

PROTECTION PHYTOSANITAIRE: EVALUATION IN VITRO DE NOUVEAUX INSECTICIDES AGONISTES DE L'HORMONE DE MUE

**SOLTANI
Noureddine*
BERGHICHE
Hind***

RESUME.

Le RH-0345, dernier représentant de la benzoylhydrazine, a été additionné au milieu de culture à deux concentrations finales (1 et 10 μM) et évalué sur la production d'ecdystéroïdes et la sécrétion cuticulaire au niveau d'explants tégumentaires nymphaux d'un insecte des denrées stockées, *Tenebrio molitor*. Les dosages enzymo-immunologiques des ecdystéroïdes libérés dans le milieu de culture montrent que le RH-0345 stimule significativement la production hormonale. De plus, le RH-0345, additionné au milieu de culture est capable d'induire, comme le 20-hydroxyecdysone, la sécrétion d'une nouvelle cuticule avec une augmentation significative des épaisseurs des cuticules. Enfin, les protéines des cuticules induites ont été extraites et analysées par électrophorèse. La comparaison des profils électrophorétiques révèle qu'il n'y a pas de différence qualitative et quantitative entre les séries témoins et traitées.

ABSTRACT

*Crop protection: evaluation of novel insecticides agonistic of the moulting hormone. RH-0345, the last benzoylhydrazine derivative was added to the culture medium at two final concentrations (1 et 10 μM) and evaluated on ecdysteroides production and cuticle secretion in pupal integumental explants from an insect pest of stored products, *Tenebrio molitor*. The enzymeimmunoassay measurements of ecdysteroids showed that RH-0345 increased significantly the amount of ecdysteroid released into the culture medium by pupal integumental explants. Moreover, RH-0345 was able to secrete a new cuticle significantly thicker than that induced by 20-hydroxyecdysone. Then, proteins from cuticles induced in vitro by 20-hydroxyecdysone or RH-0345 were analysed by electrophoresis. There was no qualitative or quantitative differences in*

the electrophoretic pattern of proteins from cuticles induced in vitro between control and treated series.

Mots clés: Pesticides, Régulateurs de croissance des insectes, RH-0345, Denrées stockées, Hormones, Cuticule.

INTRODUCTION

La lutte chimique continue à être le moyen majeur de protection des récoltes. En 1990, le marché mondial des pesticides représente quelques \$ 23 billion dont 28% pour les seuls insecticides (Casida & Quistad, 1998). L'augmentation de la productivité agricole durant ces dernières décennies est due à un contrôle chimique des ravageurs par des pesticides chimiques de synthèse. Cependant, plusieurs arguments, tels les effets secondaires des insecticides conventionnels ou les impératifs environnementaux, ont poussé l'industrie chimique à rechercher des composés alternatifs plus sélectifs agissant sur des processus spécifiques aux organismes visés appelés régulateurs de croissance. Les premiers régulateurs de croissance ont fait leur apparition en 1983 avec les benzoylurées (Casida & Quistad, 1998). Les benzoylurées sont des inhibiteurs de la synthèse de la chitine (Soltani, 1991; Soltani & Soltani-Mazouni, 1992; Soltani *et al.*, 1984, 1989, 1993; Khebbab *et al.*, 1997). L'hormone de mue joue un rôle majeur dans le développement et la reproduction des insectes (Gäde *et al.*, 1997) et constitue une cible potentielle spécifique recherchée pour le contrôle des ravageurs (Dinan, 1989). L'évaluation des régulateurs de croissance des insectes dans le cadre de la protection des denrées stockées présente un intérêt en raison du développement d'une résistance aux insecticides et de la limitation de l'utilisation de fumigants. Le RH-0345 est un insecticide sélectif représentant de la benzoylhydrazine. Ce nouveau composé à structure non stéroïdale mime l'action de l'hormone de mue, la 20-hydroxyecdysone (Dhadialla *et al.*, 1998; Smagghe & Degheele, 1998).

Le tégument nymphal produit des ecdystéroïdes dans le milieu culture (Delbecque *et al.*, 1990; Soltani *et al.*, 1987). C'est pourquoi, l'action de ce produit, additionné au milieu de culture, a été d'abord examinée sur la quantité d'ecdystéroïdes libérée dans le milieu de culture par des explants tégumentaires nymphaux. Ensuite, ses effets sont observés sur la sécrétion cuticulaire au niveau des explants cultivés en l'absence ou en présence de la 20-hydroxyecdysone sachant que la 20-hydroxyecdysone induit *in vivo* et *in vitro* la sécrétion d'une nouvelle cuticule (Quennedey *et al.*, 19983, Soltani *et al.*, 1984, 1987).

MATERIEL ET METHODES

Insectes: Les adultes de *T.molitor* sont élevés dans des bacs contenant de la farine de blé à une température de 27°C, une humidité relative voisine de 80 % et à l'obscurité.

Traitement: Les mimétiques des ecdystéroïdes, RH-5849, RH-5992 et RH-0345 (Rohm & Haas Company, USA) ont été aimablement fourni par Dr. G. Smagghe (Belgique) tandis que le KK-42 par Pr. Kuwano (Japon). Tous les produits ont été additionnés au milieu de culture à deux concentrations finales (1 et/ou 10 µM).

Procédure de culture des organes: La culture des explants a été réalisée selon Soltani *et al.* (1996a). Des explants tégumentaires nymphaux (6 sternites abdominaux) sont prélevés de nymphes nouvellement exuviées et incubés à 26°C pendant 6 jours dans du milieu de Landureau (Landureau & Grellet, 1972) légèrement modifié (Quenecdy *et al.*, 1983).

Dosage de l'hormone de mue: Les ecdystéroïdes ont été dosés par une méthode immuno-enzymatique (EIA) décrite par Aribi *et al.* (1997) dans une fraction aliquote du milieu de culture (50µl). Après centrifugation de l'échantillon dans du méthanol, le surnageant obtenu est séché et l'extrait sec est repris dans du tampon EIA. Le dosage EIA est réalisé avec un anticorps polyclonal B, un traceur enzymatique, la peroxydase, un révélateur, la tétraméthyl benzidine et l'ecdysone comme hormone de référence.

Technique de microscopie électronique à transmission: Des explants tégumentaires, prélevés sur des nymphes nouvellement exuviées et mis en culture, sont fixés à différents moments au cours de l'incubation. Après fixation selon la méthode de Karnovsky (1965) modifiée par Friend et Farquhar (1967) et inclusion (Andersen & Ellis, 1965), des coupes semi-fines sont confectionnées à l'aide d'un ultramicrotome LKB Ultratome V. L'épaisseur des cuticules induites in vitro est déterminée sur des coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine.

Analyse électrophorétique des protéines cuticulaires: La séparation électro-phorétique des protéines cuticulaires a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970) décrite antérieurement (Soltani, 1990) en utilisant un gel de polyacrylamide (PAGE) additionné de sodium dodécyl sulfate (SDS, 9%). La coloration des gels a été faite avec le bleu brillant de coomassie (R 250).

RESULTATS

Production hormonal par l'épiderme mis en culture:

Les dosages enzymo-immunologiques des ecdystéroïdes libérés dans le milieu de culture ont réalisés à différents temps au cours de l'incubation. Les résultats présentés dans la figure 1 montrent que le RH-0345 augmente significativement la production de l'hormone de mue par les

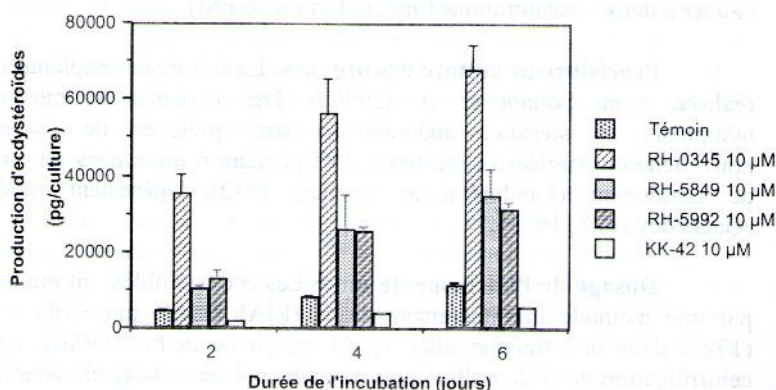


Figure 1. Effet *in vitro* de divers agonistes (RH-5849, RH-5992, RH-0345) et d'un antagoniste (KK-42) de l'hormone de mue sur la production cumulée d'ecdystéroïdes (pg équivalent ecdysone/culture) dans le milieu de culture par les explants tégumentaires nymphaux de *Tenebrio molitor* en fonction du temps au cours de l'incubation ($m \pm s$, $n=4-5$ cultures).

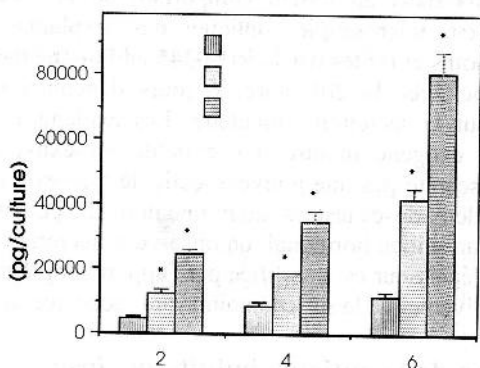


Figure 2. Effet *in vitro* du RH-0345 additionné à deux concentrations finales (1 et 10 μM) sur la production cumulée d'ecdystéroïdes (pg équivalent ecdysone/culture) dans le milieu de culture par les explants tégumentaires nymphaux de *Tenebrio molitor* en fonction du temps au cours de l'incubation ($m \pm s$, $n=4-5$ cultures).

explants tégumentaires nymphaux de manière plus importante que les autres agonistes testés (RH-5849 et RH-5992). Par contre, le KK-42, un dérivé de l'imidazole considéré comme un inhibiteur de la biosynthèse des ecdystéroïdes, réduit significativement ($p < 0,05$) d'environ de moitié la production hormonale *in vitro* par des explants tégumentaires nymphaux. Les taux enregistrés chez la série traitée avec le RH-0345 sont plus élevés (approximativement d'un facteur de 4) par rapport aux témoins et d'un facteur de 2 par rapport aux deux autres mimétiques des ecdystéroïdes, RH-5849 et RH-5992. Par contre, le KK-42, un dérivé de l'imidazole considéré comme un inhibiteur de la biosynthèse des ecdystéroïdes, réduit significativement ($p < 0,05$) d'environ de moitié la production hormonale *in vitro* par des explants tégumentaires nymphaux (Fig. 1). Le RH-0345 a été retenu pour la suite de nos expériences et testé à deux concentrations finales dans un milieu de culture (1 et 10 μM) sur la production d'ecdystéroïdes par des explants tégumentaires. Les données obtenues indiquent une stimulation significative ($p < 0,05$) de cette production hormonale *in vitro* avec une relation doses-réponse (Fig. 2).

Secrétion de la cuticule *in vitro*:

Le RH-0345 a été testé à deux concentrations finales dans un milieu de culture (1 et 10 μM) sur la sécrétion de la cuticule par des explants tégumentaires. Les explants tégumentaires nymphaux (6 sternites

abdominaux) sont prélevés de nymphes nouvellement exuviées et cultivés pendant 6 jours dans un milieu comportant ou non de la 20E. Les observations en microscopie optique des explants tégumentaires nymphaux témoins et traités par le RH-0345 additionné dans le milieu de culture sans ou avec la 20E après 6 jours d'incubation donnent des informations sur la sécrétion cuticulaire. Les explants témoins cultivés sans hormone exogène montre une cuticule pré-exuviale apolysée et l'épiderme ne sécrète pas une nouvelle cuticule (pré-exuviale adulte). Le RH-0345 aux deux doses testées induit une nouvelle cuticule en l'absence de 20E. Dans un milieu hormonal, on observe la sécrétion d'une nouvelle cuticule dont l'épaisseur est amplifiée par l'apport supplémentaire du RH-0345 comparativement à la série témoin ayant reçue que la 20E seule.

Mensuration de la cuticule induite *in vitro*:

Les mensurations des cuticules secrétées par le tégument sternal abdominal nymphal cultivé en milieu anhormonal ou hormonal ont été réalisées sur des coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine observées à l'aide d'un microscope optique (Fig. 3). En milieu anhormonal (sans 20E), les résultats indiquent qu'il n'y a pas de sécrétion d'une nouvelle cuticule dans la série témoin (Fig. 3A). Par contre, le RH-0345, additionné au milieu de culture et en l'absence de 20E, est capable d'induire, comme le 20-hydroxyecdysone, la sécrétion d'une nouvelle cuticule. Cependant, l'épaisseur de la cuticule induite par l'agoniste des ecdystéroïdes en milieu anhormonal ne varie pas significativement en fonction de la dose et du temps au cours de la période d'incubation. En milieu hormonal, on observe l'induction d'une nouvelle cuticule dont l'épaisseur augmente significativement au cours du temps avec un effet dose (Fig. 3B). De plus, on enregistre une augmentation significative ($p < 0,05$) des épaisseurs des cuticules dans les séries traitées avec le RH-0345 en présence de la 20-hydroxyecdysone comparativement au témoin ayant reçu la 20-hydroxyecdysone seule. En effet, des augmentations significatives des épaisseurs des cuticules sont enregistrées à 4 et 6 jours d'incubation avec la dose 1 μ M et à 2, 4 et 6 jours d'incubation avec la dose 10 μ M, comparativement aux témoins de même âge.

Analyse électrophorétique des protéines cuticulaires

Les protéines hydrosolubles des cuticules pré-exuviales adultes induites *in vitro* par la 20E ou le RH-0345 ont été extraites de la paroi sternale abdominale après 6 jours d'incubation et analysées par électrophorèse sur gel en plaque de PAGE-SDS (9%). La comparaison des profils électrophorétiques révèle qu'il n'y a pas de différence qualitative et quantitative entre les protéines des cuticules induites par l'agoniste des ecdystéroïdes administré à deux doses et la cuticule témoin

induite par la 20E. En effet, 17 fractions protéiques sont détectées dans les séries témoin et traitées. De plus, il n'y a pas de différence significative au niveau de l'intensité des fractions protéiques entre le profil témoin et les profils des deux séries traitées avec le RH-0345.

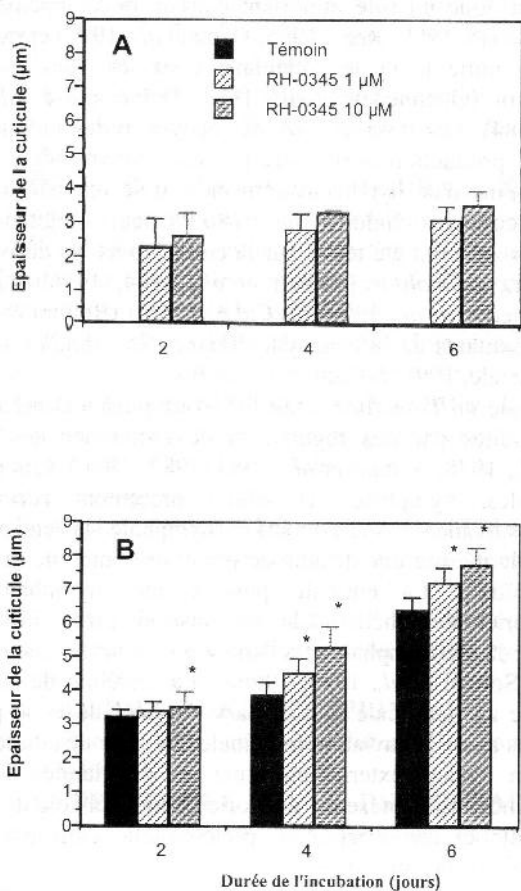


Figure 3. Effet in vitro du RH-0345 sur l'épaisseur de la nouvelle cuticule dans les explants tégumentaires nymphaux de *Tenebrio molitor* en fonction du temps au cours de l'incubation en l'absence (A) ou en présence (B) de la 20-hydroxyecdysone ($m \pm s$, $n=4-6$).

DISCUSSION

Chez *T. molitor*, la glande de mue dégénère à la veille de l'exuviation nymphale (Glietho *et al.*, 1979) et l'hormone de mue est produite par d'autres sources alternatives telles que l'épiderme chez la nymphe (Delbecque *et al.*, 1990) ou les ovaires chez l'adulte (Soltani *et al.*, 1997; Soltani-Mazouni *et al.*, 1999). Il est généralement admis que l'hormone de mue joue un rôle important dans le développement et la reproduction (Koolman, 1990; Rees, 1995; Gäde *et al.*, 1997) et que la 20-hydroxyecdysone initie le cycle cuticulaire chez les insectes y compris *T. molitor* (Quennedey *et al.*, 1983; Delbecque *et al.*, 1990; Soltani *et al.*, 1984). Les dosages EIA des ecdystéroïdes indiquent une stimulation de la production hormonale par les explants tégumentaires nymphaux à l'origine d'un hyperecdysionisme qui se manifeste sur les épaisseurs des cuticules induites *in vitro*. Plusieurs régulateurs de croissance des insectes ont été testés sur la cuticule tels les dérivés de la benzoylurée chez *T. molitor* (Soltani *et al.*, 1984, 1996b), *Ephestia kuehniella* (Bendjedou *et al.*, 1998) ou *Culex pipiens* (Rehimi & Soltani, 1999), les représentants de la benzoylhydrazine (Smagghe *et al.*, 1996; Smagghe & Degheele, 1998; Soltani *et al.*, 1999).

La cuticule de *T. molitor* a fait l'objet de plusieurs en conditions normales ou induites par des régulateurs de croissance des insectes (Delbecque *et al.*, 1978; Soltani *et al.*, 1984, 1987; 1996). Les cuticules sternales normales, nymphales et adulte présentent succinctement caractéristiques suivantes. A l'exuviation nymphale la cuticule pré-exuviale nymphale mesure une dizaine de μm et présente une orientation fibrillaire hélicoïdale. La cuticule post-exuviale nymphale, ayant également une orientation hélicoïdale, est mise en place durant les 3 premiers jours de la vie nymphale et à l'apolyse (3 jours) à une épaisseur de 12 à 14 μm (Soltani *et al.*, 1993, 1996b). La sécrétion de la cuticule adulte commence au quatrième jour de la vie nymphale et se prolonge jusqu'à 3 à 4 jours après l'exuviation imaginale. La cuticule adulte typique est pourvue d'un pavage externe ou scutes et de glandes dermiques nommées pit-glands. Elle présente une orientation hélicoïdale dans sa partie pré-exuviale et une orientation préférentielle dans partie post-exuviale.

Les mensurations des cuticules secrétées par le tégument nymphal cultivé en l'absence ou en présence de la 20-hydroxyecdysone, indiquent que le RH-0345, additionné seul au milieu de culture, est capable d'induire, comme le 20-hydroxyecdysone, la sécrétion d'une nouvelle cuticule dont l'épaisseur est significativement supérieure à celle des témoins ayant reçu la 20-hydroxyecdysone seule.

Nous pouvons conclure que les résultats obtenus montrent une action spécifique du mimétique des ecdystéroïdes testé (RH-0345) qui s'exerce via la synthèse des ecdystéroïdes. Ils confirment ainsi les travaux

rapportés sur d'autres modèles utilisant les autres agonistes tels le RH-5849 ou le RH-5992. Ces molécules sélectives et préservant l'environnement méritent d'être homologuées en Algérie et introduites dans les programmes de luttres contre les ravageurs.

REFERENCES

- ANDERSEN W.A. & ELLIS R.A.**, 1965. Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi*: flagellum, microtubules and the kinetoplast. *Journal of Protozoology* 12: 483-499.
- FRIEND D.S. & FARQUHAR H.E.**, 1967. Function of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. *Journal of Cellular Biology* 35: 357-376.
- BENDJEDOU F., BOUSLAMA Z., CHEBIRA S. & SOLTANI N.**, 1998. Effects of flucyclohexuron, a benzoylphenyl urea derivative, on growth, development and cuticle secretion in *Ephestia kuehniella*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige & Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit* 63/2b: 575-580.
- CASIDA J.E. & QUISTAD G.B.**, 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future?. *Annual Review of Entomology* 43: 1-16.
- DELBEQUE J.P., HIRN M., DELACHAMBRE J. & DE REGGI M.**, 1978. Cuticular cycle and moulting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* L. (Insecta, Coleoptera). *Developmental Biology* 64: 11-30.
- DELBEQUE J.P., WEIDNER K. & HOFFMANN K.**, 1990. Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invertebrate Reproduction & Development* 18 (1-2): 29-42.
- DINAN L.**, 1989. Ecdysteroid structure and hormonal activity. In *Ecdysone: From chemistry to mode of action* (Edited by Koolman J.) pp. 345-354. Thieme, Stuttgart.
- GÄDE G., HOFFMANN K.H. & SPRING J.H.**, 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Review* 77: 963-1032.
- GLITHO I., DELBEQUE J.P. & DELACHAMBRE J.**, 1979. Prothoracic gland involution related to moulting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* L. *Journal of Insect Physiology* 25: 187-191.
- KHEBBEB M.E.H., DELACHAMBRE J. & SOLTANII N.**, 1997. Ingested diflubenzuron disturbed the lipidic metabolism during the sexual maturation of mealworms. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 58: 209-217.
- Koolman, J.** (1990). Ecdysteroids. *Zoological Sciences* 7: 563-580.
- LAEMMLI V.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- LANDUREAU J.C. & GRELLET P.**, 1972. Nouvelles techniques de culture *in vitro* de cellules d'insectes et leurs applications. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 274 (D): 1372-1375.
- Quennedey A., Quennedey B., Delbecque J.P. & Delachambre J., 1983. The *in vitro* development of the pupal integument and the effects of ecdysteroids in *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera). *Cell & Tissue Research* 232: 493-511.
- REES, H.H.**, 1995. Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function. *European Journal of Entomology* 92: 9-39.
- REHIMI N. & SOLTANI N.**, 1998. Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* (Dip., Culicidae): effects on development and cuticle secretion. *Journal of Applied Entomology* 123: 437-441.
- SMAGGHE G., VINUELA E., BUDIA F. & DEGHEELE, D.**, 1996. *In vivo* and *in vitro* effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist tebufenozide on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: an ultrastructural approach. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology* 32:121-134.
- SOLTANI N.**, 1990. Action du duflubenzuron et de la 20-hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hémolympatiques chez les nymphes de *Tenebrio molitor* L. *Annales Société Entomologique de France* 26 (4): 575-584.
- SOLTANI N.**, 1991. A new point of attack: inhibition of chitin synthesis in insects. *Public Health* (Bayer AG Leverkusen, Germany) 8: 6-11.
- SOLTANI N., SOLTANI-MAZOUNI N., QUENNEDEY B. & DELACHAMBRE J.** 1996a - Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under *in vivo* and *in vitro* conditions: effects of diflubenzuron. *Journal of Stored Product Research* 32 (3): 205-212.
- SOLTANI N., SOLTANI-MAZOUNI N. & DELACHAMBRE J.** 1996b, Evaluation of Triflumuron, a benzoylphenylurea derivative, on *Tenebrio molitor* pupae: effects on cuticle. *Journal of Applied Entomology* 120: 627-629.
- SOLTANI N. & SOLTANI-MAZOUNI N.**, 1992. Diflubenzuron and oogenesis in codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Pesticide Science* 34: 257-261.
- SOLTANI N., DELACHAMBRE J. & DELBECQUE J.P.**, 1989. Stage-specific effects of diflubenzuron on ecdysteroid titers during the development of *Tenebrio molitor*: evidence for a change in hormonal source. *General & Comparative Endocrinology* 76: 350-356.
- SOLTANI N., DELBECQUE J.P., DELACHAMBRE J. & MAUCHAMP B.**, 1984. Inhibition of ecdysteroid increase by diflubenzuron in *Tenebrio molitor* pupae and compensation of diflubenzuron effect on cuticle secretion by 20-hydroxyecdysone. *International Journal of Invertebrate Reproduction & Development* 7: 323-332.

- SOLTANI N., QUENNEDEY A., DELBECQUE, J.P. & DELACHAMBRE J.**, 1987. Diflubenzuron induced alterations during in vitro development of *Tenebrio molitor* pupal integument. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology* 5: 201-209.
- SOLTANI N., CHEBIRA S., DELBECQUE J.P. & DELACHAMBRE J.**, 1993. Biological activity of flucycloxuron, a novel benzoylphenylurea derivative, on *Tenebrio molitor*: comparison with diflubenzuron and triflumuron. *Experientia* 49 (12): 1088-1091.
- SOLTANI, N., PITOIZET, N., SOLTANI-MAZOUNI, N., DELACHAMBRE, J. & DELBECQUE, J.P.**, 1997. Activity of an anti-ecdysteroid compound (KK-42) on ovarian development and ecdysteroid secretion in mealworms. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige & Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit* 62/2b: 531-537.
- SOLTANI-MAZOUNI N., KHEBBEB M.E.H. & SOLTANI N.**, 1999. Production d'ecdystéroïdes ovariens durant la maturation des ovocytes chez *Tenebrio molitor* (L.). *Annales Société Entomologique de France* (accepted).

*** Département de Biologie, Faculté des Sciences
Université de Annaba**