0g
formol	0,3ml		

-milieu M1: L'agar est remplacé par le gélifiant KORANO 400 (1.2% en poids, soit 2.69g pour la dose)

-milieux M2: Le gel utilisé est ici le KORANO 411 (gel blanc à 1.8% , soit

figure 1



Courbes de développement comparé de S.littoralis sur différents milieux (voir texte). En abscisses l'age en jours à partir de l'éclosion
En ordonnées: distribution des différents stades dans la population au jour donné, en pourcentages des vivants.

En trait plein: représentation pour chaque milieu

En pointillés: milieu témoin (avec agar)

4.06g pour la dose).Cinq conditionnements différents ont été réalisés pour tester la stérilisation, la cuisson de la semoule et l'extraction des nutriments solubles de la levure et du germe de blé.

-M2a: milieu type avec le gel 411, mais entièrement autoclavé avant le conditionnement en sachets (110°C;30mn)

-M2b: milieu type non autoclavé (homologue du témoin et de M1).

-M2c: la fraction résistante du milieu (gel, semoule, nipagine, ac.benzoique) est autoclavée et l'ensemble des ingrédients est, après séchage sous vide à 30°C, pasteurisé par 1h à 60°C, 24h de repos, puis 1h à 60°C.

-M2d: milieu analogue à M2b avec adjonction d'un autre anti-microbien , le cristal violet, qui inhibe la croissance des bactéries gram+ (notamment les bacillus). Il est dosé à 1mg par kg de milieu.

-M2e: le germe de blé et la levure posant des problèmes de stérilisation (filtrations) et d'homogénéisation des poudres, un essai d'extraction aqueuse de leurs substances nutritives a été tenté. Une suspension de 7g de germe de blé et de 7.5g de levure de bière dans 50 ml d'eau distillée subit deux cycles de congélation/décongélation. Après filtration sur papier, le surnageant est séché sous vide à 50°C et rajouté au reste du milieu.

Obtention des milieux finis: Les poudres obtenues sont conservées à 4°C sous sachets plastiques scellés; lors de l'utilisation, elles sont versées et mélangées dans la quantité adéquate d'eau distillée à 60-70°C. On évite ainsi l'étape d'ébullition de l'agar et les risques de détérioration des constituants nutritifs à leur adjonction . Le gel homogène est coulé dans des boites plastiques et peut être stocké plus d'un mois à 4°C.

Elevage et mesure des paramètres biologiques: Les animaux proviennent d'une souche fournie par l'INRA d'AVIGNON. Les mesures de croissance et de développement ont été conduites sur 100 larves par milieu testé. Les milieux ont été déposés en épaisses bandes dans des boites plastiques aérées de 115*180*55 mm, placées en étuves à 25°C, 70-80% d'humidité relative et en photopériode 12/12. Les larves néonates ont été déposées sur les sept milieux et suivies tous les jours jusqu'à l'émergence des adultes

Un autre groupe de larves a été élevé dans les mêmes conditions sur milieu témoin pour les mesures nutritionelles en début de dernier stade larvaire. A la dernière mue larvaire les larves sont isolées et placées, six heures après (donc prêtes à l'alimentation et tubes digestifs vides), en logettes individuelles en présence d'une quantité déterminée de milieu (environ 3g). Dix individus par milieu sont utilisés sur une période d'alimentation de 48h; les fécès sont récoltées une heure après la fin de l'alimentation pour un vidage partiel du tube digestif (les poids de larves après expérience sont donc de ce fait inévitablement surestimés légèrement, mais les valeurs pour les comparaisons entre milieux restent valables). Les poids secs de milieux et de fécès sont déterminés après congélation et lyophilisation, et pour les larves par séchage en étuve à 130°C pendant deux heures (poids constant).Les indices utilisés sont ceux de WALDBAUER (1968):

consommation brute: Poids frais de milieu consommé par jour, correction faite de la perte de poids intrinsèque du milieu frais (WALDBAUER, 1968).

indice de consommation: Consommation brute divisée par le poids moyen de l'animal au cours de la période considérée. Cette dernière étant courte, ce poids a été pris comme moyenne des poids avant et après l'expérience.

indice de croissance: Quotient du gain de poids frais au poids moyen de l'animal au cours de l'expérience. Cet indice est légèrement surestimé en raison d'un reliquat de bol alimentaire dans le tube digestif après expérience, lequel ne peut être éliminé sans jeune excessif.

Tableau 1

	Témoin	M1	M2a	M2b	M2c	M2d	M2e
J6	90	77	82	82	78	75	80
J12	78	72	77	70	68	67	70
J18	65	65	68	62	65	65	53
J24	65	63	67	58	58	62	28
J32	63	63	67	58	58	60	0

Pourcentages de survie au cours de l'expérience, pour les différents milieux.
Jn : $n^{ème}$ jour après l'éclosion

Tableau 2

	Témoin		M1		M2a		M2b		M2c		M2d		M2e	
	$\bar{x}$	$ts/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$ts/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$ts/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$ts/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$ts/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$ts/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$ts/\sqrt{n}$
PF L3	3.0	05	3.2	07	3.8	06	2.5	05	1.9	03	2.2	04	1.9	02
PF L6	200	31	248	25	253	54	228	21	239	43	246	49	-	
PF N	261	13	287	23	242	19	279	19	250	25	258	24	-	

Comparaison de poids des larves élevées sur les sept milieux utilisés.
poids frais (en mg)à trois ages physiologiques (début des 3ème et 6ème stades larva
et jeunes nymphes). Les moyennes ($\bar{x}$) sont accompagnées de l'intervalle de confiance
au seuil de 5% .

digestibilité apparente: "approximate digestibility" de WALDBAUER ((poids sec ingéré -poids sec des fécès)/poids sec ingéré). Elle ne tient donc pas compte des déchets métaboliques évacués, principalement ici de l'acide urique. Les valeurs rapportées pour les Lépidoptères phytophages sont cependant négligeables: moins de 1% du poids sec de fécès pour B.mori (HIRATSUKA, 1920).

Efficacité de conversion de l'ingéré: E.C.I. obtenu comme pourcentage du gain de poids sec rapporté au poids sec de nourriture ingérée.

RESULTATS et DISCUSSION

Mortalité et développement.

l'étude de la mortalité au cours du temps (tableau 1) montre que seul le milieu M2e ne permet pas d'obtenir d'adultes. L'essai d'extraction des nutriments solubles de la levure et du germe de blé n'est donc pas concluant; cette technique ne peut donc pas etre utilisée pour fabriquer des poudres nutritives mères (obtenues par nébulisation d'une solution nutritive complète). Par contre, tous les autres milieux fournissent un taux grossièrement analogue d'adultes viables. Notons que des pontes fertiles ont été obtenues sur tous ces milieux, mais que l'étude quantitative de la fécondité et de la fertilité n'a pas été entreprise ici. Le milieu témoin (agar) présente une plus faible mortalité des jeunes larves que ceux utilisant les nouveaux gels. Cela est probablement du à de légères différences de texture fine des milieux, pénalisant plus ou moins les individus les plus faibles en début de vie larvaire.

La comparaison des dynamiques de développement montre en outre un allongement marqué des premiers stades larvaires sur le milieu M2d. Cela peut résulter soit d'un effet antinutritionnel du cristal violet, soit d'une inappétance due à son incorporation. Il n'est cependant pas toxique car la mortalité sur M2d est normale et, de plus, le retard de développement est rattrapé à l'émergence des adultes. Par ailleurs, le poids des chrysalides jeunes est pratiquement partout identique à celui des témoins (tableau 2).

Croissance .

La croissance larvaire et nymphale est mise en évidence par les relevés de poids (sur 10 à 20 individus) à trois ages physiologiques précis permettant des comparaisons indépendamment des vitesses de développement (tableau 2). Les analyses de variance à un critère pour les trois variables observées montrent des différences significatives à 0.5%. pour le poids frais en début de troisième stade larvaire, mais seulement à 5% pour les poids frais en début de stade 6 et de stade nymphal. En plus des deux milieux signalés précédemment pour leurs moins bonnes performances (M2d et M2e), on note ici les faibles poids des jeunes larves L3 élevées sur milieu pasteurisé (M2c). Bien que la pasteurisation puisse affecter négativement les qualités nutritionnelles du milieu (OHLSSON, 1977), il serait étonnant que la différence puisse etre aussi prononcée; par ailleurs les larves de stade 6 et les chrysalides retrouvent un poids normal sur ce meme milieu. Ce phénomène pourrait peut-etre s'expliquer par un changement des propriétés de rétention de l'eau (OHLSSON, 1977) du milieu pasteurisé, entrainant une texture défavorable à l'alimentation de la jeune larve, ou bien une trop forte humidité de surface.

la croissance de S.littoralis sur tous les milieux testés (sauf M2e) semble donc s'effectuer normalement.

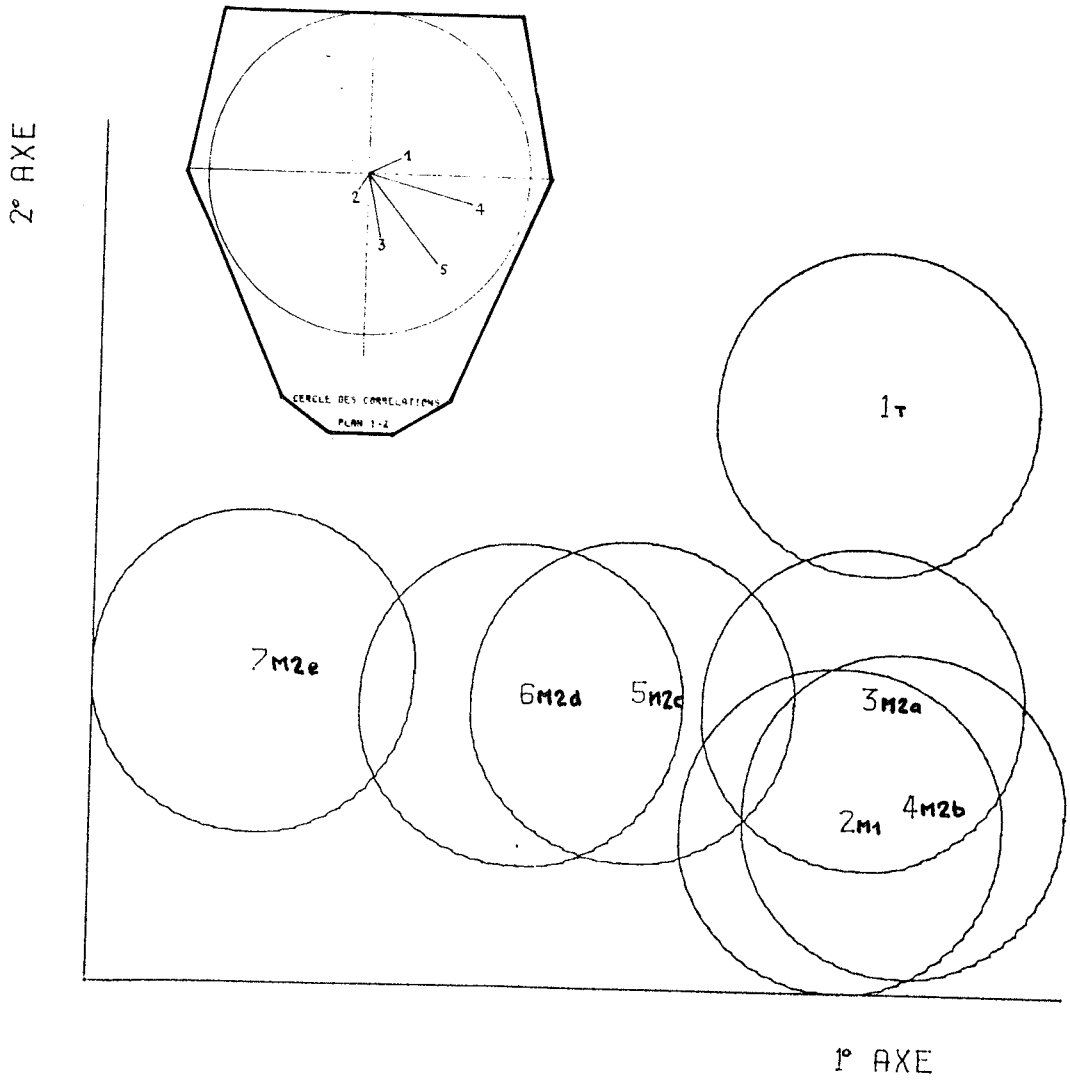
Paramètres nutritionnels:

Tableau 3

	Témoin		M1		M2a		M2b		M2c		M2d		M2e	
	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	$s/\sqrt{n}$
1 . Consommation brute (g/j)	0.85	.13	0.74	.06	0.92	.09	0.88	.09	0.75	.11	0.65	.09	0.82	.07
2 . Indice de consommation	1.69	.20	1.66	.09	1.88	.07	1.93	.09	1.83	.12	1.59	.12	1.95	.14
3 . Indice de croissance	0.42	.10	0.54	.05	0.54	.06	0.56	.02	0.41	.10	0.51	.02	0.49	.05
4 . Digestibilité apparente	27	2	31	5	28	2	31	2.5	22	5	26	2	17	1.5
5 . E.C.I.	17	3.5	24	3	22	3	24	1	16	3	19	1	15	1

Quelques paramètres nutritionnels relatifs à l'élevage de S. littoralis, en début de dernier stade larvaire, sur les sept milieux testés. (voir texte)

Analyse discriminante (voir B.5.2.) des sept populations (milieux) sur les cinq variables présentées ci-dessus au tableau 3. Les cercles représentent l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil de 5%. Le médaillon visualise les corrélations totales des deux premiers axes avec les cinq variables.



Afin de mieux cerner l'origine des variations observées, certains paramètres nutritionnels ont été mesurés sur des lots de dix larves en alimentation sur les sept milieux au début du dernier stade larvaire (tableau 3). Les analyses de variances des variables de consommation et de l'indice de croissance n'indiquent aucune différence significative (au seuil de 5%); il faut noter l'importance de certaines variabilités à l'intérieur des groupes, mais ces valeurs montrent que tous les milieux testés (y compris M2e) sont aptes à assurer la croissance de larves agées. On constate cependant que le milieu M2d, contenant du cristal violet, est nettement moins consommé que tous les autres, indiquant donc un effet antiphagostimulant de cet antimicrobien sur S.littoralis.

Par ailleurs, la digestibilité apparente et l'E.C.I. font apparaitre des différences entre les milieux. La déficience nutritinnelle de M2e est bien mise en évidence, mais aussi un certain effet négatif de la pasteurisation, alors que les milieux non autoclavés (M1 et M2b) présentent la meilleure digestibilité apparente. Il faut cependant remarquer que ces valeurs sont toujours inférieures à celles de la digestibilité apparente d'aliments naturels, par ailleurs très variables et allant de 35% pour des feuilles de jute à près de 70% pour celles du chou (chez S.littoralis; DUODU et BINEY, 1981).

En conclusion, on peut affirmer que la technique de conditionnement utilisée pour les milieux M1, M2a ou M2b est tout à fait apte à fournir un produit satisfaisant et souple d'utilisation. La pasteurisation et l'adjonction de cristal violet ne sont pas sans inconvénients, et l'extraction des nutriments du germe de blé et de la levure est très insuffisante. Le temps d'autoclavage peut éventuellement etre réduit pour mieux préserver les constituants fragiles tels que la vitamine C (NAVON, 1978).

La multitude de méthodes de préparation et de savoir faire dans l'élaboration de milieux d'élevage (GUENNELON, 1968) pourrait avantageusement etre réduite, dans tous les cas ou cela s'avère possible, à un minimum de manipulations. Par ailleurs, la composition des milieux peut parfaitement etre modifiée en gardant la technique de conditionnement, afin de s'adapter à des besoins nutritionnels plus particuliers. Seule la forme physique du milieu, de type gélosé, peut etre un obstacle à l'alimentation de certaines espèces.

Remarque:

Le schéma ci-contre montre la représentation graphique d'une analyse discriminante sur les données ayant servi à la construction du tableau 3. Les milieux s'avèrent donc ici significativement différents au seuil de 5% (test de WILKS) et le premier axe (le plus discriminant) semble rendre compte des paramètres de digestibilité.On voit que les milieux y sont classés comme suit:

M2b,T,M2a,M1 > M2c > M2d >> M2e

Le second axe serait plutot corrélé aux paramètres de croissance et différencie le milieu AGAR des milieux sur gels KORANO . Il pourrait représenter l'influence de facteurs physiques du milieu.

BIBLIOGRAPHIE:

SINGH, P.(1983) "A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects" Insect Sci.appl. 4(4) 357-362

POITOUT, S.; BUES, R.; LE RUMEUR, C.(1972) "Elevage sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton Earias insulana et Spodoptera littoralis." Ent.Exp.&Appl. 15 341-350

POITOUT, S.; BUES, R.(1974) "Elevage de chenilles de vingt-huit espèces de Lépidoptères noctuidae et de deux espèces d'arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces." Ann.Zool.-écol.anim. 6(3) 431-441

WALDBAUER, G.P.(1968) "The consumption and utilisation of food by insects." Adv.in Insect Physiol. 5 229-289

HIRATSUKA, E.(1920) "Researches on the nutrition of the silkworm." Bull.Ser.Exp.Sta.Japan 1 257-315

OHLSSON, T.(1977) "Pasteurisation of meat, fish and convenience food products." in Food quality and nutrition 163-190 Ed.W.K.DOWNEY Appl.Sci.Publishers

DUODU, Y.A.; BINEY, F.F.(1981) "Growth, food consumption and food utilisation of S.littoralis (Boisd.) on four food plants." Bull.Ent.Res. 71 655-662

NAVON, A.(1978) "Ascorbic acid, ascorbates and analogues in Spodoptera littoralis diet: Stability and effect on larvae." Ent.exp.&Appl. 24 35-40

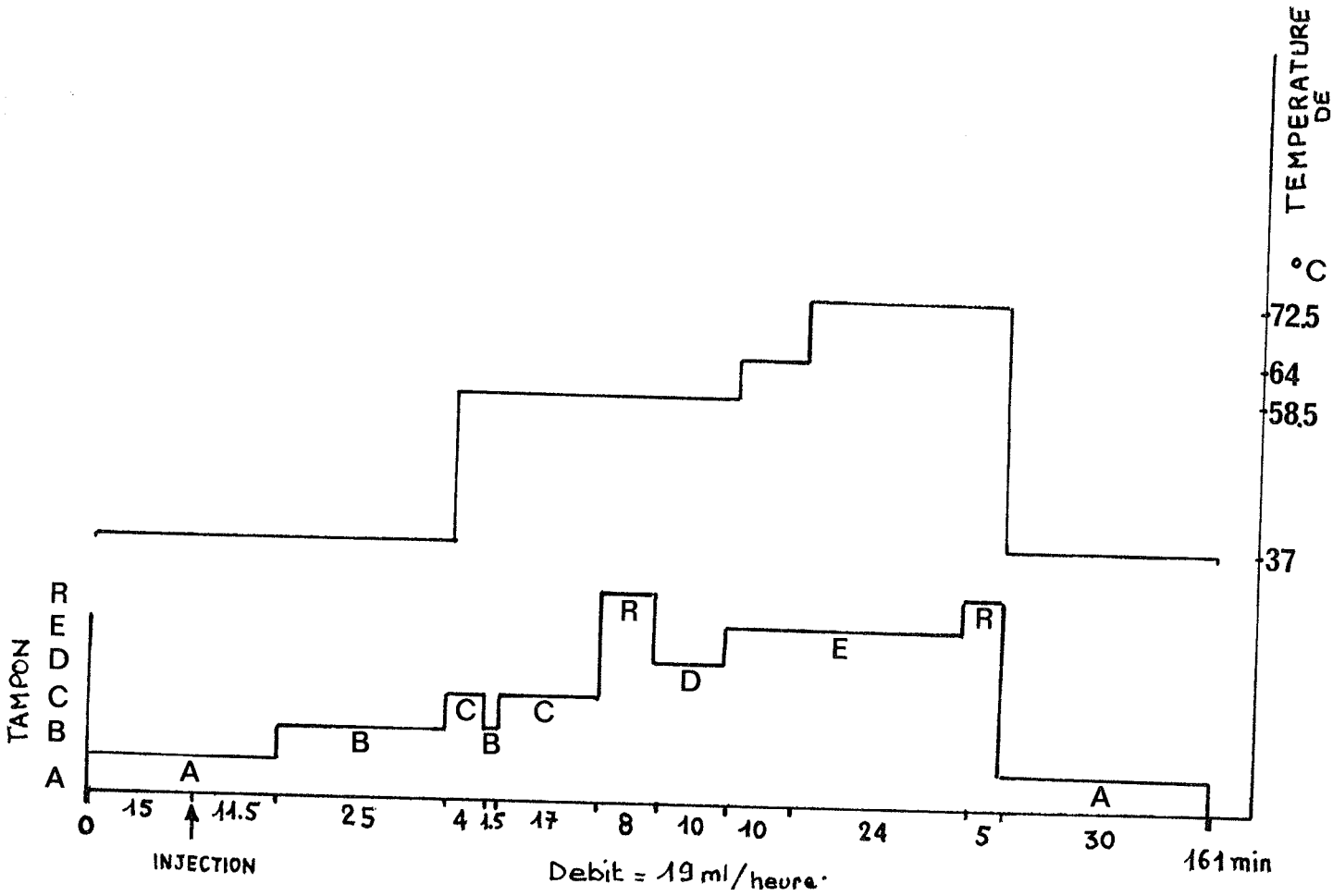
GUENNELON, G.(1968) "L'alimentation artificielle des larves de Lépidoptères phytophages." Ann.Epiphyties 19(3) 539-570

ANNEXE n°8

Liste des lépidoptères dont l'hémolymphe a été etudiée (Bglc TYR et arylphorine)

Identi-ficateur	Genre espèce	Famille	sous-famille	Origine	Aliment "naturel" principal	Dénomination française	courante anglaise
1	Spodoptera littoralis	NOCTUIDAE	Amphipyrinae	INSA/INRA AVIGNON	coton/polyphage	ver du cotonnier	cotton leafworm
2	Spodoptera frugiperda	NOCTUIDAE	Amphipyrinae	INRA La MINIERE	mais/graminées		
3	Sesamia nonagrioides	NOCTUIDAE	Amphipyrinae	INRA AVIGNON	mais/sorgho	sésamie du mais	
4	Heliothis armigera	NOCTUIDAE	Melidepteriinae	GERDAT MONTPELLIER	polyphage		corn earworm
5	Mamestra brassicae	NOCTUIDAE	Hadeninae	INRA BROUESSY	polyphage	noctuelle du chou	
6	Mamestra suaza	NOCTUIDAE	Hadeninae	INRA BROUESSY	polyphage		
7	Scotia segetum	NOCTUIDAE	Noctuinae	INRA AVIGNON	pl. mar.&industr.	noct. des moissons	
8	Earias insulana	NOCTUIDAE	Westermanninae	GERDAT MONTPELLIER	coton	chen. épineuse du cot.	
9	Mocis latipes	NOCTUIDAE		INRA La MINIERE	graminées		
10	Thaumetopoea pityocampa	NOTODONTIDAE	Thaumetopoeinae	INSA	pins	processionnaire du pin	pine process.y moth
11	Ostrinia nubilalis	PYRALIDAE	Pyraustinae	INRA MAGNERAUD	mais	pyrale du mais	european cornborer
12	Galleria mellonella	PYRALIDAE	Galleriinae	INSA	pollen et cire	teigne de la ruche	greater wax moth
13	Ephestia kuehniella	PYRALIDAE	Galleriinae	FAC / LYON	farines amylacées	teigne de la farine	
14	Corcyra cephalonica	PYRALIDAE	Galleriinae	GERDAT MONTPELLIER	céréales / grains	pyrale du riz	
15	Eldana saccharina	PYRALIDAE	Galleriinae	IRAT MONTPELLIER	mais		
16	Diatreae saccharalis	PYRALIDAE	Crambiinae	INRA AVIGNON	canne à sucre	foreuse de la canne	sugarcane borer
17	Chilo suppressalis	PYRALIDAE	Crambiinae	INRA AVIGNON	riz	pyrale asiat. du riz	
18	Chilo partellus	PYRALIDAE	Crambiinae	IRAT MONTPELLIER	sorgho	pyrale afr. du sorgho	
19	Chilo zacconius	PYRALIDAE	Crambiinae	IRAT MONTPELLIER			
20	Hypsipyla robusta	PYRALIDAE		GERDAT MONTPELLIER	essences for. trop.		
21	Aglais urticae	NYMPHALIDAE		région Lyonnaise	labiées	vanesse de l'ortie	
22	Yponomeuta?	YPONOMEUTIDAE		région Lyonnaise	sureau		
23	Bombyx mori	BOMBYCIDAE		FAC / LYON	murier	bombyx du murier	silkworm
24	Philosamia cynthia	SATURNIDAE		IUT / LYON	ailanthe	bombyx de l'ailanthe	
25	Malacosoma neustria	LASIOCAMPIDAE		région Lyonnaise		livrée	
26	? ?	LASIOCAMPIDAE		région Lyonnaise			
27	Cossus cossus	COSSIDAE	Cossinae	région Lyonnaise	substrats ligneux		
28	Cryptophlebia leucotreta	TORTRICIDAE		GERDAT MONTPELLIER	polyphage		
29	Pieris brassicae	PIERIDAE			crucifères	piéride du chou	cabbage leafworm

ANNEXE n°9

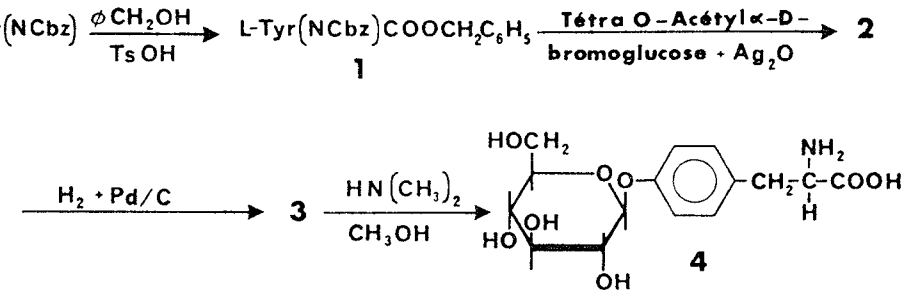


ANALYSEUR D'ACIDES AMINES: CYCLE COMPLET D'ELUTION
(GUILLAUD et BONNOT ,1984; données non publiées)

composition des tampons utilisés (quantités pour 1l)
(les produits concentrés du système IV sont disponibles chez ROCHE KONTRON)

TAMPON A:	2.80 g	LiOH	
	14.7 g	acide citrique	
	70 ml	methyl cellosolve	ajuster à pH 2.70
	5 ml	phenol	
	2 ml	Brij-35 (MERCK)	
TAMPON B:	3.65 g	LiOH	
	14.7 g	acide citrique	
	80 ml	methyl cellosolve	ajuster à pH 3.10
	5 ml	phenol	
	2 ml	Brij-35	
TAMPON C:	100 ml	concentré B du système IV	
	6.5ml	LiOH 2N	
	2 ml	Brij-35	
TAMPON D:	200 ml	concentré D du système IV	
	2 ml	Brij-35	
TAMPON E:	220 ml	concentré E du système IV	
	4 ml	LiOH 2N	
	2 ml	Brij-35	
R:		LiOH 0.4N (régénération)	

Synthèse chimique du β-D-glucopyranosyl-O-L tyrosine (d'après DELOBEL et coll., à paraître)



Nous avons choisi de protéger la fonction amine par un groupement carbobenzyloxy et la fonction acide par un ester benzylique ; ces groupements ayant l'avantage de pouvoir être enlevés dans une même opération (hydrogènolyse) et de façon douce. La NCbz-L-tyrosine commerciale est traitée par de l'alcool benzylique en présence d'acide-p-toluènesulfonique dans le benzène . Le rendement en 1 après cristallisation (benzène - cyclohexane) est de 88 % ; F : 152° ; analyse conforme. Ce composé est condensé avec l'α acétobromoglucose en présence d'oxyde d'argent fraichement préparé et de quinoléïne dans le benzène pour conduire à l'ester benzylique de la tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl-O-(N-phénylméthoxy-carbonyl)L-tyrosine 2 : Rdt : 69 % (éther éthylique), F : 130° ; $[\alpha]^{20°}_{365}$ = - 33,6° (c = 1,48, $CHCl_3$) ; analyse conforme. Les études RMN réalisées sur les tétra-O-acétyl-D-glucosides de phényle à 60 MHz permettent difficilement d'acquérir une certitude quant au type de liaison α ou β car le proton anomère est en général masqué par le groupe $H_{2'}$, $H_{3'}$, $H_{4'}$; nous avons donc réalisé le spectre de notre composé à 350 MHz (déplacements chimiques en ppm, constantes de couplage en Hz), ($CDCl_3$) : 7,35 à 7,2 (m, 10H, H_{Ar-Bzl}) ; 6,92 et 6,82 (2d, 4H, H_{Ar-tyr}, J = 8,6) ; 5,32 à 5,05 (m, 3H, $H_{2'}$, $H_{3'}$, $H_{4'}$) ; 5,01 (d, 1H, $J_{1',2'}$: 7,7) ; 4,67 (q élargi, 1H, CH-tyr) ; 4,28 (q, 1H, $H_{6'}$, $J_{6',6''}$ = 12,2, $J_{5',6'}$ = 5,4) ; 4,15 (q, 1H, $H_{6''}$, $J_{5',6''}$ = 2,4) ; 3,82 (oct, 1H, $H_{5'}$, $J_{4',5'}$ = 9,9) ; 3,06 (m élargi, 2H, CH_2-tyr) ; 2,06 ; 2,05 ; 2,04 et 2,03 (4s, 12H, OAc). Ce spectre confirme qu'on est bien en présence du glucoside β ($J_{1',2'}$ = 7,7), de plus aucun doublet caractéristique d'un proton anomère de glucoside α n'est visible vers 5,7 ppm [9].

Le composé 2 est hydrogénolysé en présence de palladium sur charbon dans le méthanol et conduit à 3 . Le produit 3 non purifié, mis en suspension dans du méthanol, est additionné de diméthylamine en excès et chauffé 2 H à 60°. Ce procédé de désacétylation est plus commode que celui, plus classique, qui utilise l'ammoniaque et qui nécessite des conditions plus dures (durée, température). Le produit 4 cristallise spontanément dans le milieu réactionnel. Il est purifié par recristallisation dans le mélange eau - éthanol . Rdt à partir de 2 : 80 % ; F > 280° (dec) ; $[\alpha]^{20°}_{D}$ = - 75° ; $[\alpha]^{20°}_{365}$ = - 249° (c = 1, H_2O) ; pur en CCM (propanol - eau, 7/3) ; analyse conforme. Le spectre RMN (350 MHz, D_2O, $TSPd_4$*) confirme la structure du produit : 7,29 et 7,13 (2d, 4H, H_{Ar-tyr}, J = 8,4) ; 5,13 (d, 1H, $H_{1'}$, $J_{1',2'}$ = 7,3) ; 4,0 à 3,5 (m, 7H, H glucose et CH_X -tyr) ; 3,25 (q, 1H, CH_AH_B-tyr, $J_{A,B}$ = 14,7, $J_{A,X}$ = 4,9) ; 3,05 (q, 1H, CH_AH_B -tyr, $J_{B,X}$ = 8). On observe bien les mêmes valeurs que celles trouvées pour le produit naturel ; la constante de couplage $J_{1',2'}$ = 7,3 confirme la liaison anomérique β ; aucun signal caractérisant un éventuel proton anomère d'un glucoside α n'est visible vers 5,35 ppm .

La structure du produit est ainsi bien confirmée mais, pour un usage biologique, il était nécessaire de vérifier, avec plus de précision que n'en donne la RMN, l'absence de dérivé α éventuel ainsi que la non racémisation au niveau de l'acide aminé. Par analyse automatique d'aminoacide et par HPLC, on observe un pic unique ; d'autre part, l'α glucosidase ● ne libère que 0.008 % de tyrosine (80 ppm de dérivé α au maximum) tandis que la β glucosidase ■ hydrolyse complètement le dérivé 4. En outre, la L-aminoacide oxydase purifiée ▲ oxyde entièrement l'amino-acide 4 en céto-acide correspondant .

Les premiers essais réalisés avec ce composé 4 en milieu de culture ont montré d'une part une absence de toxicité et d'autre part, un effet prometteur sur la fin du développement de tachinaires parasites de Lépidoptères.

* $TSPd_4$: Triméthylsilyl-3, tétradeutério-2,2,3,3 propionate de sodium

● α glucosidase purifiée type IV de levure (EC 3.2.1.20)

■ β glucosidase d'amande (EC 3.2.1.21)

▲ L.aminoacide oxydase (EC 1.4.3.2) type III purifiée du venin de Crotalus atrox.

ANNEXE n°11

Méthode de G.L. PETERSON (Anal. Biochem. 83, 346-356. 1977)

Principe : - précipitation quantitative des protéïnes pour éliminer les substances interférentes si elles existent.

- solubilisation du précipité et dosage des protéïnes par réaction de FOLIN.

Produits : - STOCK : 1) CTC (Copper Tartrate Carbonate) : une solution à 20% de $Na_2 CO_3$ est ajoutée lentement à une solution de Sulfate-Tartrate de Cuivre. Concentrations finales :

- 0,1% Cu SO_4 ($5H_2O$)
- 0,2% tartrate de Na,K
- 10% $Na_2 CO_3$

2) SDS 10%

3) Na OH 0,8 N

4) FOLIN (Ciocalten Phenol - MERCK)

- Travail : 1) 0,15% DOC (Deoxycholate de Sodium)

2) 72‰ TCA (acide trichloracétique)

3) BSA 1 mg/ml (pour la gamme)

4) réactif A : CTC, NaOH, SDS et eau en parts égales.

5) réactif B : FOLIN, eau - 1/5

Dosage : - précipitation : échantillon = 5 à 100 µg de protéïnes dans 1 ml.

- ajouter 0,1 ml DOC - Agiter - Laisser reposer 10 min.
- ajouter 0,1 ml TCA - Mélanger - Centrifuger 15 min. à 3000 g.
- retirer le surnageant.

- dissolution :
  - amener à 1 ml avec de l'eau distillée
  - ajouter 1 ml de A. Agiter. Laisser reposer 10 min. (dissolution)
  - ajouter 0,5 ml de B. Agiter aussitôt.

- lecture : Après 30 min., lire à 750 nm dans les 2 heures qui suivent (Etalonnage non parfaitement linéaire

Remarque : Pour un micro essai, tous les volumes sont divisés par 5.

ANNEXE n° 12

Méthode de BRADFORD (Anal. Biochem. 72, 248-254. 1976)

Principe : coloration des protéïnes par liaison quantitative avec du Bleu de Coomasie.

Produits : Une solution - réactif : Coomasie G 250 = 100 mg
Ethanol à 95% = 50 ml
$H_3 PO_4$ (85% w/v) = 100 ml
Eau distillée qsp 1000 ml

Dosage : échantillon : 10 à 100 µg de protéïnes dans 100 µl de tampon.

On ajoute 5 ml de solution-réactif. On agite. On laisse reposer 5 min. On lit dans les 20 min. à 595 nm.

***

Pour les deux méthodes, l'étalon utilisé est la Serum Albumine Bovine (Gamme de 5 à 100 µg de protéïne).

ANNEXE n°13

ELECTROPHORESES EN GELS D'ACRYLAMIDE EN PRESENCE DE S.D.S.
GELS en GRADIENTS (SDS P.A.G.G.E.)
et GELS en CONCENTRATIONS CONSTANTES (SDS P.A.G.E.)

COMPOSITION DES GELS ET PROTOCOLE SUIVI (d'après LAEMMLI)

Réactifs:

solution A: acrylamide 30:0.8 (300g d'acrylamide
0.8g de bisacrylamide qsp 1l)
solution B: TRIS 1.5M, pH 8.8
solution C: S.D.S à 10% dans de l'eau
solution D: TRIS 0.5M, pH 6.8

Tampon d'électrophorèse:

TRIS 15.15 g
Glycine 72 g
SDS 5 g qsp 5l, pH 8.3

échantillon:

25 à 150 µg de protéines par puits, dans un tampon contenant du SDS (2%), du glycerol (20% en volume), et éventuellement du beta mercapto ethanol (0.1M).

composition des gels:

	gradient 5%	gradient 15%	alignement 5%	concentration constante 10%
solution A	2.52 ml	8.03 ml	2.00 ml	10.56 ml
solution B	3.76 ml	4.01 ml	3.00 ml	7.19 ml
solution D	151.8 µl	160.6 µl	120.6 µl	290.4 µl
solution C	8.52 ml	3.75 ml	6.75 ml	12.67 ml
eau				
persulfate d'NH4+ 10%	51.8 µl	50.2 µl	41.2 µl	99.0 µl
TEMED	5.2 µl	5.0 µl	4.2 µl	9.9 µl

migration:

pendant environ 14 heures à voltage constant de 110V .

ANNEXE n°14

ISOELECTROFOCALISATIONS ANALYTIQUES
(d'après O'FARRELL - J.Biol.Chem. 250, 4007-4021)

Préparation du gel à 4%:

	Urée	5.50	g
	Acrylamide(28/1.6)	1.33	ml
	Ampholines	0.5	ml
	H20 qsp	10	ml
dégazer 30'			
ajouter	TEMED	7	µl
	Persulfate 10%	10	µl

couler les gels immédiatement (1ml par tube de 130 x 2.5 mm)

Préparation des échantillons:

ils sont chargés à raison de 50 à 100 µg/tube dans de l'urée 8M

Tampons d'électrofoca lisation:

Anode (+): H3PO4 1N
Cathode(-): NaOH 1N

Déroulement de l'électrophorèse:

pré-focalisation des ampholines: 15 min à 200V
30 min à 300V
30 min à 400V

chargement et focalisation: 10 à 15 heures à 500V
1 heure à 600V

Traitement des gels:

fixation 5 à 7 heures dans du TCA 10%
Coloration dans une solution au bleu de Coomassie (mélange de DIEZEL).

ANNEXE n°15

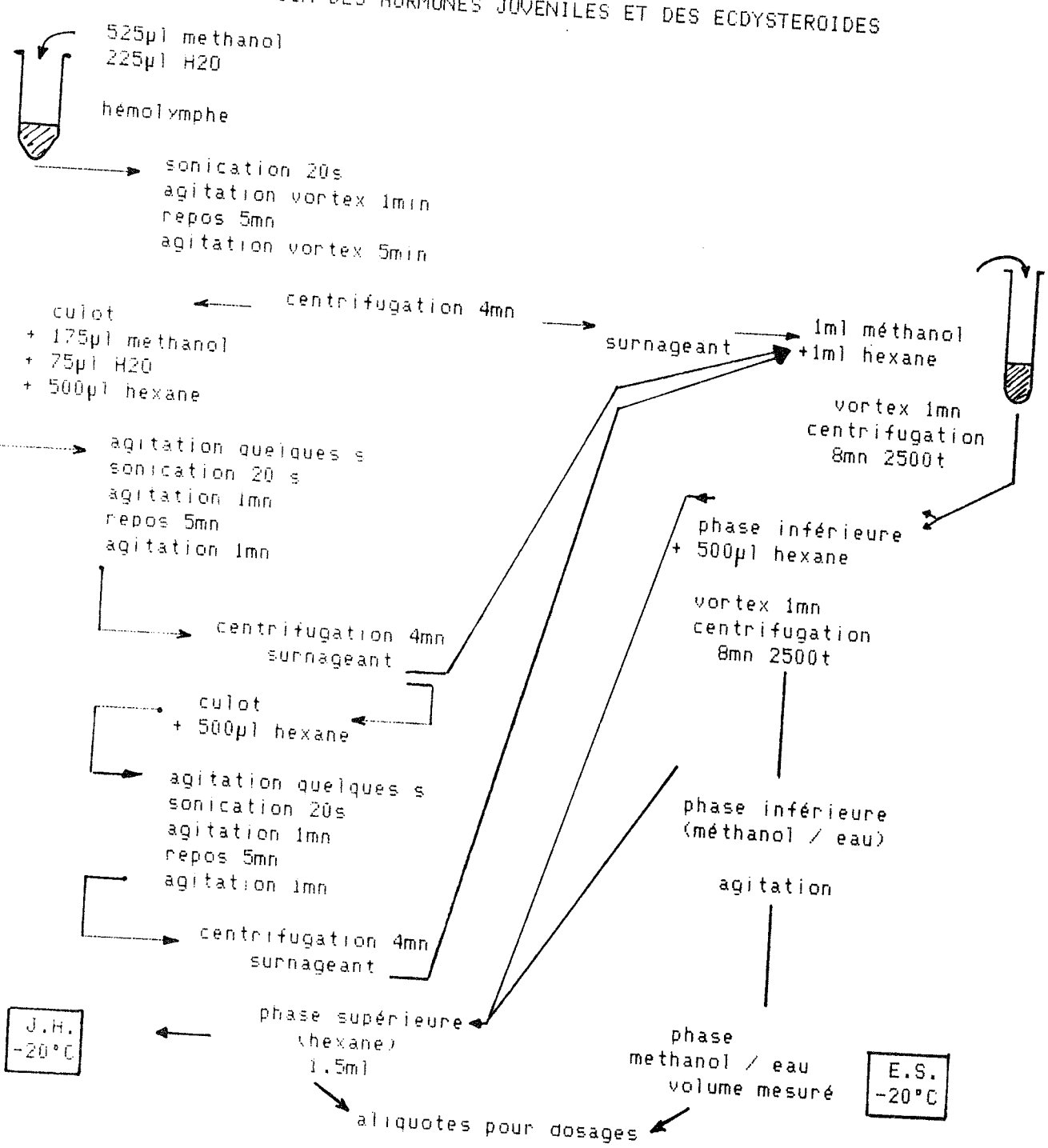
API ZYM

READING SCALE — ECHELLE DE LECTURE

Quantité de substrat hydrolisé		0 nanomole	5 nanomoles	10 nanomoles	20 nanomoles	30 nanomoles	≥ 40 nanomoles	
Activité chiffrée		0	1	2	3	4	5	
Control — Témoin	1	○	○	○	○	○	○	Blanc
2 - naphtyl - phosphate	2	○	○	●	●	●	●	Violet
2 - naphtyl - butyrate	3	○	○	●	●	●	●	"
2 - naphtyl - caprylate	4	○	○	●	●	●	●	"
2 - naphtyl - myristate	5	○	○	●	●	●	●	"
L - leucyl - 2 - naphtylamide	6	○	○	●	●	●	●	Orange
L - valyl - 2 - naphtylamide	7	○	○	●	●	●	●	
L - cystyl - 2 - naphtylamide	8	○	○	●	●	●	●	
N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	9	○	○	●	●	●	●	
N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide	10	○	○	●	●	●	●	
2 - naphtyl - phosphate	11	○	○	●	●	●	●	Violet
Naphtol-AS-BI-phosphodiamide	12	○	○	○	●	●	●	Bleu
6-Br-2-naphtyl-αD-galactopyranoside	13	○	○	●	●	●	●	Violet
2-naphtyl-βD-galactopyranoside	14	○	○	●	●	●	●	"
Naphtol-AS-BI-βD-glucuronate	15	○	○	○	●	●	●	Bleu
2-naphtyl-αD-glucopyranoside	16	○	○	●	●	●	●	Violet
6-Br-2-naphtyl-βD-glucopyranoside	17	○	○	●	●	●	●	"
1-naphtyl-N-acétyl-βD-glucosaminide	18	○	○	●	●	●	●	Marron
6-Br-2-naphtyl-αD-mannopyranoside	19	○	○	●	●	●	●	Violet
2-naphtyl-αL-fucopyranoside	20	○	○	●	●	●	●	"

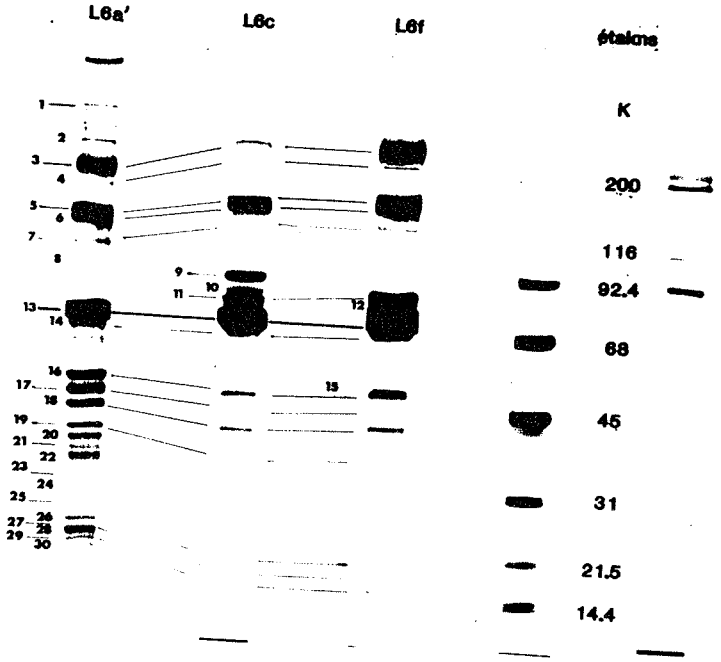
ANNEXE n° 16

MODE D'EXTRACTION DES HORMONES JUVENILES ET DES ECDYSTEROIDES

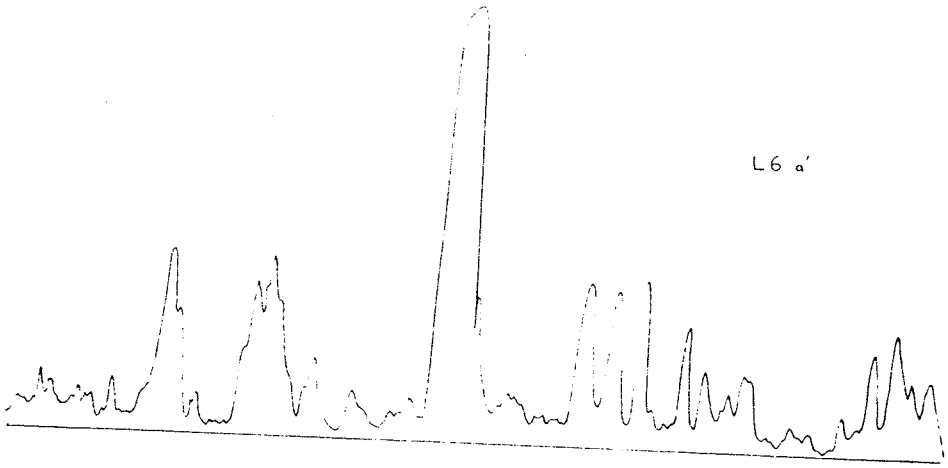


ANNEXE n°17

QUANTIFICATION PAR DENSITOMETRIE DES TENEURS HEMOLYMPHATIQUES EN DIFFERENTES PROTEINES



Identification des différentes bandes protéiques présentes au dernier stade larvaire de Spodoptera littoralis (d'après les gels de la figure 47).



Exemple de tracé densitométrique d'un puits d'électrophorèse (VERNON).

Répartition, pour chaque âge, des différentes protéines (en %).

Bande N°	P.M.	L5b %	L5c %	L5d %	L60 %	L6a %	L6a' %	L6b %	L6c %	L6d %	L6e %	L6f %	N0 %	Nb %	Nc %
1	330	1.5					.6	.9							
2	254	1.7	1.6	1.9	3.3	2.4	1.2	.7							
3	213	11.3	9.5	11.6	16.7	13.5	8.6	3.4	3.5	7.2	6.8	12.9	13.7	14.8	16
4	195										.2	.1	.2		.1
5	158	24.6	20.4	9.5	8.6	11.5	5.1	8.1	6.4	6.5	9.2	7.7	6.9	4.6	5.8
6	150			2.6	1.3	3.1	6.5	11.2	6.2	11.4	7.5	5.5	7.3	5.6	5
7	130	3.4	2.4	2.6	2.5	2.7	2.3	1.4	.2	.4		.1	.4		.2
8	109	.2	.5	1.3	1.3	.9	1.2								
9	101								9.4	1.9	1.4				
10	94								3.2						
11	88.5	2.4	.8	2.3	2.1	2.1	1.7	2.6	7.8	7.4	8.8	10.2	10.6	10	9.1
12	86									5	8.7	9.8	10	9.6	8.7
13	79		2.2	1.7	1.5	1.9	30	52.3	50.8	46.7	45.5	41.1	38.5	44	45
14	70	3.2	3.7	5.3	5.5	3.7	2.7			.5	.3	.5	2.1	2.1	.3
15	52											1.7	1.4	.5	
16	50	5	4.9	5.6	6.2	5.5	4.9	2.9	2.8	2.8	2.7	2.1	2	2.6	1.9
17	46	7	6.7	5.5	4.8	6.6	4.7	3.7	1.7	1.8	1.5	1.2	.9	.4	.4
18	41	7.1	5.7	5.4	5.2	7.5	4.7	4.8	2.6	2.9	2.6	2.7	2.4	1.9	1.7
19	35	1.5	2.8	2.7	3.2	2.1	2.5	1	1.1	1.1	1.2	.9	.9	.5	.3
20	32.5	3.8	5.7	4.2	2.2	5.4	2.4	1.4							
21	30	.6	1.4	1	1.3	.9	1.3	.7							
22	28	2.5	3.9	3.2	4	2.9	2.6								
23	24.5	1.1		.9		.7									
24	23	.8		.5		.5									
25	20.5	.4	1.8	1.6	1.3	1.7	.9								
26	19	3.7	4.4	4.8	5.2	6.1	3	.9	.2		.1	.3	.3	.2	.2
27	17.5	1.9	4.8	2.9	3.3	1.9	2.4	2	2.5	2	1.7	1.9	1.6	1.4	2
28	17	3	1.9	3	1.7	4.6	2.2	.4							
29	16.5	1		1.1	1.7	1.4	1.3	.3	.4	.5	.4	.7	.6	.4	.8
30	15	1.6	2.7	3.1	3.5	4.2	2.3	.9							

Quantification des concentrations en chaque protéine d'après le tableau précédent et les teneurs moyennes en protéines à chaque âge.

Bande N°	P.M.	L5c µg/µl hly	L5c %	L5d µg/µl hly	L5d %	L6o µg/µl hly	L6o %	L6a µg	L6a %	L6a' µg/µl hly	L6a' %	L6b µg/µl hly	L6b %	L6c µg/µl hly	L6c %	L6d µg/µl hly	L6d %	L6e µg/µl hly	L6e %	L6f µg/µl hly	L6f %	N0 µg/µl hly	N0 %	Nb µg/µl hly	Nb %	Nc µg/µl hly	Nc %
1	330	0.00		0.00		0.00		0.00		.04	.6	.12	.9	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
2	254	.08	1.6	.05	1.9	.08	3.3	.06	2.4	.08	1.2	.09	.7	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
3	213	.47	9.5	.32	11.6	.39	16.7	.32	13.5	.54	8.6	.45	3.4	1.11	3.5	3.34	7.2	3.77	6.8	6.50	12.9	6.68	13.7	6.99	14.8	8.07	16
4	195	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		.11	.2	.05	.1	.10	.2	0.00		.05	.1
5	158	1.02	20.4	.26	9.5	.20	8.6	.27	11.5	.32	5.1	1.08	8.1	2.02	6.4	3.02	6.5	5.11	9.2	3.88	7.7	3.37	6.9	2.17	4.6	2.93	5.8
6	150	0.00		.07	2.6	.03	1.3	.07	3.1	.41	6.5	1.50	11.2	1.96	6.2	5.29	11.4	4.16	7.5	2.77	5.5	3.56	7.3	2.65	5.6	2.52	5
7	130	.12	2.4	.07	2.6	.06	2.5	.06	2.7	.15	2.3	.19	1.4	.06	.2	.19	.4	0.00		.05	.1	.20	.4	0.00		.10	.2
8	109	.02	.5	.04	1.3	.03	1.3	.02	.9	.08	1.2	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
9	101	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		2.97	9.4	.88	1.9	.78	1.4	0.00		0.00		0.00		0.00	
10	94	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		1.01	3.2	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
11	88.5	.04	.8	.06	2.3	.05	2.1	.05	2.1	.11	1.7	.35	2.6	2.47	7.8	3.43	7.4	4.88	8.8	5.14	10.2	5.17	10.6	4.72	10	4.59	9.1
12	86	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		2.32	5	4.83	8.7	4.94	9.8	4.88	10	4.54	9.6	4.39	8.7
→ 13	79	.11	2.2	.05	1.7	.03	1.5	.05	1.9	1.90	30	6.98	52.3	16.06	50.8	21.67	46.7	25.25	45.5	20.71	41.1	18.78	38.5	20.79	44	22.70	45
14	70	.18	3.7	.15	5.3	.13	5.5	.09	3.7	.17	2.7	0.00		0.00		.23	.5	.17	.3	.25	.5	1.02	2.1	.99	2.1	.15	.3
15	52	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		.86	1.7	.68	1.4	.24	.5	0.00	
16	50	.24	4.9	.16	5.6	.14	6.2	.13	5.5	.31	4.9	.39	2.9	.89	2.8	1.30	2.8	1.50	2.7	1.06	2.1	.98	2	1.23	2.6	.96	1.9
17	46	.33	6.7	.15	5.5	.11	4.8	.16	6.6	.30	4.7	.49	3.7	.54	1.7	.84	1.8	.83	1.5	.60	1.2	.44	.9	.19	.4	.20	.4
18	41	.28	5.7	.15	5.4	.12	5.2	.18	7.5	.30	4.7	.64	4.8	.82	2.6	1.35	2.9	1.44	2.6	1.36	2.7	1.17	2.4	.90	1.9	.86	1.7
19	35	.14	2.8	.07	2.7	.07	3.2	.05	2.1	.16	2.5	.13	1	.35	1.1	.51	1.1	.67	1.2	.45	.9	.44	.9	.24	.5	.15	.3
20	32.5	.28	5.7	.12	4.2	.05	2.2	.13	5.4	.15	2.4	.19	1.4	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
21	30	.07	1.4	.03	1	.03	1.3	.02	.9	.08	1.3	.09	.7	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
22	28	.19	3.9	.09	3.2	.09	4	.07	2.9	.16	2.6	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
23	24.5	0.00		.02	.9	0.00		.02	.7	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
24	23	0.00		.01	.5	0.00		.01	.5	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
25	20.5	.09	1.8	.04	1.6	.03	1.3	.04	1.7	.06	.9	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
26	19	.22	4.4	.13	4.8	.12	5.2	.15	6.1	.19	3	.12	.9	.06	.2	0.00		.06	.1	.15	.3	.15	.3	.09	.2	.10	.2
27	17.5	.24	4.8	.08	2.9	.08	3.3	.05	1.9	.15	2.4	.27	2	.79	2.5	.93	2	.94	1.7	.96	1.9	.78	1.6	.66	1.4	1.01	2
28	17	.09	1.9	.08	3	.04	1.7	.11	4.6	.14	2.2	.05	.4	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	
29	16.5	0.00		.03	1.1	.04	1.7	.03	1.4	.08	1.3	.04	.3	.13	.4	.23	.5	.22	.4	.35	.7	.29	.6	.19	.4	.40	.8
30	15	.13	2.7	.09	3.1	.08	3.5	.10	4.2	.15	2.3	.12	.9	0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00		0.00	

ANNEXE n° 18

ARYLPHORINES PURIFIEES

Composition en acides aminés des différentes arylphorines purifiées à ce jour, et indication de la source bibliographique.

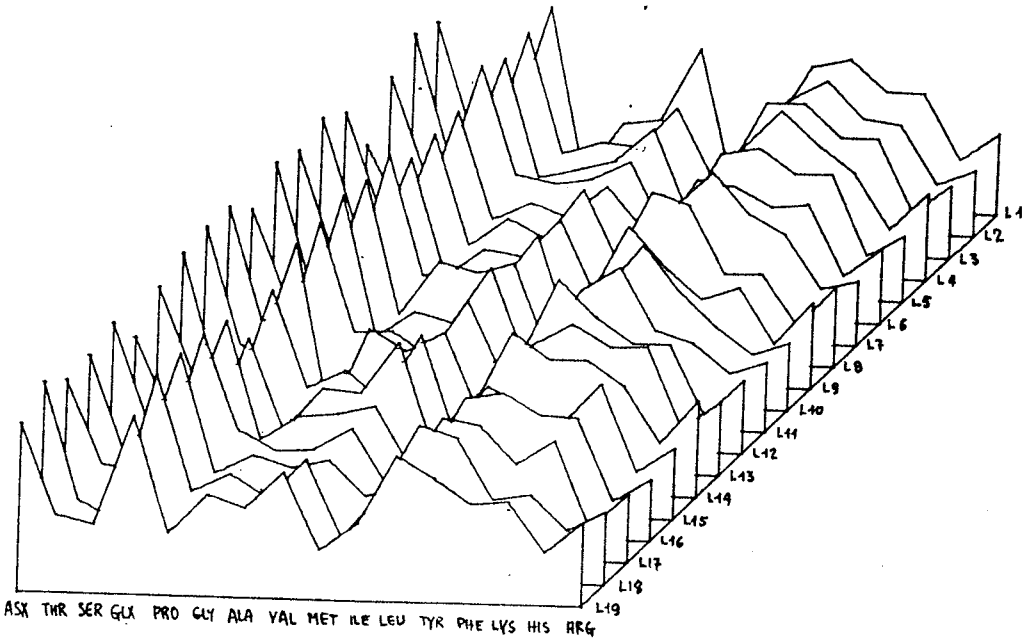
Acide Aminé	S. littoralis notre travail	B. mori TOJO et coll.; 1980	H. cecropia TELFER et coll.; 1983	M. sexta KRAMER et coll.; 1980	C. erythrocephala MUNN et coll.; 1967	C. styxia KINNEAR et coll.; 1975	L. cuprina THOMSON et coll.; 1976	D. melanogaster WOLFE et coll.; 1977	A. mellifera RYAN et coll.; 1984
ASX	10.90	12.10	11.10	12.80	11.70	12.00		12.70	13.40
THR	2.10	4.50	5.00	2.90	4.70	4.70		5.20	4.20
SER	3.80	4.00	4.90	5.10	4.20	4.20		3.60	7.80
GLX	12.10	12.60	11.10	10.70	9.90	10.10		10.30	9.30
PRO	3.90	6.10	7.20	5.80	3.00	4.10		3.20	4.70
GLY	4.50	4.00	4.90	4.80	5.30	5.40		7.10	5.80
ALA	5.20	5.40	4.40	5.40	3.30	3.00		4.10	4.40
VAL	7.30	6.10	6.70	7.60	5.90	5.30		4.70	3.20
MET	2.10	2.70	1.50	2.00	4.40	3.80		5.40	5.70
CYS	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
ILE	3.60	3.80	4.40	3.20	3.90	4.10		3.70	5.10
LEU	8.90	6.90	6.90	6.30	5.80	6.80		6.90	8.00
TYR	11.40	8.90	9.30	10.30	12.20	11.90		9.30	9.60
PHE	8.40	9.80	8.70	8.90	11.00	10.90		9.40	6.90
LYS	8.50	8.50	6.50	7.70	8.10	7.90		6.90	1.20
HIS	3.20	1.30	3.80	2.90	3.30	3.10		3.00	5.40
TRP	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
ARG	4.10	3.20	3.90	3.50	3.20	2.80		4.30	5.30
TOTAL	100.00	99.90	100.30	99.90	99.90	100.10	0.00	99.80	100.00

ANNEXE n°19

ARYLPHORINES SEMI-PURIFIEES DE LEPIDOPTERES

esp.	ASX C1	THR C2	SER C3	GLX C4	PRO C5	GLY C6	ALA C7	VAL C8	MET C9	ILE C10	LEU C11	TYR C12	PHE C13	LYS C14	HIS C15	ARG C16	
L1	10.85	4.01	4.02	12.01	1.64	4.97	5.31	9.73	.87	4.98	8.89	9.41	7.44	7.39	3.38	5.11	100.01
L2	11.49	3.97	4.08	11.79	4.37	5.15	4.86	7.45	3.11	4.89	8.19	9.45	7.08	6.75	3.19	4.19	100.01
L3	10.18	4.14	4.39	11.58	4.24	4.78	5.42	7.49	2.25	4.92	9.35	9.39	7.28	7.31	2.74	4.55	100.01
L4	7.28	3.10	4.55	12.48	5.70	5.23	5.62	6.79	2.39	5.57	7.88	10.27	8.15	6.51	3.09	5.39	100.00
L5	10.71	4.66	3.72	10.98	4.34	5.43	4.52	6.57	3.97	4.41	8.88	9.31	7.72	7.81	2.83	4.15	100.01
L6	11.67	4.81	4.05	10.91	4.07	5.80	4.60	7.72	3.12	4.65	8.57	8.16	7.01	7.30	2.92	4.65	100.01
L7	11.04	4.58	4.50	10.75	3.56	5.24	4.80	7.21	2.63	4.85	8.23	10.44	7.94	6.73	3.47	4.05	100.02
L8	11.64	4.21	3.56	12.34	4.92	5.17	4.36	7.61	1.30	5.89	10.52	9.73	5.55	5.66	2.54	5.00	100.00
L9	10.13	4.63	4.64	12.16	3.85	7.18	6.54	7.28	1.70	5.14	9.75	7.26	5.36	6.21	2.73	5.43	99.99
L10	11.66	4.33	4.02	12.53	3.84	5.47	4.77	8.31	2.66	5.32	7.13	9.99	7.22	5.06	3.41	4.25	99.97
L11	11.74	4.53	3.04	12.23	5.49	5.63	4.08	7.63	2.94	4.80	8.46	10.02	6.08	5.35	3.59	4.39	100.00
L12	11.48	3.65	4.68	12.35	1.60	7.10	5.77	7.06	2.06	5.42	10.48	8.19	6.65	6.65	2.24	4.62	100.00
L13	10.77	5.19	3.26	10.77	4.79	5.90	4.11	8.23	1.93	4.97	7.87	9.16	7.76	7.87	2.83	4.58	99.99
L14	9.00	4.09	2.81	9.13	3.47	6.14	5.89	9.14	2.62	5.13	9.91	8.27	8.32	6.78	3.30	6.01	100.01
L15	11.26	5.22	5.03	11.60	4.27	5.79	6.02	6.55	2.81	5.67	7.96	6.55	5.69	8.30	2.88	4.40	100.00
L16	10.60	4.58	3.73	12.11	6.20	4.98	5.12	6.49	3.00	4.24	8.55	8.98	7.63	7.49	2.45	3.85	100.00
L17	10.44	5.26	4.81	12.25	4.88	6.06	5.35	5.90	3.73	4.50	8.70	8.25	5.94	7.48	2.17	4.29	100.01
L18	11.64	4.41	3.23	12.35	5.15	6.26	4.87	7.29	2.51	5.33	9.58	8.83	5.13	5.52	3.33	4.57	100.00
L19	10.41	4.81	4.28	11.08	3.88	6.34	5.55	7.87	3.09	4.83	9.05	7.71	6.17	6.44	3.28	5.22	100.01

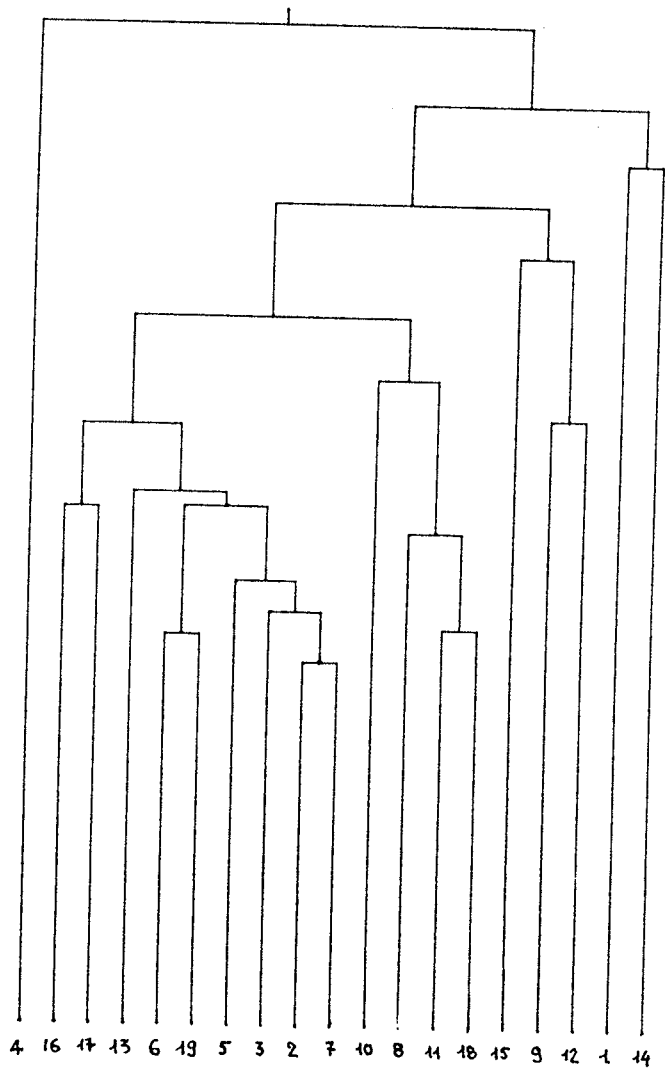
Composition en acides aminés des "fractions II" (voir figure 43) obtenues à partir de quelques lépidoptères (voir annexe 8).



Profils représentant le tableau ci-dessus.

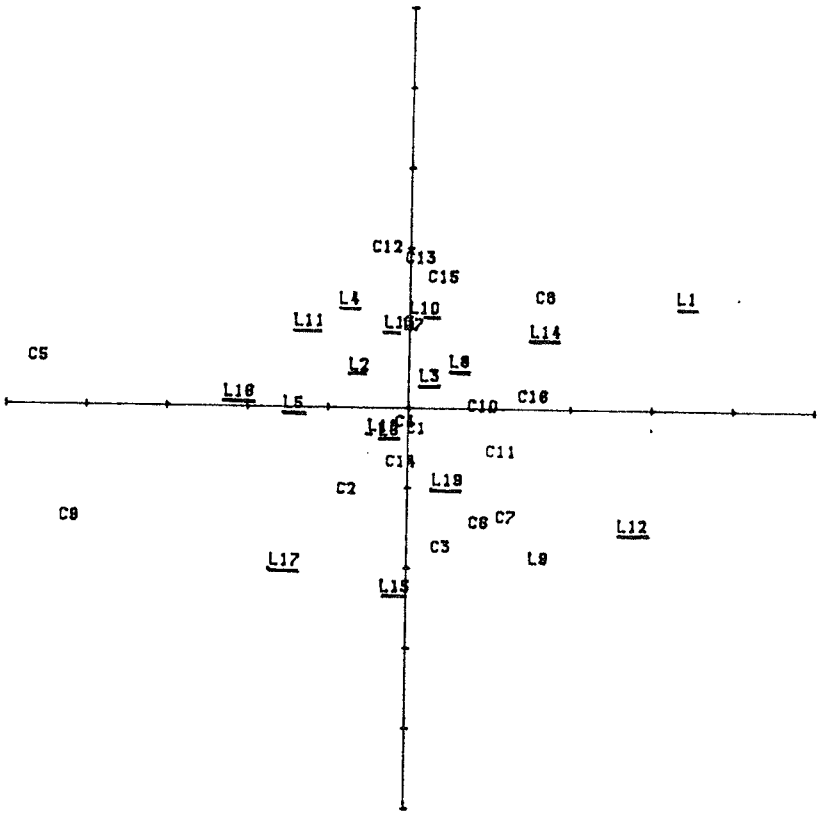
ASX THR SER GLX PRO GLY ALA VAL MET ILE LEU TYR PHE LYS HIS ARG
C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16

	Identi-ficateur	Genre espèce
L1	1	Spodoptera littoralis
	2	Spodoptera frugiperda
L2	3	Sesamia nonagrioides
	4	Heliothis armigera
	5	Mamestra brassicae
L3	6	Mamestra suaza
L4	7	Scotia segetum
	8	Earias insulana
L5	9	Mocis latipes
L6	10	Thaumetopoea pityocampa
L7	11	Ostrinia nubilalis
L8	12	Galleria mellonella
L9	13	Ephestia kuehniella
	14	Cerura cephalonica
	15	Eldana saccharina
L10	16	Diatraea saccharalis
	17	Chilo suppressalis
L11	18	Chilo partellus
	19	Chilo zacconius
L12	20	Hypsipyla robusta
L13	21	Agrotis orticae
L14	22	Yponomeuta?
L15	23	Bombyx mori
	24	Philosamia cynthia
L16	25	Malacosoma neustria
L17	26	[illegible]
L18	27	Cossus cossus
L19	28	Cryptophlebia leucotreta
	29	Pieris brassicae



Arbre hiérarchique de classification des lépidoptères étudiés d'après les compositions de leurs arylphorines semi-purifiées.

Premier plan factoriel de l'analyse des correspondances effectuée sur le tableau présenté en page 1 de cette annexe.



PLAN FACTORIEL 1-2

% de l'inertie representée par

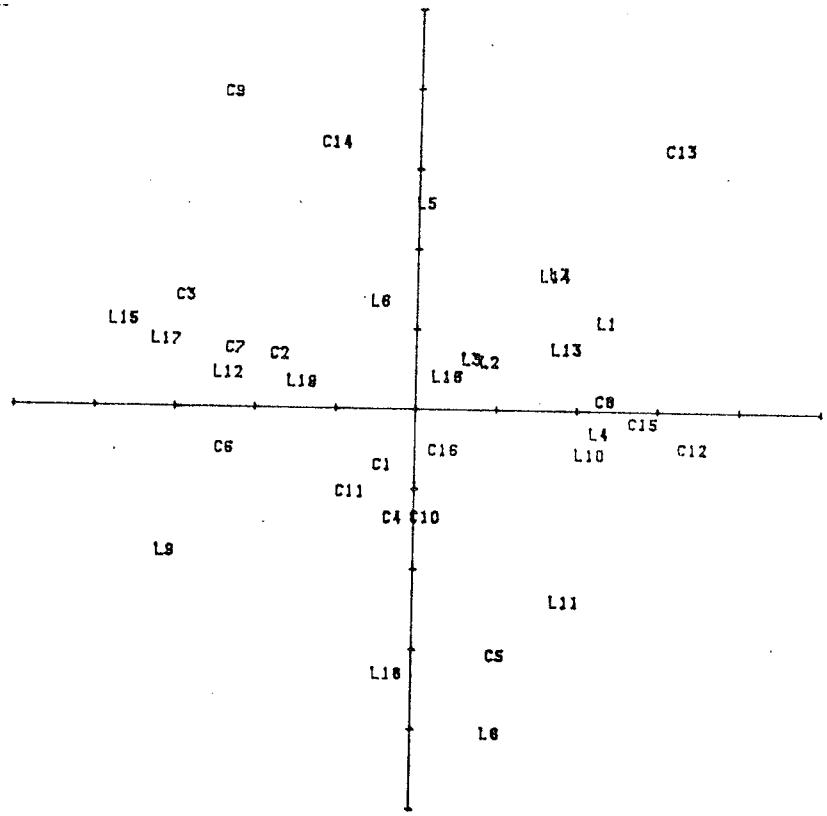
le Facteur 1 28,0%

le Facteur 2 19,4%

Pages suivante : plans factoriels 2/3 et 3/4

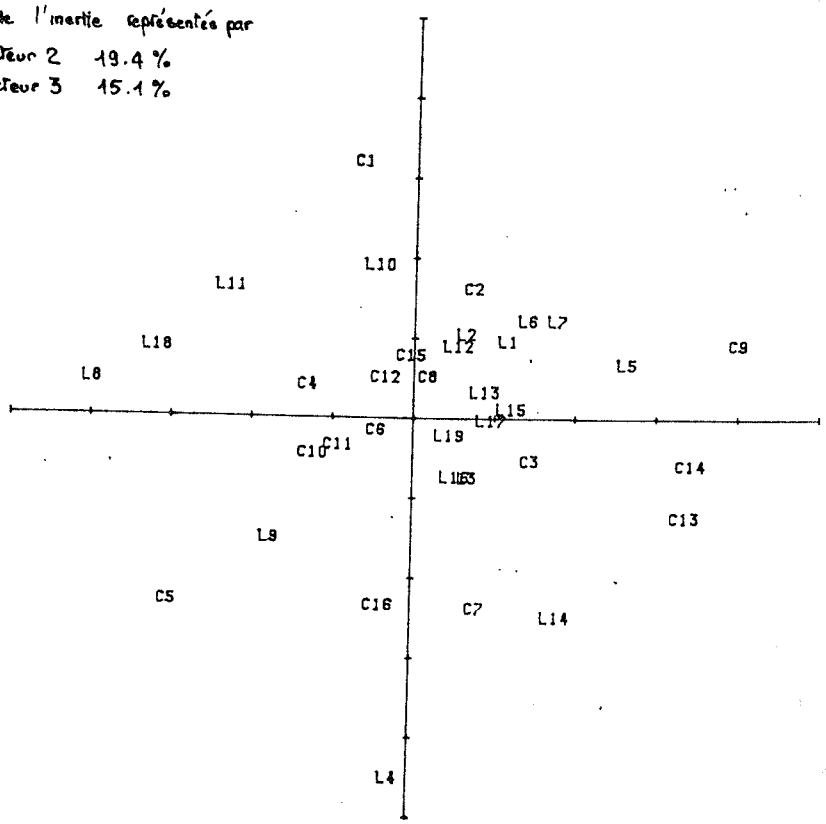
ASX THR SER GLX PRO GLY ALA VAL MET ILE LEU TYR PHE LYS HIS ARG
C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16

Identificateur		Genre espèce
L1	1	Spodoptera littoralis
	2	Spodoptera frugiperda
L2	3	Sesamia nonagrioides
	4	Heliothis armigera
	5	Mamestra brassicae
L3	6	Mamestra suaza
L4	7	Scotia segetum
	8	Earias insulana
L5	9	Hoc[illegible] latipes
L6	10	Thaumetopoea pityocampa
L7	11	Ostrinia nubilalis
L8	12	Galleria mellonella
L9	13	Ephestia kuehniella
	14	Corcyra cephalonica
	15	Eldana saccharina
L10	16	Diatraea saccharalis
	17	Chilo suppressalis
L11	18	Chilo partellus
	19	Chilo zacconius
L12	20	Hypsipyla robusta
L13	21	Aglais urticae
L14	22	Yponomeuta?
L15	23	Bombyx mori
	24	Philosamia cynthia
L16	25	Malacosoma neustria
L17	26	" "
L18	27	Cossus cossus
L19	28	Cryptophlebia leucotreta
	29	Pieris brassicae



PLAN FACTORIEL 2-3

% de l'inertie représentée par
le Facteur 2 19.4 %
le Facteur 3 15.1 %



PLAN FACTORIEL 3-4

% de l'inertie représentée par
le Facteur 3 15,1%
le Facteur 4 11,8%