INSTITUT NATIONAL
AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Ecole Doctorale ABIES

UP-SP Hormones Antiappétantes et Protection des Cultures

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Protection des cultures

présentée et soutenue publiquement par

Dalida DARAZY-CHOUBAYA

le 19 décembre 2002

La perception gustative des phytoecdystéroïdes par les larves de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera, Pyralidae)

Taste detection of phytoecdysteroids in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis* Hübner, Lepidoptera, Pyralidae)

Directeur de thèse
Frédéric MARION-POLL

Jury :

M. Charles DESCOINS, Président
Pr. René LAFONT
Pr. Joop VAN LOON, Rapporteur
Pr. Frédéric MARION-POLL
Dr Michel RENOU, Rapporteur
Dr Denis THIERY

© UMLV

Remerciements

L'opportunité que j'ai eu de poursuivre mes études en France, d'être accueillie par le Laboratoire des Médiateurs Chimiques de l'INRA de Versailles, m'a procuré un appui scientifique et culturel immense. Ma gratitude est extrême pour tous ceux qui m'ont accueillie et aidée à apprendre, à m'intégrer et à évoluer.

Je remercie M. C. Descoins, R. Delorme et P. Leroux de m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Phytopharmacie de l'INRA de Versailles.

Je remercie vivement Pr. Marion-Poll, de m'avoir pris en CESA puis en DEA et ensuite en thèse. Je le remercie pour ses précieux conseils (surtout en informatique), l'attention qu'il a manifestée pour mon travail, sa patience et sa confiance en moi. Certes, je ne peux oublier comment il critiquait mes proverbes libanais.

J'ai eu la chance d'être accueillie dans une équipe animée par un esprit d'amitié et d'enthousiasme. Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à :

Mademoiselle Nicole Hawlitzky, Directeur de recherche à l'INRA, qui m'a accompagnée, et qui s'est intéressée de près à mon sujet en étant d'un soutien considérable. Je la remercie pour les bons yaourts normands, j'ai vraiment apprécié sa générosité ainsi que mon séjour dans l'Orne. Je remercie sincèrement M. Renou, directeur de recherche du laboratoire des Médiateurs Chimiques pour son aide ponctuelle, ses conseils et surtout sa participation à la direction de ma thèse. Je remercie Mme Andrée Berthier pour sa présence réconfortante, son optimisme de tout instant, et son assistance. Je remercie Madame Patricia Nel pour son amitié, ses connaissances et ses encouragements qui m'ont été d'une grande aide surtout dans les moments durs. Philippe Lucas, chargé de recherche au sein de l'équipe, je le remercie pour l'attention constante qu'il a manifestée à l'égard de mon travail, et pour les différentes questions scientifiques qu'il me posait. Madame Dominique Tauban qui m'a aimablement soutenue et assistée, et m'a aidée à réaliser la partie recherche anatomique du récepteur aux antiappétents, une partie qui malheureusement n'a pas été présentée mais qui servira certainement à d'autres personnes ultérieurement.

Durant ma thèse, d'autres thésards préparaient leurs thèses au sein du laboratoire. Xavier Grosmaitre, Nicolas Meunier m'ont appris à vivre et à parler le français. Ils étaient là pour les problèmes d'informatique (qui étaient quelquefois très fréquents), ils évaluaient mon travail au fur et à mesure, et surtout j'ai trop apprécié leurs goûts musicaux, leur franchise et leur modestie. Ils ne se lassaient pas. Xavier, je te remercie pour tes explications scientifiques,

tes encouragements et ton écoute surtout quand j'avais le mal du pays, je te souhaite une brillante carrière. Nicolas merci d'avoir été là, tu donnais toujours sans jamais rien demander (quelquefois un thé japonais au goût assez bizarre). Nadège Miklas (Petit-Jean sur la route de la vie …), j'aurais voulu être plus présente pour discuter de tant de choses (ça n'aurait pas plu au big-boss), j'ai trop apprécié ton amitié et tes astuces de relaxation. J'ai été chanceuse (veinarde comme on dit) d'avoir vécu mes dernières années d'études avec des étudiants si adorables et si brillants.

Je tiens à remercier encore, les personnes qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, comme Thérèse Lasnier, Bachir Mokhbi, Olivier Dupré, Isabelle Malosse, Martine Letteré, Bertrand.

Je remercie Messieurs Peter Roessingh et Laurence Dinan qui ont inspiré et participé à mon travail. Leur amitié et leurs conseils m'ont été très précieux.

Je remercie aussi les membres de ma famille qui me suivaient de loin et à la fin de près, de m'avoir encouragée quand je désespérais.

Je remercie Charbel, qui a su m'encourager à faire des études et à voyager. Il était là dans les moments difficiles pour me soutenir et me pousser à rédiger, et dans les moments agréables pour profiter de la cuisine française. Ce fut une expérience unique notre séjour à l'étranger, pleine de surprises, surtout l'arrivée de Joey. C'est le plus beau cadeau que nous avons ramené au Liban (il grandit vite et comprend le français!).

A la fin, je ne pourrais pas rédiger ma propre thèse sans y glisser un petit proverbe libanais, qui dit : « Dites à celui qui m'a appris une simple lettre, je serais son serviteur ».

Résumé

Mon sujet de thèse consistait à étudier les mécanismes de détection des phytoecdystéroïdes chez la Pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner. Des études préalables, ont montré en effet que la Pyrale du maïs détectait ces produits, chez les larves, grâce à des organes gustatifs. En outre, la présence des phytoecdystéroïdes dans l'alimentation inhibait la prise de nourriture. Ces composés ont donc un double aspect, hormones car ils induisent la mue et antiappétents car ils sont détectés par des cellules gustatives et inhibent l'alimentation.

Nous avons précisé les modalités d'action de ces composés sur les cellules gustatives. Dans un premier temps, en précisant le spectre de sensibilité des récepteurs gustatifs. A l'aide de 20 composés différents, nous avons montré que les récepteurs gustatifs avaient une sensibilité (1) différente des récepteurs hormonaux et (2) qu'ils différaient selon le type des sensilles gustatives. Ces résultats suggèrent que d'autres molécules que l'hormone de mue (la 20-hydroxyecdysone ou 20E) peuvent avoir un effet antiappétent plus grand.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mettre en relation la sélectivité de l'alimentation avec la sensibilité aux ecdystéroïdes en mesurant l'activité humorale induite dans les cellules gustatives chez des larves de différentes espèces d'Ostrinia qui ont un régime alimentaire différent (oligophage ou sélectif versus polyphage ou peu sélectif). Les résultats de cette étude a permis de montrer que la sélectivité du régime alimentaire n'a pas de relation directe avec la sensibilité aux ecdystéroïdes.

Dans un troisième temps, nous avons tenté d'évaluer si les ecdystéroïdes présentés de manière externe par rapport aux organes gustatifs avaient le même effet que lorsqu'ils étaient injectés dans l'animal. En effet, les animaux proches de la mue cessent de s'alimenter et nous voulions vérifier si le pic hormonal interne ne modifiait pas la sensibilité gustative ce qui aurait pu diminuer la motivation alimentaire. Les expériences menées se sont faites en trois étapes : (1) par une mesure de la sensibilité gustative au cours du stade larvaire sur des insectes alimentés en milieu artificiel ou

des feuilles naturelles (2) par une exposition des sensilles à une solution de 20E ou solution saline de la larve (3) par une injection de 20E ou de solution saline dans la larve. Les résultats obtenus montrent que la sensibilité évolue au cours du temps et qu'il est impossible d'enregistrer l'activité électrique des neurones gustatifs en fin de stade, probablement pour des problèmes techniques. L'exposition des sensilles est un protocole traumatique qui donne des résultats intéressants, dans la mesure où l'activité des cellules gustatives semble inhibée. L'injection de 20E montre clairement que le taux d'ecdystéroïdes interne n'a pas d'incidence sur la sensibilité mais module par contre l'alimentation.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons tenté d'élucider par quelle cellule sont perçus les ecdystéroïdes et si ce sont les mêmes cellules qui détectent toutes les substances antiappétentes. Les protocoles utilisés ont consisté à présenter des substances en mélange et à exposer les cellules à l'un des composés au préalable. Les résultats obtenus étaient en faveur de l'hypothèse qui prévoit que les phytoecdystéroïdes excitent le récepteur aux antiappétents.

Les phytoecdystéroïdes jouent un rôle de métabolites secondaires de défense, au moins à l'égard de la Pyrale du maïs.

MOTS-CLEFS

Gustation, sensilles styloconiques, phytoecdystéroïdes, hormones de mue, *Ostrinia nubilalis*, électrophysiologie, comportement.

TABLE DES MATIERES

Remerciements *2*

Résumé *4*

1 Introduction générale *1*

2 Phytoecdystéroïdes et antiappétents *4*

2.1 Pourquoi les phytoecdystéroïdes ? **4**

2.1.1 Généralités 4

2.1.2 Caractéristiques chimiques 6

2.1.3 Effets sur les insectes 7

2.2 Quel rôle joue l'antiappétance lors de la sélection d'une plante-hôte ? **10**

2.2.1 Antiappétence 11

2.2.2 Les récepteurs gustatifs 12

2.2.3 Codage sensoriel 15

2.2.4 Perception des antiappétents et alimentation 16

3 Mécanismes de détection des phytoecdystéroïdes *19*

3.1 Effets des phytoecdystéroïdes sur le comportement **19**

3.1.1 Introduction 19

3.1.2 Matériels et Méthodes 20

3.1.3 Résultats 22

3.1.4 Discussion 24

3.2 Détection des phytoecdystéroïdes chez Ostrinia nubilalis **27**

3.2.1 Introduction 27

3.2.2 Matériels et Méthodes 28

3.2.3 Résultats 33

3.2.4 Discussion 45

3.3 Détection des phytoecdystéroïdes dans le genre Ostrinia 49
3.3.1 Introduction 49
3.3.2 Matériels et méthodes 53
3.3.3 Résultats 55
3.3.4 Discussion 62
4 Modulation de la perception 67
4.1 Est-ce qu'un pic d'ecdystéroïdes module la sensibilité gustative ? 69
4.1.1 Introduction 69
4.1.2 Matériels et méthodes 70
4.1.3 Résultats 71
4.1.4 Discussion 74
4.2 Effet d'une exposition à la 20E sur les sensilles gustatives 78
4.2.1 Introduction 78
4.2.2 Matériels et méthodes 79
4.2.3 Résultats 82
4.2.4 Discussion 83
4.3 Modulation de la sensibilité gustative par l'âge et le régime alimentaire. 88
4.3.1 Introduction 88
4.3.2 Matériels et Méthodes 91
4.3.3 Résultats 92
4.3.4 Discussion 97
4.4 Conclusion 100
5 Quelles cellules répondent aux phytoecdystéroïdes ? 103
5.1 Introduction 103
5.2 Adaptation croisée 105
5.3 Mélanges binaires 108
5.3.1 Introduction 108
5.3.2 Matériels et Méthodes 109
5.3.3 Résultats 110
5.4 Intervalles inter-spikes (ISI) : 116

5.5 Test de PSTH 117

5.6 Discussion 118

6 Conclusion générale 122

7 Bibliographie 128

8 ANNEXE I Photos d'Ostrinia nubilalis 142

9 ANNEXE II Composition du milieu alimentaire 143

10 ANNEXE III: Analyse statistique 144

1) Réponses aux standards 144

2) Sensilles latérales 146

3) Sensilles médiales 148

LISTE DES FIGURES

Figure II-1 Structure chimique de la 20-hydroxyecdysone (20E) 6
Figure II-3. Structure chimique du RH-5849 (a) et RH-5992 (b) 8
Figure II-4 Organes sensoriels gustatifs et olfactifs présents sur la capsule céphalique de larves de lépidoptères (reproduit de Bernays et Chapman, 1994) 13
Figure II-5 Sensilles styloconiques de *Mamestra brassicae* (cliché C. Descoins) 14
Figure II-7 Relation entre l'activité des cellules gustatives et l'alimentation (Bernays et Chapman, 1994) 17
Figure III-1 Structures chimiques de l'azadirachtine (a) et du myo-inositol (b) 20
Figure III-3 Schéma de principe du test de choix alimentaire. 22
Figure III-5 Résultats des tests de choix alimentaires effectués sur les larves de stade L5 24
Figure III-7. Principe de l'amplificateur TastePROBE 31
Figure III-9. Programme AWAVE 32
Figure III-11. Réponses obtenues à l'inositol, à la 20E et au KCl 34
Figure III-13 Distribution des amplitudes de potentiels d'action en fonction de la sensille et du stimulus 34
Figure III-14. Exemples de réponses à des phytoecdystéroïdes 36
Figure III-15 Groupe I – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales 40
Figure III-17 Groupe II – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales 41
Figure III-19 Groupe III - – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales 42
Figure III-21 Groupe IV – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales 43
Figure III-23 Comparaison des courbes dose-réponse des différents produits testés .. 44
Figure III-25 Arbres phylogéniques du genre *Ostrinia* 51
Figure III-26 Réponses électrophysiologiques des sensilles gustatives de Pyrales japonaises aux différents stimuli 56
Figure III-28 Réponses obtenues sur des larves d'*Ostrinia furnacalis* de chine et du japon 57

Figure III-30. Réponses des sensilles du palpe maxillaire chez *O. palustralis, zealis, zaguliaevi, latipennis* 61
Figure IV-1 Injection de 20E dans l'hémolymphe 69
Figure IV-2 Choix alimentaires effectués par des chenilles traitées avec du sérum ou de l'inositol 71
Figure IV-3 Comportement alimentaire des larves jeunes (< 6 heures) traitées à la 20E 72
Figure IV-4 Comportement alimentaire des larves plus âgées (> 3 jours) traitées à la 20E 73
Figure IV-5 Exposition des sensilles gustatives à une solution de 20E..... 79
Figure IV-6 Incidence d'une exposition prolongée à un stimulus sur la sensibilité gustative 81
Figure IV-7 Exemples d'enregistrement obtenus après une exposition à la 20E 82
Figure IV-8 Fréquence des larves éliminées en fonction de l'âge..... 93
Figure IV-10 Exemples d'enregistrements obtenus sur larves de pyrales de différents âges 94
Figure IV-12 Exemple de potentiels d'action anormaux fréquents chez des larves jeunes 94
Figure IV-14 Evolution de la réponse au KCl et à l'inositol au cours du dernier stade larvaire 96
Figure IV-16 Evolution de la réponse à la 20E au cours du dernier stade larvaire. 96
Figure V-1 Exemples de réponses de la sensille latérale à la 20E, à la proline et à la leucine 105
Figure V-2 Dispositif mis au point pour permettre de pratiquer des enregistrements en adaptation croisée..... 106
Figure V-3. Protocole de stimulation utilisé pour les tests d'adaptation croisée..... 107
Figure V-4 Adaptation croisée 20E / azadirachtine sur la sensille médiale. 107
Figure V-5. Types de réponses obtenues avec des mélanges binaires..... 109
Figure V-6 Réponses au fructose et à l'inositol..... 110
Figure V-7. Réponses à l'azadirachtine 111
Figure V-8 Réponses des sensilles médiales à des produits purs et en mélange avec la 20E à des doses de 10^{-3}M et 10^{-4}M (3-6 répétitions par point expérimental)..... 112
Figure V-9 Exemples d'enregistrements obtenus avec un mélange binaire. 114

Figure V-10. Dessin hypothétique sur la spécialisation et la distribution des 4 neurones gustatifs dans une sensille médiale d'*Ostrinia nubilalis*. 115
Figure V-11 Réponses un mélange d'azadirachtine et de 20E 115
Figure V-12 Distribution des potentiels d'action émis pendant les 100 premières ms suite à une stimulation par l'azadirachtine et la 20E à 10^{-5}M. 116
Figure V-13 Décours temporel des réponses à la 20E et à l'azadirachtine. 118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau III-1 Origines des substances chimiques testées en électrophysiologie 28
Tableau III-3 Plantes-hôtes préférées des espèces d'*Ostrinia* trouvées au Japon (d'après Ishikawa) 52
Tableau III-4 Taux de phytoecdystéroïdes dans les plantes-hôtes des espèces d'*Ostrinia.* 53
Tableau III-5 Tableau récapitulatif des réponses observées chez trois espèces d'*Ostrinia* : *O. nubilalis* (polyphage), *O. scapulalis* (oligophage) et *O. zealis* (monophage). 58
Tableau IV-1 Critères utilisés pour caractériser les réponses électrophysiologiques. . 81

1 INTRODUCTION GENERALE

Il y a quatre cent millions d'années, les plantes ont conquis la terre ferme. Pendant les 40 millions d'années qui ont suivi, une végétation dense s'est développée et les premiers insectes sont apparus. Les relations entre insectes et plantes se sont établies puis diversifiées à un point tel que la moitié des espèces d'insectes est aujourd'hui phytophage. Les plantes représentent leur source de nourriture, leur abri, leur lieu de développement, d'accouplement ou de ponte. Face à ces phytophages, les plantes se défendent par divers moyens physiques, et par voie chimique en synthétisant des métabolites secondaires extraordinairement diversifiés. Ils sont souvent connus pour leur toxicité pour les herbivores, et ils affectent profondément le comportement des insectes phytophages. Bien que les nutriments de la plante jouent également un rôle, on considère généralement que les substances secondaires sont directement responsables de la sélectivité du régime alimentaire des insectes phytophages. Cette sélectivité est associée à des adaptations métaboliques mais aussi à des capacités comportementales permettant aux phytophages de trouver leurs plantes-hôtes mais aussi d'éviter celles qui ne leur conviennent pas. Ces insectes ont développé un système chimiosensoriel qui leur permet de reconnaître et de répondre à cette diversité de métabolites secondaires des plantes. Il existe deux formes de chimioréception : la chimioréception de contact, ou gustation et la chimioréception à distance, ou olfaction.

Nous avons choisi de travailler sur les larves de Lépidoptères. Bien que les adultes jouent un rôle important dans la sélection d'une plante-hôte (Schoonhoven, 1987; Bernays et Weiss, 1996), les chenilles sont responsables des dégâts. Elles possèdent des capacités de reconnaissance importantes malgré des systèmes de perception sensorielle plus rudimentaires (Glendinning *et al.*, 1998). Il nous a paru intéressant d'étudier la gustation chez les larves de Lépidoptères parce qu'elle joue un rôle prépondérant dans le contrôle de leur alimentation, en particulier dans la détection de

métabolites secondaires des plantes. Parmi ces métabolites secondaires, il est une famille relativement bien connue, les phytoecdystéroïdes. Ces molécules, produites par les plantes sont des analogues de mue des insectes. La plus commune est la 20-hydroxyecdysone (20E). Notre question de recherche principale était :

Les phytoecdystéroïdes ont-ils un effet antiappétent sur les larves de la Pyrale du maïs, comment sont-ils détectés et ont-ils un effet sur la physiologie des récepteurs gustatifs ?

La Pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera, Pyralidae) (voir annexe I) est un ravageur qui n'avait jamais été étudié pour sa réaction face aux ecdystéroïdes, sauf récemment à l'occasion du travail de thèse de C. Descoins Jr. Celui-ci, lors d'une étude comparative sur quatre espèces de Lépidoptères, a pu montrer que la Pyrale du maïs présente une forte perception gustative aux ecdystéroïdes.

Nous avons poursuivi ces recherches :

1. En évaluant **le rôle antiappétent des phytoecdystéroïdes** sur cette espèce de ravageur par des tests de comportement alimentaire
2. En analysant la **perception d'un ensemble de molécules structurellement proches de l'ecdysone** et de la 20E ou encore à effet agoniste de la 20E, afin de permettre une comparaison avec l'affinité des phytoecdystéroïdes pour les récepteurs hormonaux.
3. En testant la **généralité de cette perception et en évaluant les réponses à la 20E chez des espèces du genre *Ostrinia***. Nous avons tenté d'estimer si cette perception est liée à la spécialisation du régime alimentaire en choisissant des espèces oligophages ou polyphages.
4. En effectuant des enregistrements électrophysiologiques des récepteurs gustatifs pour évaluer **l'effet des phytoecdystéroïdes sur la physiologie des récepteurs gustatifs, lors d'un contact prolongé externe ou après injection dans l'hémolymphe**.
5. Enfin, en **analysant la sélectivité de cette perception** et en la comparant à la perception d'une autre molécule antiappétente, l'azadirachtine.

J’ai effectué mon travail de recherche au sein du laboratoire de Phytopharmacie et des Médiateurs Chimiques, à l’Institut National de la Recherche Agronomique du centre de Versailles chez Monsieur Frédéric Marion-Poll. J’ai participé à la réalisation d’un projet appelé: “Hormones anti-appétentes et protection des cultures” qui a deux objectifs principaux :

- L’étude de la perception sensorielle des phytoecdystéroïdes chez les insectes.
- L'évaluation de l’intérêt de ces molécules en protection des cultures.

Au cours de ma thèse, Patricia Nel (Maître de conférences INA P-G), a participé à ce programme et a notamment encadré Simon Moyal en stage de DEA. Outre l’équipe de scientifiques de l’INRA de Versailles, participent à ce projet des équipes impliquées dans l’étude des aspects physiologiques, moléculaires et agronomiques des ecdystéroïdes :

- L’équipe du **professeur Lafont** (Ecole Nationale Supérieure, Paris) qui s’intéresse à la biosynthèse des ecdystéroïdes chez les animaux et les plantes.
- Le **Docteur L. Dinan** (Senior Lecturer, Université d’Exeter, Royaume Uni) qui étudie les effets d’ecdystéroïdes sur le développement de cellules en culture.

2 PHYTOECDYSTEROÏDES ET ANTIAPPETENTS

2.1 Pourquoi les phytoecdystéroïdes ?

Les phytoecdystéroïdes constituent une famille de molécules intéressantes synthétisées et accumulées par un grand nombre de végétaux. Ces métabolites secondaires de défense chimique pourraient être intégrés dans les plantes cultivées. Elles possèdent un effet toxique à long terme et un effet antiappétent immédiat chez quelques espèces de Lépidoptères. Ils pourraient donc écarter les phytophages des cultures à protéger.

2.1.1 Généralités

D'une manière générale, les ecdystéroïdes sont les hormones de mue des arthropodes et probablement de quelques autres invertébrés (Koolman, 1990). De nombreuses plantes produisent des agonistes de ces hormones. Sur 3000 espèces végétales évaluées, 5 à 6 % en contiennent à des concentrations significatives, c'est à dire plus de 50 ng / g de poids sec (Dinan, 1998).

Ces composés sont appelés phytoecdystéroïdes et joueraient un rôle de défense chimique contre les insectes phytophages et certains nématodes (Sláma, 1993). Le premier ecdystéroïde isolé fut l'ecdysone par Butenandt et Karlson en 1954, à partir de 500 kg de pupes de *Bombyx mori* mais ce n'est qu'en 1965, que sa structure chimique a été élucidée (Huber et Hoppe, 1965). La 20E avec la polypodine B et la ponastérone A, sont les composés rencontrés le plus fréquemment dans les plantes produisant des phytoecdystéroïdes, mais ils sont souvent produits en même temps que d'autres molécules actives biologiquement sur les insectes.

La recherche des ecdystéroïdes dans la plupart des familles du règne végétal a démontré leur large distribution. On les retrouve dans les Embryophytes (fougères,

Gymnospermes et Angiospermes) à des concentrations variables dans des espèces et des genres très voisins (Lafont, 1997). Cette hétérogénéité de distribution serait expliquée par une différence de régulation au niveau de l'expression des gènes responsables de la biosynthèse, du métabolisme et du transport des ecdystéroïdes. Certaines plantes en contiennent des concentrations assez élevées : par exemple 1g de fougère *Polypodium vulgare* contient autant d'hormones que 500 kg de la pupe de ver à soie (Blackford, 1995). Les taux d'ecdystéroïdes les plus élevés ont été trouvés dans les tiges sèches de *Diploclisia glaucescens* dont la matière sèche contient 3,2 % d'ecdystéroïdes (Bandara *et al.*, 1989). On rencontre des quantités minimes dans d'autres plantes supérieures, annuelles ou pérennes (Dinan *et al.*, 2001).

La distribution des phytoecdystéroïdes dans les plantes a été examinée en détail chez les *Chenopodiaceae* (Dinan, 1998). C'est une famille caractérisée par un nombre important d'espèces contenant des phytoecdystéroïdes ; une forte corrélation s'est révélée entre la quantité de phytoecdystéroïdes dans les graines et leur présence dans d'autres parties de la plante durant les stades tardifs de développement. Il existe cependant un gradient de distribution au sein des parties aériennes d'une plante. Les plus fortes concentrations se trouvent dans les bourgeons et les jeunes pousses. Ceci a été interprété par un rôle de protection que des ecdystéroïdes pourraient jouer dans la protection de ces organes (Adler et Grebenok, 1999; Dinan *et al.*, 2001). Ils protégeraient les parties les plus exposées à la prédation des insectes (Sláma, 1993).

L'hypothèse que les phytoecdystéroïdes soient des composés de défense des plantes n'est pas partagée par tous. Certains auteurs ont proposé que ces molécules jouent un rôle hormonal au sein des plantes. Des données récentes obtenues chez l'épinard infirment cette dernière hypothèse. En utilisant de la 20E marquée radioactivement, Schmelz *et al.* (2000) ont montré d'une part que ce composé est métaboliquement stable dans les épinards et ne peut donc jouer un rôle de phytohormone, et d'autre part que sa biosynthèse est stimulée dans les racines par l'attaque d'insectes.

2.1.2 Caractéristiques chimiques

Les phytoecdystéroïdes appartiennent à un groupe de molécules dérivées du cholestérol, groupe qui comprend aussi des hormones de plantes comme les brassinostéroïdes, des métabolites secondaires de plantes comme les withanolides et les cucurbitacines, et de nombreux polyhydroxystérols.

La structure chimique des phytoecdystéroïdes est composée essentiellement d'un squelette commun et de fonctions variées (Lafont, 1997; Dinan *et al.*, 2001) :

- Les ecdystéroïdes sont des molécules stéroïdes caractérisées par un noyau stérol portant une jonction *cis* des cycles A et B, un chromophore 6-one-7-ène sur le cycle B dérivé biosynthétiquement du cholestérol et (en général) un hydroxyle en position 14α (Figure 2-1).
- Les composés analogues aux ecdystéroïdes sont les molécules qui ne peuvent satisfaire complètement à la précédente caractéristique mais qui ont la capacité d'exercer la même activité biologique chez les insectes.

  Ils se caractérisent par des variations concernant :

1. le nombre d'atomes de carbone qui varie entre 19 et 29.
2. la présence d'un hydroxyle en C3, ou un groupe 3-oxo.
3. la présence d'un hydroxyle sur le noyau stéroïde en C1, C2, C5, C11, C12, C19.
4. la présence du groupement hydroxyle sur la chaîne latérale à C20, C22, C23, C24, C25, C26, C27, et probablement C28 ou C29.

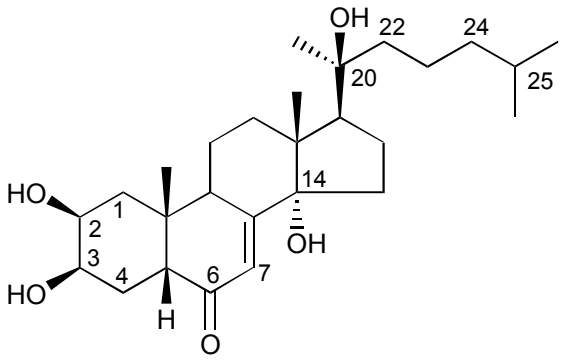


Figure 2-1 Structure chimique de la 20-hydroxyecdysone (20E)

Si l'on considère les combinaisons possibles obtenues en modifiant les structures individuelles des phytoecdystéroïdes, on pourrait prévoir l'existence dans la nature de 1000 structures différentes dont 200 à 250 permutations ont été identifiées (Lafont *et al.*, 2000; Dinan *et al.*, 2001). On rencontre des ecdystéroïdes sous forme libre, polaire (glucoses, sulfates) ou apolaire (acétates, benzoates) (Lafont et Horn, 1989). Leur identification est devenue plus simple avec l'amélioration de la spectrophotométrie. En outre, il est possible actuellement de détecter leur présence à l'aide de tests immunologiques très sensibles. La détermination de l'activité des molécules détectées ou extraites, est un critère essentiel dans la caractérisation des ecdystéroïdes (Lafont, 1997; Marion-Poll *et al.*, 2002).

Les ecdystéroïdes comprennent les hormones de mue des insectes, dont les plus connus sont la 20E et les ecdystéroïdes des végétaux (phytoecdystéroïdes). Parmi les phytostérols, le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol sont des stérols principalement utilisés par les végétaux. Leur biosynthèse n'est pas encore bien connue. Enfin, le cholestérol subit diverses oxydations et hydroxylations pour fournir les ecdysones (Lafont, 1998). L'ecdysone est libérée dans l'hémolymphe par les glandes prothoraciques. Elle est convertie dans divers tissus périphériques en 20E (appelée aussi ecdystérone, β- ecdysone, crustecdysone). La 20E est physiologiquement la forme la plus active et la plus importante des ecdystéroïdes durant les stades larvaires chez les arthropodes. La 20E coexiste avec d'autres ecdystéroïdes chez certaines punaises (Hemiptera), les abeilles (Hymenoptera), ainsi que quelques mouches, et est même remplacée par la makistérone A (Koolman, 1990).

2.1.3 Effets sur les insectes

Un apport exogène d'ecdystéroïde pourra perturber l'équilibre fragile des concentrations circulantes et le processus de mue de l'insecte ainsi que les phénomènes de croissance et de reproduction (Blackford et Dinan, 1997; Mondy *et al.*, 1999).

2.1.3.1 Actions sur le développement et la mue

L'incorporation de différentes molécules d'ecdystéroïdes (cyastérone, 20E, ponastérone A) dans l'alimentation de *Bombyx mori* et de *Spodoptera frugiperda* conduit à une inhibition de croissance, à la mort sans mue ou après la mue, selon la concentration et l'ecdystéroïde en question (Blackford, 1995). Dans une gamme limitée de concentrations, l'ecdysone appliquée à *Bombyx mori* peut induire des mues surnuméraires sans provoquer de mortalité notable (Tanaka *et al.*, 1994; Tanaka, 1995).

Ces auteurs ont étudié la concentration d'ecdystéroïdes dans l'hémolymphe et l'activité de la glande prothoracique dans des larves de stade L4, élevées sur un milieu artificiel traité avec de l'ecdysone. Chez ces larves, le niveau d'ecdystéroïdes s'élève brusquement durant les premières 24 heures, puis diminue rapidement durant les stades suivants. Par contre la glande thoracique reste inactive à ce stade, ce qui montre que dans ces conditions, les ecdystéroïdes sont synthétisés à partir de l'ecdysone provenant de l'alimentation.

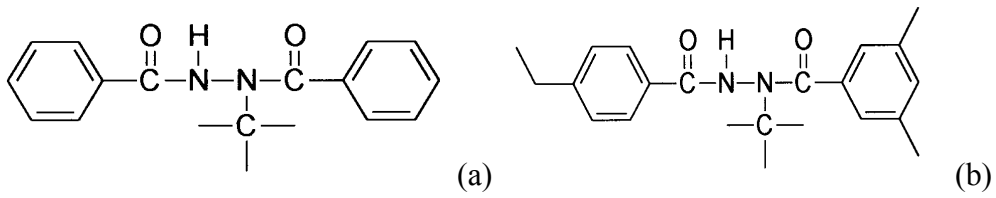


Figure 2-2. Structure chimique du RH-5849 (a) et RH-5992 (b)

Certaines molécules issues de la synthèse chimique montrent une activité similaire et représentent une nouvelle classe de régulateurs de croissance, prometteurs dans la lutte contre les insectes (Smagghe *et al.*, 1995). Les dibenzoyl hydrazines (comme la RH-5849) et le tébufénozide (RH-5992) Figure 2-2 sont les premiers agonistes synthétisés qui ne possèdent pas de noyau stéroïde. Chez les larves de *Manduca sexta*, le RH-5849 mime l'effet de la 20E. Il présente la même activité biologique que celle de la 20E *in vivo* et *in vitro* chez *Plodia interpunctella* (Smagghe *et al.*, 1995).

Chez *O. nubilalis,* l'application de RH-5849 peut causer une interruption de la diapause larvaire et induire une mue imaginale (Pszczolkowski et Kuszczak, 1996). Au cours de son DEA, Simon Moyal a étudié l'incidence de la 20E sur le développement de chenilles d'*O. nubilalis*. Il a montré, notamment à l'aide de

molécules marquées radioactivement, que cette espèce était capable de détoxiquer les ecdystéroïdes selon un mécanisme biochimique courant chez les lépidoptères du groupe des noctuelles.

2.1.3.2 Modulation de la prise alimentaire

Si la prise alimentaire est modulée par la présence d'ecdystéroïdes, cela signifie que ce composé est détecté, soit indirectement par ses effets toxiques, soit directement par des organes gustatifs. Une série de tests de comportement alimentaire, faite sur plusieurs espèces de larves de Lépidoptères (Blackford, 1995), montre qu'il existe trois catégories de réponses au niveau de la toxicité et de la perception des phytoecdystéroïdes : des espèces monophages très sensibles aux phytoecdystéroïdes, capables de détecter leur présence et d'éviter les plantes en produisant, des espèces semi-tolérantes oligophages, et des espèces polyphages tolérantes. Ces observations permettent de postuler que les ecdystéroïdes présents dans la ration alimentaire sont détectés par des récepteurs gustatifs chez les espèces sensibles.

L'effet des phytoecdystéroïdes sur des récepteurs sensoriels a été testé sur une espèce monophage, *Bombyx mori* (Tanaka *et al.*, 1994) et une oligophage *Pieris brassicae* (Ma, 1972). Chez ces deux espèces, les auteurs ont mis en évidence une sensibilité élevée par une cellule qualifiée de « deterrent cell ». Descoins et Marion-Poll ont testé en outre plusieurs espèces polyphages : *Spodoptera littoralis, Mamestra brassicae* et *Ostrinia nubilalis* (Descoins et Marion-Poll, 1999; Marion-Poll et Descoins, 2002). Ils ont trouvé chez *O. nubilalis* une forte perception de la 20E, de la ponastérone A et de l'ecdysone. Ces observations ne cadrent pas avec les hypothèses de travail proposées par Blackford (1995) selon laquelle les insectes polyphages seraient peu sensibles aux ecdystéroïdes. Cette contradiction apparente pourrait être liée à différents facteurs:

1. L'hypothèse de Blackford n'est pas complètement généralisable.
2. L'espèce *O. nubilalis*, connue pour être polyphage (répertoriée sur plus de 200 plantes-hôtes), pourrait être constituée de populations plus spécialisées (Bourguet *et al.*, 2000).
3. Nous ne pouvons pas tester toutes les substances antiappétentes pour un insecte déterminé compte tenu de leur diversité chimique, et nous ne pouvons pas déclarer

que tout insecte polyphage est indifférent à tous les antiappétents. Il reste possible qu'*Ostrinia nubilalis* soit particulièrement sensible à un groupe restreint d'ecdystéroïdes et qu'elle utilise une classe particulière de neurones gustatifs pour les détecter. Cette dernière hypothèse sera traitée dans le troisième chapitre de ce travail.

Lorsque nous avons entamé ce travail, nous ne savions pas si (1) ces molécules avaient un effet sur le comportement alimentaire de cette espèce et (2) quelle était la sélectivité de la détection des phytoecdystéroïdes. Compte tenu de l'importance économique du maïs et de l'impact économique d'*O. nubilalis*, ces éléments nous ont semblé essentiels pour évaluer l'intérêt des phytoecdystéroïdes en protection des cultures. Non seulement ces substances ont potentiellement un effet insecticide, mais elles seraient aussi antiappétentes ce qui peut présenter un intérêt dans la gestion des résistances en contribuant à limiter l'exposition des pyrales au facteur de sélection.

2.2 Quel rôle joue l'antiappétance lors de la sélection d'une plante-hôte ?

Dans ce travail, nous avons cherché à préciser par quels mécanismes les phytoecdystéroïdes peuvent être antiappétents. Alors que leur toxicité et leur rôle physiologique sont relativement bien connus, il n'existait auparavant que des descriptions limitées de leurs effets comportementaux.

D'une manière générale, évaluer la toxicité d'une plante pose un problème critique pour la survie d'un herbivore, en particulier pour des composés dont la toxicité se manifeste avec une latence de plusieurs heures, c'est à dire après que la prise alimentaire ait eu lieu. Dans ce processus d'évaluation les récepteurs gustatifs jouent un rôle primordial car ils sont les premiers à entrer en contact avec les composés de défenses des plantes. Tous les insectes possèdent des cellules chimioréceptrices qui répondent aux composés potentiellement toxiques et/ou antiappétents par un comportement adapté (Glendinning, 1996).

2.2.1 Antiappétence

2.2.1.1 Définitions

L'antiappétance est définie comme une inhibition de la prise alimentaire provoquée par des composés chimiques lors du contact physique entre l'insecte et la plante (Bernays et Chapman, 1994; Messchendorp *et al.*, 1998). L'inhibition peut être immédiate (sensorielle) ou apparaître avec un retard (intoxication). Lors de ce contact, l'insecte fait intervenir la gustation et d'autres sens tels que l'olfaction, le toucher et la vision lors du choix de la plante-hôte (Bernays et Chapman, 1994). Dans la littérature, l'antiappétance recouvre des acceptions diverses. Pour Dethier (1980), ce sont des produits capables d'orienter un mouvement de répulsion à l'égard de la source stimulante. D'autres auteurs les considèrent simplement comme des substances réduisant la consommation de l'insecte (Saxena, 1995). Isman (1995) ajoutait qu'un antiappétent agit sur les sensilles chimioréceptrices périphériques pour induire l'arrêt de l'alimentation en donnant l'exemple de l'azadirachtine. Cette modulation de l'alimentation dépend des conditions de test et des conditions physiologiques des insectes.

Un effet antiappétent peut être évalué par des tests alimentaires où les insectes ont le choix entre un substrat traité et un témoin (expérience de choix), ou bien dans des conditions où ils n'ont accès qu'à un substrat traité (expériences sans choix). L'alimentation est estimée par différentes méthodes, dont la plus directe est la mesure de la quantité de nourriture ingérée. Certains mesurent les déjections des chenilles ou leur développement. Généralement, les résultats de telles expériences sont exprimés sous la forme d'un index d'antiappétance pour les expériences de choix. Certaines molécules sont actives en situation de choix mais peu efficaces lorsque que les insectes n'ont pas le choix. Ces molécules sont qualifiées d'antiappétents relatifs. D'autres molécules inhibent complètement la prise alimentaire, même lorsque les insectes n'ont accès qu'à un substrat traité. Ces molécules sont qualifiées d'antiappétents absolus (Nawrot et Harmatha, 1994).

A partir d'expériences comportementales, il est difficile de distinguer si l'inhibition de l'alimentation est liée à une stimulation de récepteurs sensoriels ou bien à une toxicité. Ces deux effets peuvent être combinés ou non, ou encore faire

intervenir des facteurs comportementaux comme l'apprentissage (Bernays et Chapman, 1994). Il est donc nécessaire de compléter les études comportementales soit par une observation plus fine du comportement de prise alimentaire, soit par une étude électrophysiologique pour évaluer la sensibilité des neurones gustatifs à ces composés.

2.2.1.2 Antiappétence et toxicité

La séparation de l'effet antiappétent des composés toxiques sur les récepteurs gustatifs avant l'ingestion et l'effet, après l'ingestion, sur le comportement alimentaire est très difficile parce que les deux effets pré- et post ingestion peuvent tous deux mener à une diminution de la prise alimentaire et de la croissance.

Certains produits sont antiappétents car ils ont un effet sublétal aux concentrations présentes dans la plante. Des auteurs définissent l'antiappétance qui résulte de l'effet toxique d'antiappétance secondaire (Mordue et Blackwell, 1993). Ces deux effets sont parfois mélangés. Par exemple, l'azadirachtine est toxique à faibles doses et antiappétente à fortes doses (Schmutterer, 1995). L'azadirachtine présente une toxicité qui s'exerce lors de la mue. Elle active aussi les neurones gustatifs d'un grand nombre d'insectes. Cette molécule est reconnue comme un antiappétent et fait l'objet de plusieurs préparations commerciales, généralement sous forme d'extraits huileux de la plante qui en produit, *Azadirachta indica* (A. Juss.). Généralement cependant, il n'y a pas de relation directe entre l'effet antiappétent et la toxicité des molécules (Bernays et Chapman, 1994).

2.2.2 Les récepteurs gustatifs

Avant d'aborder le mécanisme de la sensibilité aux antiappétents, une description des organes sensoriels impliqués dans la gustation chez les insectes est nécessaire. On trouve de nombreux récepteurs gustatifs sur les pièces buccales, les pattes, les antennes et d'autres parties du corps de l'insecte. Les chimiorécepteurs de contact sont des différenciations cuticulaires en forme de poil, appelées sensilles, avec un pore apical. Sous cette cuticule se trouvent quatre (parfois trois) neurones gustatifs associés à un neurone mécanorécepteur et trois cellules épithéliales modifiées, dites cellules accessoires. Ces cellules sont responsables de la mise en place des structures

cuticulaires. Elles participent ensuite au fonctionnement de la sensille gustative en maintenant la composition ionique et protéique du milieu dans lequel baignent les dendrites des neurones.

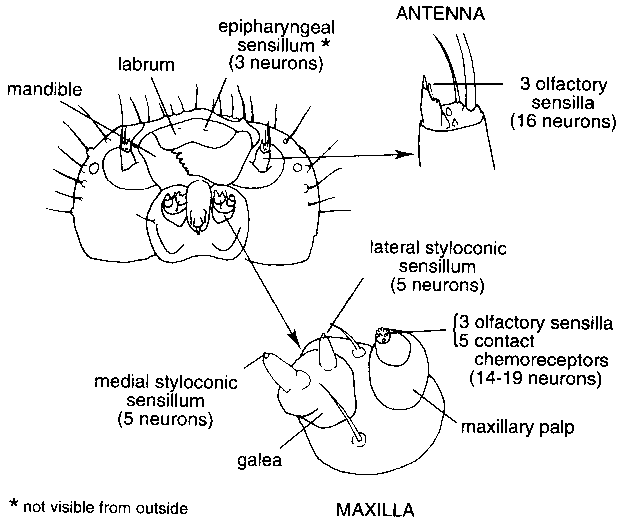


Figure 2-3 Organes sensoriels gustatifs et olfactifs présents sur la capsule céphalique de larves de lépidoptères (reproduit de Bernays et Chapman, 1994)

Sur la capsule céphalique des larves de Lépidoptères (Figure 2-3), les chimiorécepteurs impliqués dans la gustation sont situés sur deux organes principaux : les maxilles et l'épipharynx (Bernays et Chapman, 1994) :

- Les deux maxilles situés de part et d'autre de l'orifice buccal, sont composés d'un palpe et d'une galea ;
- La galea porte une paire de sensilles styloconiques, une sensille médiale et une autre latérale (Figure 2-4). Ces sensilles sont principalement gustatives (Bernays et Chapman, 1994). Chaque sensille styloconique est innervée par quatre neurones gustatifs et un neurone mécanorécepteur. Ces neurones sont bipolaires. Leur corps cellulaire se trouve dans l'épiderme situé sous la cuticule. Leur dendrite baigne dans le liquide sensillaire. L'extrémité des dendrites est proche d'un pore ménagé dans la cuticule au travers duquel passent les molécules provenant du monde extérieur (diamètre de 170 nm pour la sensille latérale et 100 nm pour la sensille médiale chez *Mamestra configurata* (Shields, 1994). De l'autre côté, l'axone qui s'allonge sans synapses vers le système nerveux central. L'influx nerveux est transmis jusqu'au système nerveux central (SNC), et il induit une activité

d'alimentation ou de rejet selon la nature de la cellule activée. Le processus avec lequel le SNC évalue la perception sensorielle est mal connu (Schoonhoven, 1987).

- Sur le palpe maxillaire, on trouve 8 à 10 sensilles de très petite taille disposées en couronne. L'enregistrement de l'activité des neurones qu'elles abritent est difficile techniquement. Cet organe n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études (Glendinning *et al.*, 1998). Bien que les cellules gustatives de ce palpe représentent 65 % des cellules nerveuses gustatives, leur fonction reste inconnue.
- Sur l'épipharynx est située une paire d'organes gustatifs qui interviendraient essentiellement dans les phénomènes de déglutition. Ils seraient moins sensibles aux antiappétents que les sensilles maxillaires (de Boer *et al.*, 1977).

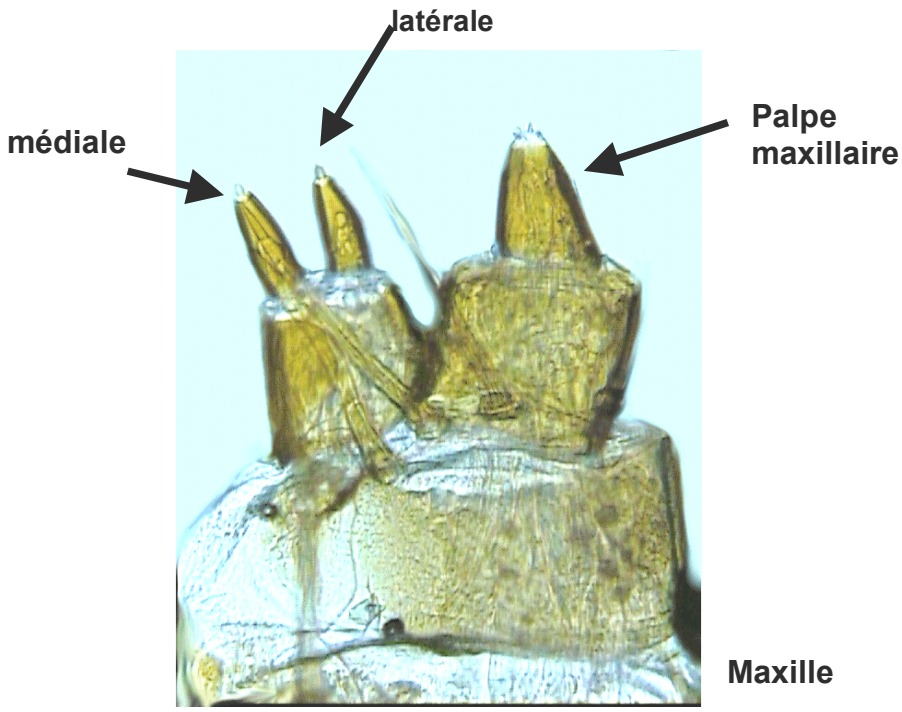


Figure 2-4 Sensilles styloconiques de *Mamestra brassicae* (cliché C. Descoins)

L'équipement gustatif des chenilles de lépidoptères représente donc 22 à 26 sensilles gustatives soit un total de 65 à 76 neurones. On considère généralement que les sensilles styloconiques maxillaires jouent un rôle primordial dans la détection des stimuli et la recherche de la plante-hôte. L'interprétation de l'information nerveuse

résultante induira le comportement alimentaire adapté. Comment se fait alors le codage sensoriel ?

2.2.3 Codage sensoriel

D'une manière générale, on admet que dans une sensille gustative, trois neurones gustatifs sont sensibles aux sucres, acides aminés et sels, alors que le quatrième serait plutôt sensible aux composés secondaires des plantes (Schoonhoven, 1987). L'activation des trois premières cellules serait corrélée à un effet positif sur l'alimentation. Chez de nombreux insectes spécialisés, il existe aussi une cellule qui peut détecter des composés clés, caractéristiques de leur plante-hôte (Blaney *et al.*, 1986; Blaney *et al.*, 1987). L'activation de la quatrième cellule est généralement corrélée à une inhibition de l'alimentation, et sa sensibilité concerne plutôt des composés secondaires des plantes. Les cellules de ce type sont qualifiées de cellules phago-dissuasives, répulsives ou « deterrent cells » (Peterson *et al.*, 1993; Glendinning, 1996). Cependant, la détection de substances antiappétentes n'implique pas forcément une détection uniquement par des neurones de ce type.

Schoonhoven (1982) a proposé quatre mécanismes de détection de composés antiappétents :

1. La première hypothèse est celle de l'existence de cellules spécialisées dans la détection de composés antiappétents (Peterson *et al.*, 1993; Glendinning, 1996). Cette hypothèse très répandue dans la littérature semble correspondre au mode de détection des ecdystéroïdes par les récepteurs gustatifs de la pyrale. Nous tenterons de vérifier cette hypothèse par des tests d'adaptation et d'adaptation croisée sur la cellule spécialisée dans la réponse aux antiappétents.
2. Le second mécanisme passe par l'inhibition de cellules sensibles aux substances phagostimulantes, par exemple les cellules qui répondent aux sucres. Dans quelques cas, des composés antiappétents agissent uniquement en supprimant l'activité des cellules répondant aux sucres et à d'autres stimulants. Il y a donc une altération du codage sensoriel normal au sucre (Schoonhoven, 1982). Par exemple, l'acide tannique inhibe l'alimentation de *Pothetria dispar* et *Malacosoma americana* (Lepidoptera). Il ne semble pas qu'il existe de cellules capables de

détecter l'acide tannique. Par contre ce composé inhibe les réponses des récepteurs aux sucres (Bernays et Chapman, 1994). Nous essaierons de vérifier cette hypothèse dans le chapitre III en testant des mélanges de sucres et de 20E ainsi que des mélanges d'azadirachtine et de sucre.

3. Le troisième mécanisme possible est celui d'une altération des cellules nerveuses gustatives. Certaines substances agissent directement sur les neurones gustatifs et provoquent l'apparition de trains de potentiels d'action irréguliers. La détection de substances alimentaires devient impossible. Nous n'avons pas observé un tel phénomène avec les phytoecdystéroïdes utilisés dans cette étude.
4. Enfin, les insectes pourraient être capables de reconnaître la présence de substances toxiques ou antiappétentes par apprentissage. L'information nerveuse ne passerait pas dans ce cas par une voie spécialisée (hypothèse 1), ni par une modification du message nerveux (hypothèses 2 et 3), mais par une mémorisation au niveau du système nerveux central du message sensoriel. Nous n'avons pas abordé l'étude de ce mécanisme dans notre travail.

La variété de produits chimiques considérés comme antiappétents et la diversité de leur structure chimique allant de simples ions, molécules inorganiques, à des protéines complexes ou des hydrocarbures implique que la détection implique différents mécanismes et des récepteurs membranaires spécifiques. Les voies de transduction au niveau des récepteurs gustatifs d'insectes restent à ce jour hypothétiques. Les cellules anti-appétantes porteraient des récepteurs membranaires de plusieurs types qui seraient associés à différentes cascades de transduction, impliquant une signalisation soit par l'AMPc soit par l'IP_3. Ces cascades pourraient coexister dans les mêmes cellules (Glendinning *et al.*, 2001).

2.2.4 Perception des antiappétents et alimentation

De nombreuses études comportementales se sont attachées à corréler l'activité des cellules réceptrices d'antiappétents avec l'alimentation des chenilles (Ma, 1969) (Ma, 1972) (Schoonhoven, 1987; Peterson *et al.*, 1993). Généralement, il existe une corrélation positive entre la détection gustative et le comportement alimentaire (Figure 2-5).

Dans cette figure, les cellules sensibles aux sucres sont appelées cellules R sucres et les cellules sensibles aux antiappétents, cellules R antiappétents. Un exemple de corrélation négative est celui de la toosendanine (un tétranortriterpénoïde isolé de *Melia toosendan*) qui, en activant les récepteurs des larves de *Pieris brassicae*, inhibe leur alimentation (Schoonhoven et Lin-er, 1994). De même, *Bombyx mori* possède des récepteurs aux substances amères, localisés dans une des deux sensilles styloconiques. Ces neurones répondent à plusieurs alcaloïdes qui agissent comme antiappétents à faible concentration (Schoonhoven, 1982). Les larves de *Pieris brassicae* ainsi que d'autres espèces de Lépidoptères possèdent un ou plusieurs neurones gustatifs qui réagissent à de faibles concentrations d'une large gamme d'alcaloïdes et exercent effectivement une activité d'antiappétance (Ma, 1972). Par contre, lors de l'ablation des sensilles gustatives, les larves deviennent insensibles aux antiappétents et capables de se nourrir sur des milieux contenant des substances antiappétentes (Bowdan et Gordon, 1997).

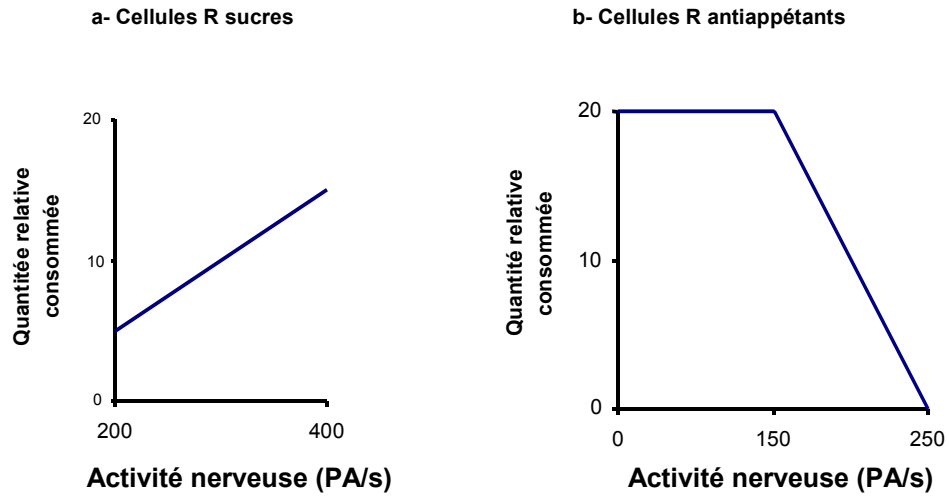


Figure 2-5 Relation entre l'activité des cellules gustatives et l'alimentation (Bernays et Chapman, 1994)

Nous avons donc vu que les antiappétents agissent sur le comportement alimentaire, en diminuant la prise de nourriture. Ce comportement alimentaire est composé de la prise de nourriture proprement dite mais aussi d'une partie ambulatoire qui peut amener l'insecte à s'éloigner activement du substrat alimentaire. Les antiappétents sont détectés par les insectes soit par leurs effets toxiques, soit par les neurones gustatifs. Cette détection gustative peut impliquer soit des processus généraux (altération de la perception de substances phagostimulantes), soit des

processus plus spécialisés (détection spécifique de ces molécules). La détection spécifique de ces molécules est réalisée par une classe de neurones gustatifs qui se présente chez de nombreux insectes mais aussi chez les vertébrés, où ils sont responsables de la détection de substances amères. L'étude de la physiologie de ces cellules chez les insectes représente un grand intérêt agronomique dans la mesure où ils pourraient constituer une cible privilégiée pour des composés à activité antiappétente ou toxique, compte tenu de leur rôle dans la sélection des plantes-hôtes et dans la régulation de l'alimentation.

Les données préliminaires obtenues chez *O. nubilalis*, suggèrent que les phytoecdystéroïdes sont détectés par une cellule appartenant à cette classe. Dans ce travail, nous essaierons de démontrer qu'ils ont un effet comportemental antiappétent. Nous nous attacherons ensuite à étudier la sélectivité et la sensibilité des cellules gustatives impliquées dans leur détection.

3 MECANISMES DE DETECTION DES PHYTOECDYSTEROÏDES

3.1 Effets des phytoecdystéroïdes sur le comportement

3.1.1 Introduction

Le but de ce chapitre est de vérifier l'hypothèse que la 20E et l'ecdysone exercent un effet antiappétent sur les larves de la Pyrale du maïs. Nous avons évalué le comportement alimentaire en pratiquant des tests de choix sur des larves de stade L5. Pour cela, nous avons choisi, l'hormone de mue la 20E et son précurseur l'ecdysone (Lafont, 1997). Ces substances ont déjà fait l'objet d'études dans différents tests d'électrophysiologie et de comportement alimentaire chez *Pieris brassicae, Mamestra brassicae* (Ma, 1969; Tanaka et Naya, 1995) et *Bombyx mori* (Tanaka *et al.*, 1994). Nous avons aussi testé deux molécules insecticides : RH-5849 et RH-5592, qui sont deux agonistes mimant l'activité biologique des ecdystéroïdes au niveau des récepteurs nucléaires. Il nous a paru intéressant de comparer leurs activités avec celle de la 20E et de l'ecdysone parce que jusqu'à aujourd'hui, aucune étude comportementale ni électrophysiologique n'a été faite sur cette classe de molécules.

Nous avons eu recours à l'inositol et à l'azadirachtine (Figure 3-1) comme témoins dans nos tests de comportements alimentaires et dans les tests d'électrophysiologie. Pourquoi ces deux témoins ? L'inositol est un sucre répandu dans les plantes, capable de stimuler l'alimentation chez les insectes, et d'évoquer une sensation sucrée chez les hommes et les vertébrés (Glendinning *et al.*, 2000). Les larves de plusieurs espèces de Lépidoptères possèdent des cellules gustatives qui répondent vigoureusement à l'inositol (Asaoka, 1996; Schoonhoven et van Loon, 2002). Peu d'informations existent sur les mécanismes nerveux du comportement alimentaire induit par une stimulation à l'inositol. Nous avons étudié s'il exerce un effet stimulant sur le comportement alimentaire. L'azadirachtine a été choisie comme

témoin parce qu'elle est un antiappétent efficace sur de nombreuses espèces d'insectes appartenant à différents ordres (Mordue et Blackwell, 1993). Elle est le composé idéal pour l'étude des antiappétents sur les chimiorécepteurs (Schoonhoven et Lin-er, 1994).

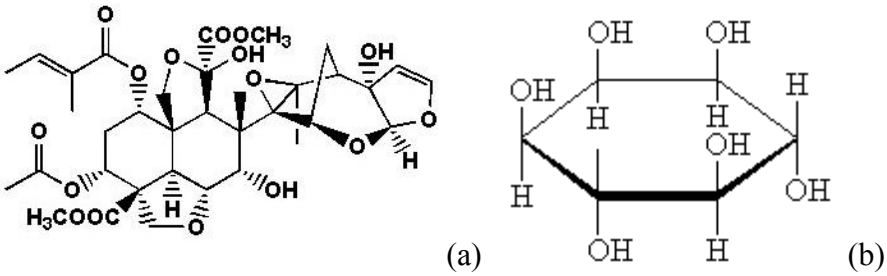


Figure 3-1 Structures chimiques de l'azadirachtine (a) et du myo-inositol (b)

3.1.2 Matériels et Méthodes

3.1.2.1 Insectes et plantes

Nous avons conduit un élevage de Pyrale du maïs (annexe I) dont la première génération nous a été fournie par le laboratoire de l'INRA du Magneraud à des stades larvaires intermédiaires (L3 et L4). Les pontes étaient déposées dans des boîtes qui conviennent au mode de vie de ces chenilles foreuses de feuilles et de tiges. Les larves se nourrissaient d'un milieu artificiel (annexe II). Ces insectes étaient maintenus dans des chambres à 23 °C, une humidité relative de 75 à 85 % et une photopériode de 16 heures de jour/8h de nuit. Pour les tests de comportement, nous avons utilisé des L5 ayant mué moins de 24 h auparavant. Les larves étaient soumises à un jeûne d'une heure avant l'expérience.

Nous avons ensuite semé des graines de maïs dans des chambres climatisées à 23 °C à 75 à 85 % d'humidité relative. Ces plantes étaient prélevées pour les tests d'alimentation lorsqu'elles atteignaient le stade 4 à 5 feuilles.

3.1.2.2 Composés chimiques

L'ecdysone et la 20E (95 % pureté) nous ont été gracieusement fournis par le Dr Juraj Harmatha (République Tchèque). L'inositol et l'azadirachtine proviennent de chez Sigma-Aldrich (98 % de pureté). Le RH-5849 et le RH-5992 proviennent de

chez Röhm et Haas Co. (Springhouse, PA, U.S.A). Ces composés étaient dissous dans une solution d'éthanol à 5 % (Rhône Poulenc : 95 % HPLC) dans de l'eau ultra-pure.

3.1.2.3 Tests de comportement

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons mis au point un protocole permettant d'évaluer l'activité alimentaire des chenilles sur des sections de tiges de jeunes maïs. Ce protocole convient bien à ces chenilles foreuses de tiges. Dans la nature, les larves néonates d'*O. nubilalis* ne restent pas sur les feuilles mais pénètrent à l'intérieur du cornet. Elles y creusent des galeries et continuent leur développement pour atteindre le cinquième stade larvaire et former leur chrysalide dans l'obscurité (Gahukar et Chiang, 1976). Nous avons observé au cours d'expériences préliminaires qu'elles s'alimentent mal sur des disques de feuilles utilisés classiquement. Ainsi, nous avons étudié le comportement alimentaire non pas en mesurant la quantité d'aliments consommés, mais en observant la présence de morsure. Le test de choix alimentaire était un test qualitatif qui correspond aussi bien à une inhibition de l'alimentation qu'à une inhibition du comportement de forage.

Nous avons choisi de présenter deux substrats alimentaires à une chenille placée dans une boîte de Pétri et de noter quel côté présente des morsures de consommation (Figure 3-2). Chaque larve peut réagir de quatre manières différentes à ce test :

1. morsure(s) visible(s) uniquement sur le milieu témoin : C (Contrôle)
2. morsure(s) visible(s) uniquement sur le milieu traité : T (Traité)
3. morsures visibles sur les deux milieux : C + T
4. aucune morsure visible : A (Aucun)

Des tests préliminaires ont été réalisés avec Patricia Nel, Latifa Ali Belhadge et Julie Poupineau (1997-1998). Ces tests ont notamment permis de déterminer la gamme des quantités déposées nécessaires à la mise en évidence d'un effet antiappétent de la 20E et de l'ecdysone. La gamme de doses choisie suivait une progression géométrique : 0,005, 0,028, 0,16, 0,9 et 5 µg par section de tige.

Figure 3-2 Schéma de principe du test de choix alimentaire.

La mesure consiste à noter la présence de morsures sur le substrat végétal, 18 h après avoir mis la chenille en présence de deux sections de tige de maïs.

Deux sections de tiges de maïs provenant de plantes au stade 4 à 5 feuilles fraîchement récoltées, étaient proposées à la chenille. Chaque section mesurait environ 1 cm de longueur, 0,7 cm de diamètre et 200 ± 16 mg en poids frais (moyenne ± écart type, $n = 20$). Les sections des deux tiges étaient traitées soit avec 5 µl d'éthanol (témoin), soit avec 5 µl d'une dilution du produit à tester (traité). Après évaporation du solvant (15 min environ), les deux morceaux de tige étaient disposés sur un papier filtre humidifié, au fond d'une boîte de Pétri. Une larve était placée au centre de la boîte, entre les deux morceaux et le couvercle refermé. Ces boîtes étaient maintenues à l'obscurité dans une chambre à 23 °C. La présence de morsures était notée 18 h après l'introduction des larves.

Nous avons effectué les tests suivants entre une section témoin et une section traitée avec l'un des produits suivants : ecdysone, 20E ($n = 3 \times 15$ larves par dose), azadirachtine, RH-5992 ($n = 1 \times 15$ larves par dose), inositol (5 µg / µl ; $n = 3 \times 12$ larves). Nous avons en outre réalisé une expérience dans laquelle une des sections a été traitée à l'inositol et l'autre à la 20E (5 µg / µl ; $n = 2 \times 12$ larves).

3.1.3 Résultats

Les résultats de ce test sont présentés dans la Figure 3-3. Les larves ne perçoivent pas la différence entre des tiges traitées avec l'éthanol et des tiges non traitées. Le nombre de larves qui ne se sont pas alimentées reste généralement faible, en moyenne (2 à 3 individus sur 15) sauf dans le cas du traitement avec le RH-5992 (5 larves sur 15 pour les doses de 0,9 et 5 µg : Fig. 2-3 b).

En présence de 20E, le comportement des chenilles varie avec la dose. A la dose la plus faible (0,005 µg), les chenilles se sont réparties de manière équivalente sur les deux substrats. A la dose la plus forte (5 µg), elles étaient toutes sur les tiges non traitées. Entre ces deux extrêmes, la répartition des chenilles varie régulièrement avec la dose de 20E appliquée. L'ecdysone affecte la répartition des larves de manière dose-dépendante (Fig. 2-3 c), avec une dissymétrie dans la répartition en faveur des tiges non traitées à partir de la dose de 0,16 µg. L'azadirachtine affecte également la

répartition des morsures en fonction de sa dose. Par contre, il ne semble pas que le RH-5992 ait un effet direct sur le comportement alimentaire.

L'inositol, ne montre aucun effet stimulant marqué. Les larves semblent s'alimenter normalement, par contre en présence de la 20E, les larves préfèrent forer du côté traité par l'inositol et non du côté traité par la 20E.

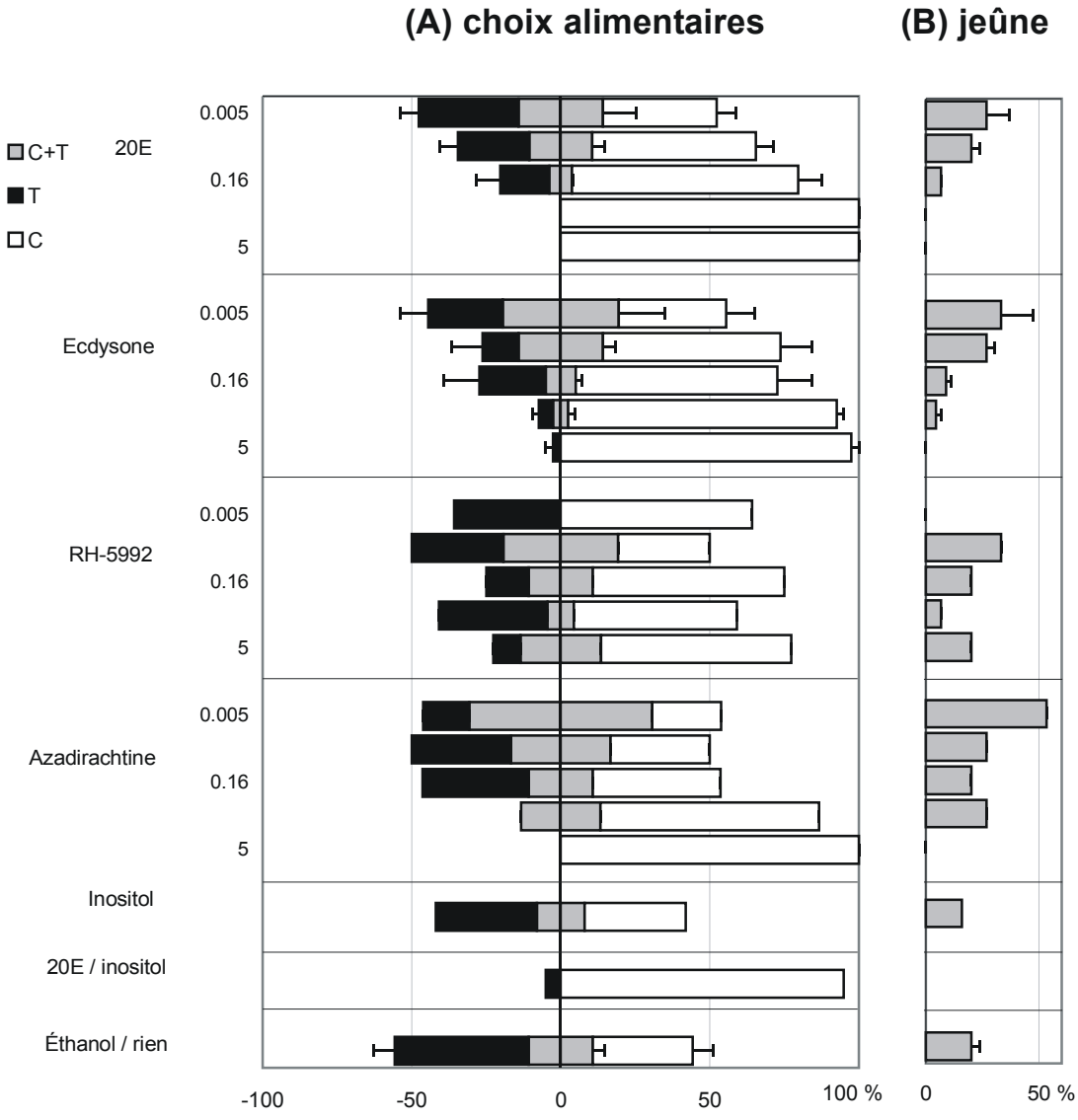


Figure 3-3 Résultats des tests de choix alimentaires effectués sur les larves de stade L5

Dans cette expérience, nous avons proposé un choix entre deux sections de tiges de maïs, l'une traitée avec 5 µl d'éthanol (C), l'autre traitée avec 5 µl d'un produit (T) en solution à différentes concentrations (0,005, 0,028, 0,16, 0,9 et 5 µg). Nous avons testé la 20E, l'ecdysone, le RH-5992 et l'azadirachtine, ainsi que les combinaisons inositol/éthanol, 20E/inositol et éthanol/rien.

(A) pourcentage moyen de chenilles ayant consommé le traité (T : barres noires), le témoin et le traité (T+C : barres grises) ou le non-traité ou contrôle (C : barres blanches).

(B) pourcentage de larves n'ayant apparemment rien consommé pendant la période d'observation (barres grises).

3.1.4 Discussion

Nous avons choisi un test alimentaire adapté aux habitudes comportementales de la Pyrale du maïs. Dans les conditions de ce test, c'est la présence de morsures d'alimentation sur deux substrats qui est évaluée. Cette notation diffère de tests alimentaires où l'on mesure la quantité ingérée, soit directement en pesant les substrats, les chenilles et les fécès, soit indirectement, par exemple en mesurant la surface consommée sur des disques de feuilles. L'approche que nous avons suivie est adaptée à la biologie de l'insecte et permet des notations visuelles. Ce test évalue l'incidence de la 20E sur deux comportements associés : le comportement alimentaire et le comportement de forage. Pour démontrer spécifiquement l'effet d'antiappétance sur le comportement alimentaire, des essais pour des périodes courtes et bien limitées sont nécessaires (Isman, 1995; Lowery et Isman, 1996). Les composés qui activent les cellules nerveuses gustatives affectent différents paramètres comportementaux tels que le taux et la taille de la morsure, la durée de l'alimentation, lors du début du contact insecte-plante (Glendinning, 1996; Glendinning *et al.*, 1999). Comme nous voulions tester l'existence d'un effet antiappétent, il nous a paru suffisant de mener les tests 18 heures après la mise en place des chenilles. Si nous avions voulu tester un effet toxique, il aurait fallu les laisser plus longtemps. Nous avons considéré que ces composés étaient actifs sur le comportement car leur effet variait avec la dose.

Dans nos conditions expérimentales, l'effet antiappétent de la 20E et de l'ecdysone sont détectés à partir de 0,028 µg et l'azadirachtine entre 0,16 et 0,9 µg. Le résultat obtenu avec l'azadirachtine confirme que ce composé est antiappétent pour la pyrale du maïs (Arnason *et al.*, 1985). Nos résultats diffèrent des observations faites sur *Bombyx mori* (Tanaka et Takeda, 1993), où la 20E est antiappétente mais pas l'ecdysone.

L'absence d'effet de l'inositol proposé en choix avec une tige traitée avec de la 20E ou simplement avec un solvant s'explique mal. Nous verrons dans un chapitre ultérieur que ce sucre stimule fortement l'une des cellules gustatives de la pyrale. C'est un sucre généralement présent dans les plantes et d'autres lépidoptères y sont

sensibles comme *Antheraea yamamai* (Asaoka, 1996) et *Manduca sexta* (Bernays *et al.*, 1998; Glendinning *et al.*, 2000). Cette absence d'effet comportemental pourrait s'expliquer par le fait que les tiges de maïs en contiennent déjà. Il faudrait évaluer l'effet de cette molécule sur le choix alimentaire de chenilles confrontées à un substrat qui en soit dépourvu.

Avec le RH-5992, nos résultats n'ont pas montré de relation nette entre la concentration et la répartition des larves. Ce composé agirait donc sur une fenêtre temporelle plus longue que notre période d'observation (18 h) et ne semble pas perçu par les récepteurs gustatifs. Rappelons que le RH-5992 tébufénozide est actuellement commercialisé mondialement (Mimic ®, Confirm® et Romdan®). Il est plus toxique que son analogue le RH-5849 pour les larves de Lépidoptères (Dhadialla *et al.*, 1998).

Nos expériences montrent que la 20E et l'ecdysone ont bien un rôle antiappétent. Cela suggère que ces deux phytoecdystéroïdes représentent pour les plantes qui en produisent, un moyen de défense en tant qu'antiappétents. Par contre, le RH 5992 qui agit sur la mue des insectes – mais par un mécanisme physiologique différent de celui de la 20E - n'est pas antiappétent et ne serait donc pas détecté par les organes gustatifs. Il serait donc intéressant d'étudier le fonctionnement des récepteurs gustatifs et de voir comment ils répondent à ces deux classes de composés à action hormonale.

3.2 Détection des phytoecdystéroïdes chez Ostrinia nubilalis

3.2.1 Introduction

Nous avons mis en évidence dans la partie précédente l'effet antiappétent de la 20E et de l'ecdysone sur l'alimentation des chenilles de la Pyrale du maïs. Dans cette partie nous allons étudier l'effet d'une vingtaine de molécules, agonistes ou antagonistes des ecdystéroïdes, sur la réponse électrophysiologique de sensilles gustatives styloconiques des larves de cinquième stade larvaire d'*Ostrinia nubilalis*. Pourquoi ?

Chez les larves de Lépidoptères, le comportement alimentaire dépend fortement de la chimioréception gustative. Certains travaux ont tenté d'expliquer la sélection alimentaire induite par les phytoecdystéroïdes par la spécificité des réponses des neurones gustatifs de larves de plusieurs espèces de Lépidoptères (Ma, 1969; Tanaka *et al.*, 1994; Descoins et Marion-Poll, 1999; Mondy *et al.*, 1999; Marion-Poll et Descoins, 2002). Ces travaux indiquent que la sensibilité aux phytoecdystéroïdes dépend de l'espèce et de la structure chimique. La stimulation par la 20E engendre l'apparition de potentiels d'action dont le nombre est fonction de la concentration et que l'on peut attribuer à l'activité d'une cellule spécialisée répondant aux antiappétents. Ces travaux soulignent l'importance de la structure chimique du stimulus puisque la perte d'un hydroxyle en 20 (exemple l'ecdysone par rapport à la 20E) modifie complètement la détection chez *Bombyx mori* (Tanaka *et al.*, 1994; Marion-Poll et Descoins, 2002).

Dans une partie de son travail de thèse au laboratoire, Charles Descoins avait étudié quatre espèces de Lépidoptères, *Bombyx mori, Mamestra brassicae, Spodoptera littoralis* et *Ostrinia nubilalis*. Il a montré que la 20E génère une forte réponse dans l'une des deux sensilles styloconiques chez *Bombyx mori* et *Mamestra brassicae*, une réponse plus faible chez *Spodoptera littoralis*, et des deux sensilles dans le cas d'*Ostrinia nubilalis*. La réponse sensorielle gustative dépend étroitement de la nature chimique du stimulus chez *Bombyx mori, Mamestra brassicae,* et *Spodoptera littoralis* mais apparemment pas chez *Ostrinia nubilalis*, qui répond aussi

bien à la 20E, à l'ecdysone ou à la ponastérone A et ce, dans deux sensilles styloconiques gustatives (Marion-Poll et Descoins, 2002).

A la lumière de ces observations, nous avons voulu évaluer si la perception gustative chez *Ostrinia nubilalis* concernait tous les ecdystéroïdes ou seulement certains analogues. Il nous a paru intéressant d'étudier le profil de la sensibilité des récepteurs périphériques et d'essayer de le comparer au profil de l'affinité des récepteurs nucléaires vis à vis des molécules phytoecdystéroïdes. Il avait été en effet montré chez la drosophile *Drosophila melanogaster* que l'affinité des récepteurs nucléaires avec les molécules ecdystéroïdes dépend de la structure chimique de ces derniers (Beckers *et al.*, 1980; Dinan, 1985). Nous avons donc collaboré avec Laurence Dinan pour étudier la réponse de récepteurs gustatifs de la pyrale à un éventail de substances choisies pour leurs effets hormonaux agonistes ou antagonistes de la 20E.

3.2.2 Matériels et Méthodes

3.2.2.1 Matériel biologique et substances chimiques

Les insectes étaient élevés dans des conditions identiques à celles décrites précédemment (paragraphe 3.1.2.1) Des larves de cinquième stade étaient prélevées dans l'élevage juste après la mue et privées de nourriture pendant une à deux heures avant l'expérience. Les structures chimiques des molécules à tester sont présentées dans les figures à côté des réponses électrophysiologiques. Leur provenance est indiquée dans le Tableau 3-1. Les solutions mères ainsi obtenues étaient stockées dans un congélateur à –30 °C. Les dilutions finales (dans du KCl 10^{-3} M) étaient conservées à 4 °C.

Tableau 3-1 Origines des substances chimiques testées en électrophysiologie

Nom	***Origine***
Ecdystéroïdes	
20-hydroxyecdysone	Sigma 99 % pureté
Ecdysone	Simes PSA, Milan, Italie
9,20-dihydroxyecdysone	A. Suksamrarn, Bangkok, Thaïlande
Cyastérone	R. Lafont, Paris

Pinnatastérone Canescenstérone	A. Suksamrarn, Bangkok, Thaïlande
Makistérone A	Simes spa, Milan, Italy
Ptérostérone	R. Lafont, Paris
Ponastérone A	D. Horn, Melbourne, Australie
Inokostérone	Rhoto Pharmaceuticals, Japon
Polypodine B	J. Harmatha, Prague, Czech. Republic
(5-α) 20-hydroxyecdysone Ecdysone 22-myristate	Synthèses L. Dinan
Bisacylhydrazines	
RH5849 RH5992	Produits de synthèse de Röhm & Haas
Cucurbitacin	
Cucurbitacin B	Isolé de *Iberis umbellata* (Crucifereae)
Withanolides	
2,3-dihydro-3β-methoxywithacnistine 2,3-dihydro-3β-hydroxywithacnistine 2,3-dihydro-3β-methoxyiochromolide	Isolés de *Iochroma gesnerioides* (Solanaceae)

3.2.2.2 Préparation biologique

Chaque larve était immobilisée sur un support de plastique à l'aide de Parafilm®, tout en laissant la tête bien exposée. Un fil d'argent (diamètre 0, 2 mm) relié à la masse, était introduit dans la partie supérieure du corps en direction de la tête. Trois à cinq de ces larves étaient alors fixées en rangée sur un bras orientable à l'aide de pâte à modeler. Elles étaient ensuite disposées et orientées sous une loupe binoculaire (Wild Leitz M10) de façon à exposer les sensilles gustatives approximativement sur la même ligne. Cette configuration permettait de stimuler plusieurs sensilles avec la même électrode de stimulation. Dans ces conditions, il était possible d'enregistrer des réponses électrophysiologiques pendant plus d'une heure sur chacune de ces larves.

3.2.2.3 Méthode d'enregistrement

Pour stimuler une sensille, l'électrode de stimulation (et d'enregistrement) était positionnée à l'extrémité de celle-ci à l'aide d'un micromanipulateur Leitz, puis avancée doucement de façon à établir un contact électrique. La qualité du signal était contrôlée en observant le signal enregistré sur l'écran de l'ordinateur et en écoutant le son produit dans un haut-parleur.

3.2.2.4 Tests électrophysiologiques

Obtenir des signaux électriques de bonne qualité est une condition essentielle à l'analyse de l'activité électrophysiologique des sensilles gustatives. Nous avons utilisé la technique de Hodgson, qui consiste à coiffer une sensille à l'aide d'un tube capillaire contenant la solution à tester (Hodgson *et al.*, 1955).

Les capillaires de verre étaient étirés à chaud à l'aide d'une étireuse horizontale (Modèle P77, Sutter Instruments Comp., USA) et remplis, juste avant l'expérience, avec quelques microlitres de solution à tester, de façon à ce que le fil d'argent de l'électrode d'enregistrement contacte le liquide. Le signal électrique était amplifié avec un amplificateur TastePROBE (Marion-Poll et Van der Pers, 1996). Cet amplificateur permet de détecter le début du contact, et de compenser l'offset de la préparation en stockant le potentiel dans une capacité (Figure 3-4). Les signaux électriques étaient ensuite amplifiés (gain : 1000-2000) et filtrés (Bessel : DC - 4000 Hz) à l'aide d'un amplificateur programmable (CyberAmp 320, Axon Instruments, USA). Ce signal était enregistré à l'aide d'une carte de conversion analogique/numérique (Data Translation DT2821 ; 12 bits, échantillonnage à 10 kHz) et stocké sur le disque dur d'un micro-ordinateur. L'ensemble de ces opérations était effectué grâce à un programme qui gère l'acquisition, l'affichage et le stockage des données (Marion-Poll et Tobin, 1991).

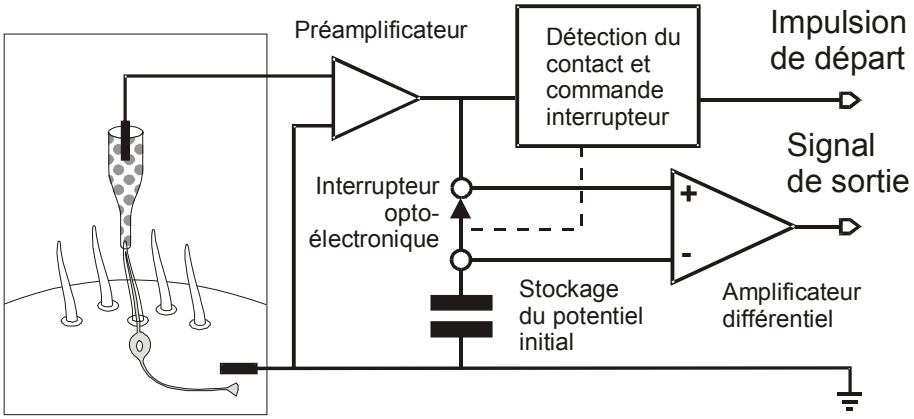


Figure 3-4. Principe de l'amplificateur TastePROBE

Ce circuit électrique permet d'enregistrer l'activité électrique des neurones gustatifs dans de bonnes conditions, notamment en compensant la différence de potentiel qui existe entre la sensille et l'hémolymphe (environ 80-100 mV) dans les premières millisecondes après le contact initial.

3.2.2.5 Protocole de stimulation

Nous avons réalisé ces tests en deux étapes. Dans la première, nous avons mis au point les conditions d'enregistrement et réalisé un premier criblage de l'activité des molécules pour déterminer l'échelle de concentrations à tester durant le protocole. Ensuite, nous avons évalué les réponses des récepteurs gustatifs à différentes doses d'analogues d'ecdystéroïdes, en adoptant la séquence de stimulation suivante : KCl 10^{-3} M, inositol 10^{-3} M et 20E 10^{-6} M (qui jouaient le rôle de stimuli standards) suivis du produit à tester présenté à des concentrations croissantes (10^{-6}M à 10^{-3}M).

Le KCl, l'inositol et la 20E ont été choisis comme stimuli de référence. Le KCl 10^{-3} M était utilisé comme électrolyte pour tous les produits utilisés. L'inositol est un sucre, bien perçu à 10^{-3} M par les sensilles styloconiques médiales de nombreuses larves de lépidoptères comme *Antheraea yamamai* (Asaoka, 1996). Il donne un indice de l'état de réceptivité de l'insecte. Enfin, les potentiels d'action observés en présence de 20E servent de référence, pour identifier la cellule activée par les ecdystéroïdes. Pour chaque composé, les activités de dix sensilles latérales et dix sensilles médiales ont été enregistrées. Chaque stimulation durait 2,5 s. Un temps de repos d'environ 3 minutes était respecté avant de faire une autre stimulation sur la même sensille, afin de limiter les risques d'adaptation sensorielle.

3.2.2.6 Analyse des données

Nous avons analysé la réponse électrique des cellules en détectant et en comptant les potentiels d'action. Les potentiels d'action étaient détectés à partir de la dérivée filtrée du signal (Marion-Poll et Tobin, 1991) ou de la médiane glissante (Fiore *et al.*, 1996). Ces algorithmes de filtrage permettent de compenser les fluctuations de la ligne de base et ainsi de détecter les potentiels d'action en ajustant visuellement une barre de seuil sur chaque enregistrement (Figure 3-5). Chaque pic du signal dépassant ce seuil était considéré comme un potentiel d'action et stocké dans un fichier. Ces potentiels étaient ensuite triés pour éliminer les artefacts et les séparer en différentes classes.

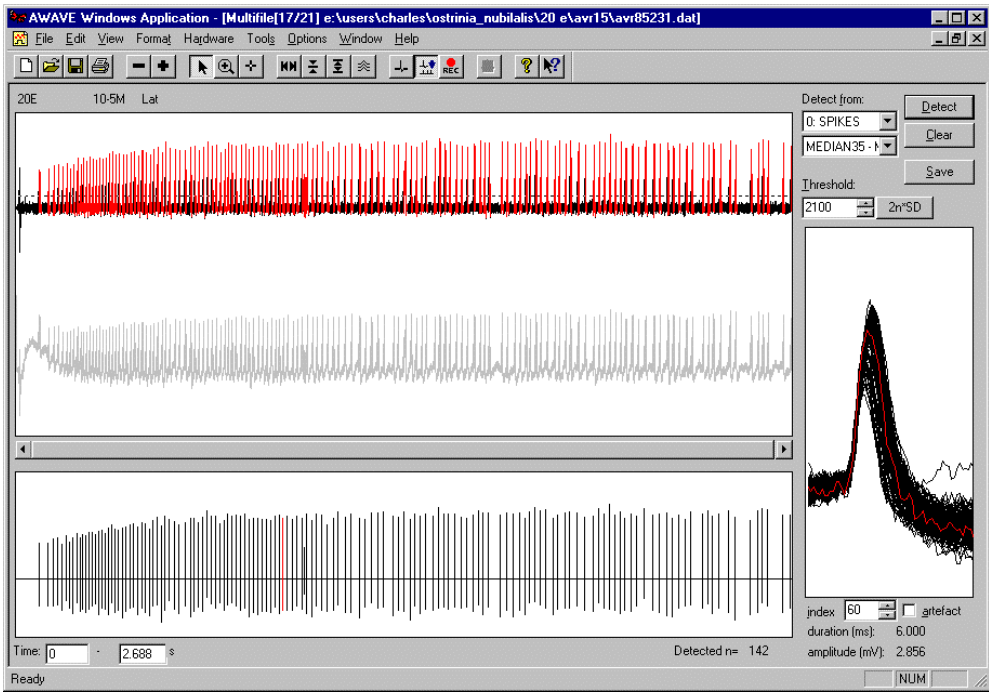


Figure 3-5. Programme AWAVE

Ce programme permet de détecter les potentiels d'action de manière interactive. La capture d'écran ci-dessus montre l'interface utilisateur disponible pour détecter les potentiels d'action (réponse à de la 20E 10^{-5} M sur une sensille latérale ; durée d'enregistrement : 2.5 s). Le signal original (grisé) est filtré (trace noire) et un seuil de détection est ajusté visuellement de manière à détecter les événements qui dépassent ce seuil. Ces évènements sont des potentiels d'action provenant d'une ou plusieurs cellules actives. Leur instant d'occurrence est représenté dans la fenêtre du bas, et ces évènements sont superposés dans la fenêtre de droite (60 points soit 6 ms).

Le nombre de potentiels détectés dans la première seconde d'enregistrement a été utilisé comme indice des réponses. La cinétique des réponses a été estimée en découpant l'enregistrement en intervalles de 40 à 150 ms et en comptant le nombre de

potentiels d'action dans chaque intervalle. Dans des conditions constantes, les potentiels émis par une cellule ont la même amplitude et la même forme (Glendinning et Hills, 1997). Ces observations nous permettaient de déterminer par exemple, si la cellule qui répond aux antiappétents est celle dont les potentiels d'action extracellulaires sont les plus grands chez tous les individus d'une même espèce. Ces opérations étaient faites sur un micro-ordinateur avec le programme AWAVE, développé pour permettre une meilleure exploitation sous Windows (Marion-Poll, 1995; Marion-Poll, 1996). Ces données mesurées étaient ensuite exportées dans un tableur (Excel, Microsoft) afin de calculer les résultats et réaliser des graphiques et analyses statistiques. Une analyse de variance a été conduite sur les données afin d'évaluer l'incidence des facteurs produit, concentration, individu, sensille sur les résultats obtenus. L'efficacité relative des produits a été évaluée avec la procédure de Bonferroni.

3.2.3 Résultats

3.2.3.1 Stimuli de référence

Les réponses au KCl 10^{-3}M, à l'inositol 10^{-3}M et à la 20E 10^{-6}M figurent dans la Figure 3-6. La sensille médiale est très sensible à l'inositol (115 ± 4 PA/s (moyenne ± erreur standard); n = 146) et à la 20E (56 ± 3 PA/s, n = 156) mais pas au KCl (20,8 ± 2 PA/s, n = 147). Les réponses à l'inositol sont caractérisées par une décharge phasique de potentiels d'action au début du contact de l'ordre de 200 PA/s, suivie d'une plus faible de l'ordre de 100 PA/s. La réponse à la 20E est plus tonique. La sensille latérale répond à la 20E et à l'inositol avec un niveau d'activité proche de celui induit par la solution saline (20E : 23 ± 2 PA/s, n = 138 ; inositol : 14 ± 4 PA/s, n = 138 ; KCl : 21 ± 3 PA/s , n = 138).

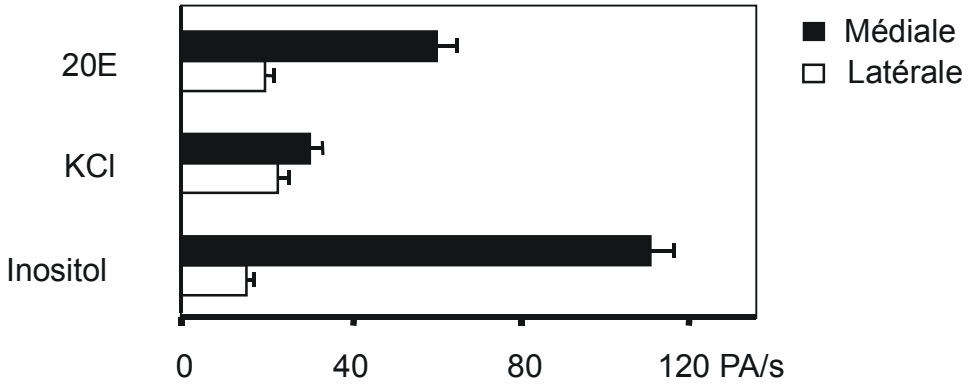


Figure 3-6. Réponses obtenues à l'inositol, à la 20E et au KCl

Chaque série de stimulations avec un produit inconnu était précédée par une stimulation avec trois produits utilisés comme standard : 20E 10^{-6}M, KCl 10^{-3}M et inositol 10^{-3}M. Ce graphique regroupe les réponses (moyenne + erreur standard) obtenues sur les sensilles styloconiques médiales (barres noires) et latérales (barres blanches). Nombre d'enregistrements analysés par produit, *n* = 130-160. Ordonnée : produit, Abscisse : nombre de potentiels d'action (PA) détectés au cours.

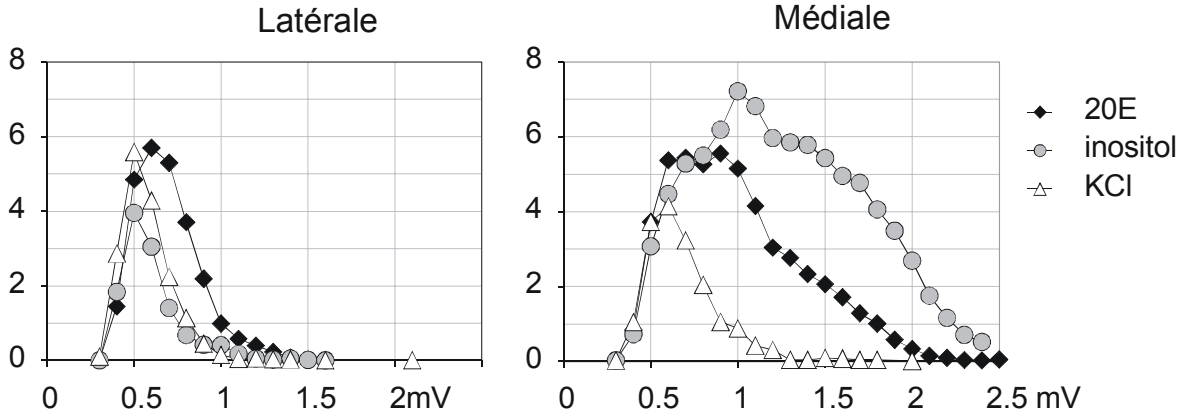


Figure 3-7 Distribution des amplitudes de potentiels d'action en fonction de la sensille et du stimulus

Ce graphique représente la distribution des amplitudes des potentiels d'action (PA) détectés en réponse au KCl 10^{-3} M, inositol 10^{-3} M et 20E 10^{-6} M sur l'intervalle de temps 0,5 à 1,5 s. Abscisses : amplitude des PA. Ordonnées : nombre de PA divisé par le nombre de réponses analysées. Chaque point correspond au nombre moyen de potentiels d'action de même amplitude. Par exemple, le point 0,5 mV correspond au nombre de PA dont l'amplitude est comprise entre 0 ,5 mV et 0,6 mV.

Nous avons calculé la distribution des amplitudes des potentiels d'action détectés dans ces enregistrements (Figure 3-7). L'étude de cette distribution peut révéler la présence d'une ou plusieurs cellules actives, si ces cellules émettent des potentiels d'action dont les amplitudes sont légèrement différentes. En effet, chaque neurone va émettre de potentiels d'action dont les amplitudes vont se distribuer autour d'un mode central. Si la distribution observée est monomodale, il y a de bonnes chances pour qu'un seul neurone soit actif dans ces enregistrements. Si elle est bi-modale par contre, on peut supposer que deux neurones sont actifs.

Dans les sensilles latérales, en réponse au KCl et à l'inositol, les potentiels d'action ont des amplitudes qui se distribuent autour d'un mode majeur à 0,5 mV. La similitude de ces distributions suggère que les cellules qui répondent à ces deux stimuli sont identiques et qu'un seul neurone soit actif. En réponse à la 20E, les potentiels d'action observés ont un mode majeur de 0,7 mV. La régularité de cette distribution suggère qu'il n'y ait qu'une cellule active. L'écart entre ces deux distributions suggère que la cellule qui répond à la 20E ne soit pas les mêmes que celle qui répond au KCl (et à l'inositol).

Dans les sensilles médiales, la distribution des potentiels d'action en réponse au KCl ressemble à celle observée dans les sensilles latérales, avec un mode majeur à 0,7 mV et avec un épaulement vers 1 mV. Les enregistrements analysés présentent probablement deux cellules actives. La distribution des amplitudes des potentiels d'action observés en présence d'inositol présente un maximum à 1 mV et un étalement important vers des amplitudes plus grandes. La distribution des potentiels d'action observés en présence de 20E, présente également deux modes et un épaulement, ce qui suggèrerait que deux cellules sont actives. L'étalement des amplitudes incite cependant à considérer ces hypothèses avec prudence. Il vaudrait sans doute mieux analyser les enregistrements individuels plutôt que de traiter les données globalement tel que nous l'avons fait ici.

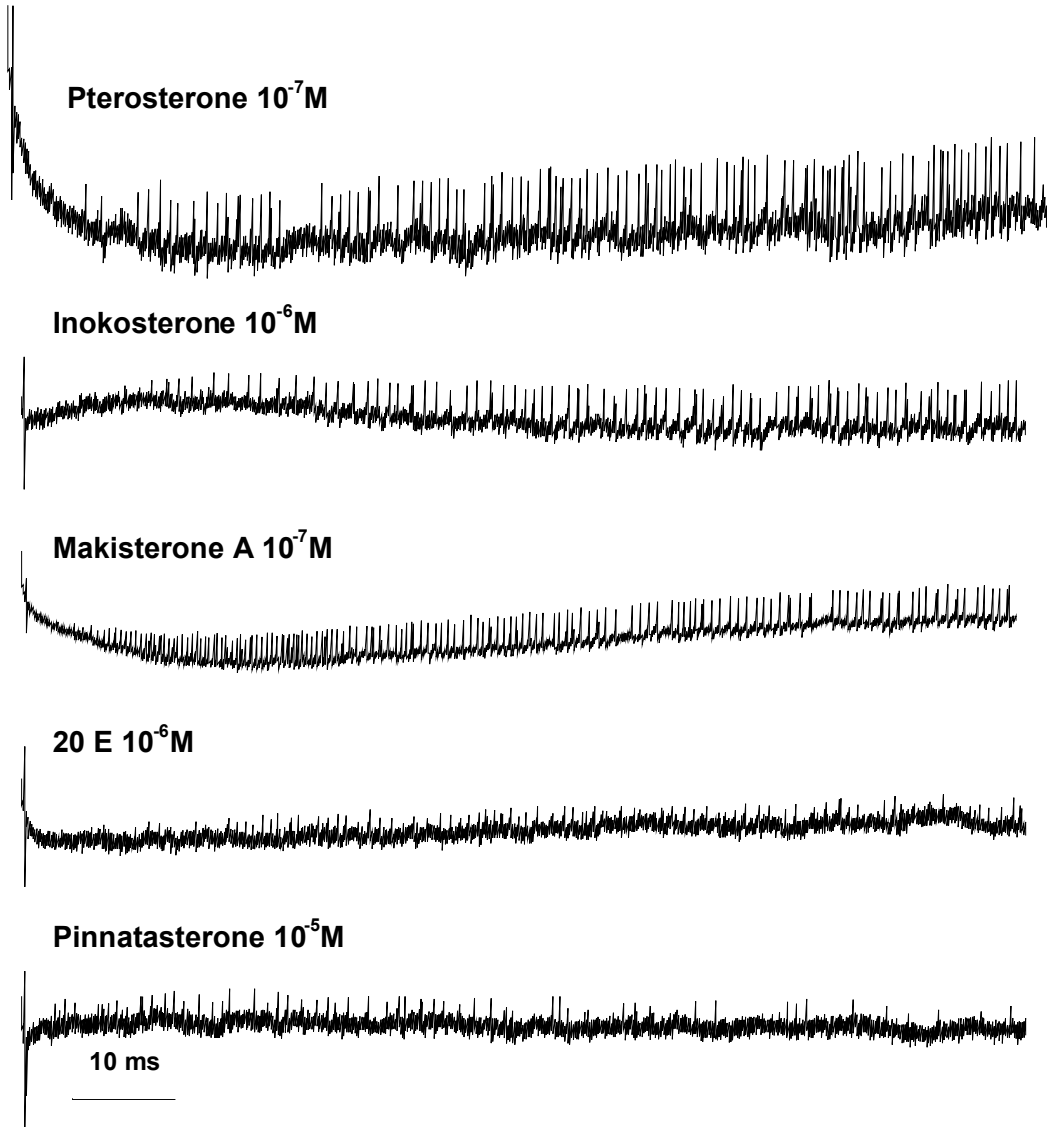


Figure 3-8. Exemples de réponses à des phytoecdystéroïdes

Ces enregistrements, obtenus sur des sensilles médiales, montrent les périodes de latence au début de la stimulation avec des ecdystéroïdes à faible dose. L'amplitude des potentiels d'action augmente progressivement. La réponse est monocellulaire, tonique et régulière.

3.2.3.2 Réponses aux ecdystéroïdes et à leurs analogues.

Lors de la stimulation des sensilles styloconiques avec les solutions d'ecdystéroïdes et leurs analogues, nous avons observé plusieurs types de réponses que nous avons arbitrairement regroupées en quatre groupes :

3.2.3.2.1 Le groupe I (Figure 3-9) :

Les molécules qui le composent sont faiblement stimulantes. Il s'agit de la 2.3-dihydro-3β-hydroxywithacnistine, la 2.3-dihydro-3β-méthoxyiochromolide, la 2,3-

dihydro-3β-méthoxywithacnistine, la cucurbitacine B, le RH-5849 et le RH-5992. Ces molécules activent faiblement les cellules qui répondent à l'eau et au sel. L'amplitude des potentiels ne dépasse pas 1 mV dans les sensilles latérales et médiales. La réponse est de 10 à 20 PA/s, c'est à dire comme en présence de KCl 10^{-3}M. On n'observe pas d'augmentation de la décharge nerveuse durant la stimulation, ni de changement dans l'amplitude des potentiels d'action, excepté pour les withanolides où apparaissent quelques potentiels d'action de 1 et 1,2 mV pour une dose de 10^{-3}M. Le RH-5992 semble plus actif que le RH-5849. La cucurbitacine B semble également exciter une cellule dans les sensilles latérales.

3.2.3.2.2 Le groupe II (Figure 3-10) :

Il est représenté par la (5-α-H)-20-hydroxyecdysone, la 9,20-dihydroxyecdysone, l'ecdysone 22-myristate et la canascenstérone. Ces composés induisent une activité faible mais spécifique, dont le maximum atteint 20 PA/s au niveau de la sensille latérale et 60 PA/s au niveau de la sensille médiale. Les cellules activées présentent des potentiels d'action de taille comparable à ceux de la 20E et du KCl (0,4 à 1 mV sur la latérale). La décharge nerveuse augmente faiblement avec les doses croissantes. La canescenstérone présente une courbe dose-réponse régulière avec une atténuation des réponses aux fortes doses.

3.2.3.2.3 Le groupe III (Figure 3-11) :

Nous avons regroupé les molécules suivantes dans ce groupe : l'inokostérone, la ptérostérone, l'ecdysone, la 20E et la pinnatastérone. Sur les sensilles médiales, les courbes doses-réponse sont régulières et ont le même seuil d'activation (10^{-7} M). L'intensité de la réponse baisse à partir de 10^{-3} M, probablement à cause d'un temps de récupération insuffisant entre les présentations de concentrations croissantes du stimulus. L'inokostérone provoque une réponse nerveuse plus intense que la 20E mais la courbe dose-réponse paraît se situer dans la même gamme de concentrations. Sur les sensilles latérales, les courbes dose-réponse sont moins régulières.

Les composés de ce groupe étaient très actifs. L'activité nerveuse induite sur la sensille médiale était de l'ordre de 60 PA/s, comparable à celle induite par la 20E. La fréquence des potentiels d'action changeait avec les concentrations des stimuli. L'amplitude des potentiels d'action qui augmentait au début de l'enregistrement

électrique ainsi que la période de latence dans la décharge des potentiels d'action qui apparaît à des faibles doses de stimuli, révèlent l'activité d'une cellule, avec une décharge de potentiels d'action larges et réguliers, d'une grande ressemblance avec la cellule qui répond généralement aux antiappétents décrite auparavant par Peterson *et al*. (1993).

Il est possible qu'une cellule supplémentaire soit recrutée aux doses élevées de 20E (sensille latérale) et de ptérostérone (sensille médiale), car à 10^{-3} M, la réponse observée est plus intense que celle attendue si la courbe dose-réponse suivait une progression régulière. La pinnatastérone pourrait être dans une situation similaire. Une analyse électrophysiologique plus fine serait nécessaire pour élucider cette question (analyse temporelle des décharges, expériences d'adaptation croisées).

3.2.3.2.4 Le groupe IV (Figure 3-12) :

Nous avons regroupé dans cette catégorie deux molécules très actives, la makistérone A et la cyastérone. L'activité nerveuse induite était plus forte que celle induite par la 20E. Nous n'avons pas obtenu de courbe dose-réponse sur la gamme de concentrations testées suggérant que le seuil de détection de ces molécules soit plus bas que pour la 20E. Le profil des réponses et l'amplitude des potentiels d'action suggèrent que ces molécules activent plus d'une seule cellule. La cellule activée par les antiappétents semble être stimulée par ce groupe de molécules vu le cours de la décharge temporelle surtout la période de latence observée avant l'émission régulière des potentiels d'action et l'amplitude des potentiels d'action qui remplissent les critères d'une cellule spécialisée dans la reconnaissance des antiappétents.

Finalement, ces observations montrent que les molécules des groupes 3 et 4 stimulent au moins un neurone dans deux sensilles différentes et que les molécules du groupe 4 sont probablement détectées à un niveau plus bas que celles du groupe 3.

3.2.3.2.5 Hiérarchie des réponses et activité électrophysiologique

Les profils de réponses sont regroupés Figure 3-13. Les molécules du groupe III et IV se distinguent nettement des autres. Il faut noter que pour ces molécules, les réponses obtenues à faible concentration sont le plus souvent monocellulaires, avec une latence initiale à la décharge (de l'ordre d'une centaine de millisecondes) et des

potentiels d'action dont l'amplitude augmente progressivement (Figure 3-8). L'activité nerveuse résultante est régulière et maintenue.

3.2.3.3 Variabilité des réponses

Une analyse de variance a été effectuée sur ces données (2200 enregistrements), en considérant les facteurs individus, produits et types de sensilles. L'influence de chacun de ces trois facteurs s'est révélée très significative ($p<0.0001$) (voir annexe III). Nous n'avons pas pris en compte dans cette analyse le nombre et l'identité des cellules gustatives impliquées dans les réponses.

Le facteur produit (20 produits testés) est directement lié à la nature des molécules détectées. Ce facteur influence deux paramètres dans les réponses, les cellules excitées (une ou plusieurs dans la sensille ; cette information n'a pas été prise en compte) et la position de la courbe dose-réponse qui pourrait être estimée, si la gamme de concentrations était complète, par l'intensité maximale et le point d'inflexion.

Le facteur sensille (latérale ou médiale) joue un rôle important. D'une part, les sensilles médiales et latérales ne répondent pas avec la même intensité. Pour les sensilles médiales, l'activité maximale se distribue entre 10 et 120 PA/s. Pour les sensilles latérales, les activités maximales des réponses se distribuent entre 1 et 80 PA/s. D'autre part, le spectre de réponse n'est pas identique, dans l'ordre d'efficacité de stimulation des produits.

Le facteur individu pourrait être lié à l'âge de l'insecte (temps après la mue) qui intervient sur la qualité de la perception sensorielle (Blaney *et al.*, 1986). Il n'a cependant pas été contrôlé de manière systématique dans cette expérience.

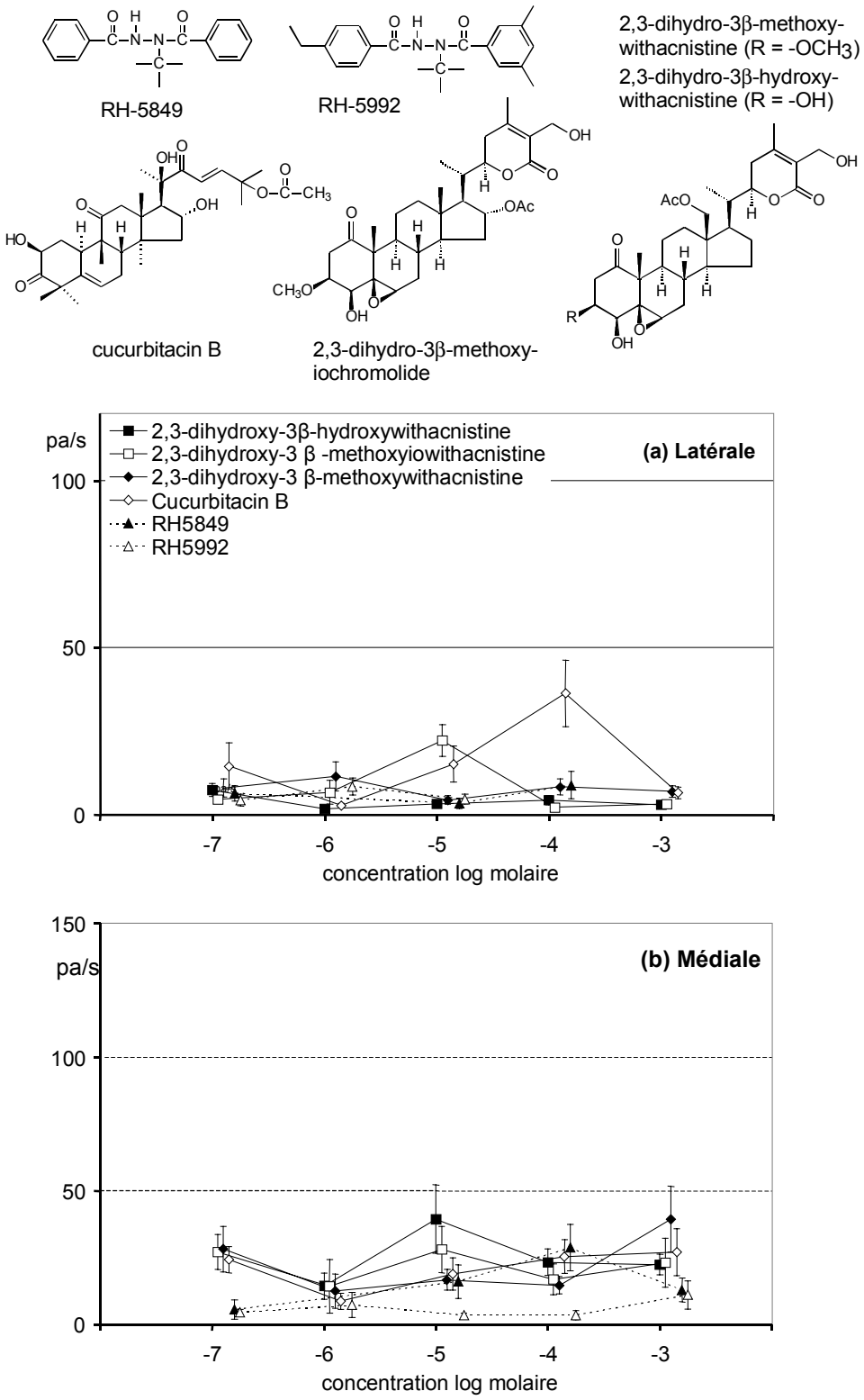


Figure 3-9 Groupe I – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales

Sur chaque graphique, les points mesurés correspondent à la moyenne de 5 à 10 mesures. L'écart à la moyenne est représenté par des barres verticales. Ordonnée : intensité des réponses ; abscisses = logarithme de la concentration. (a) réponses des sensilles latérales, (b) sensilles médiales.

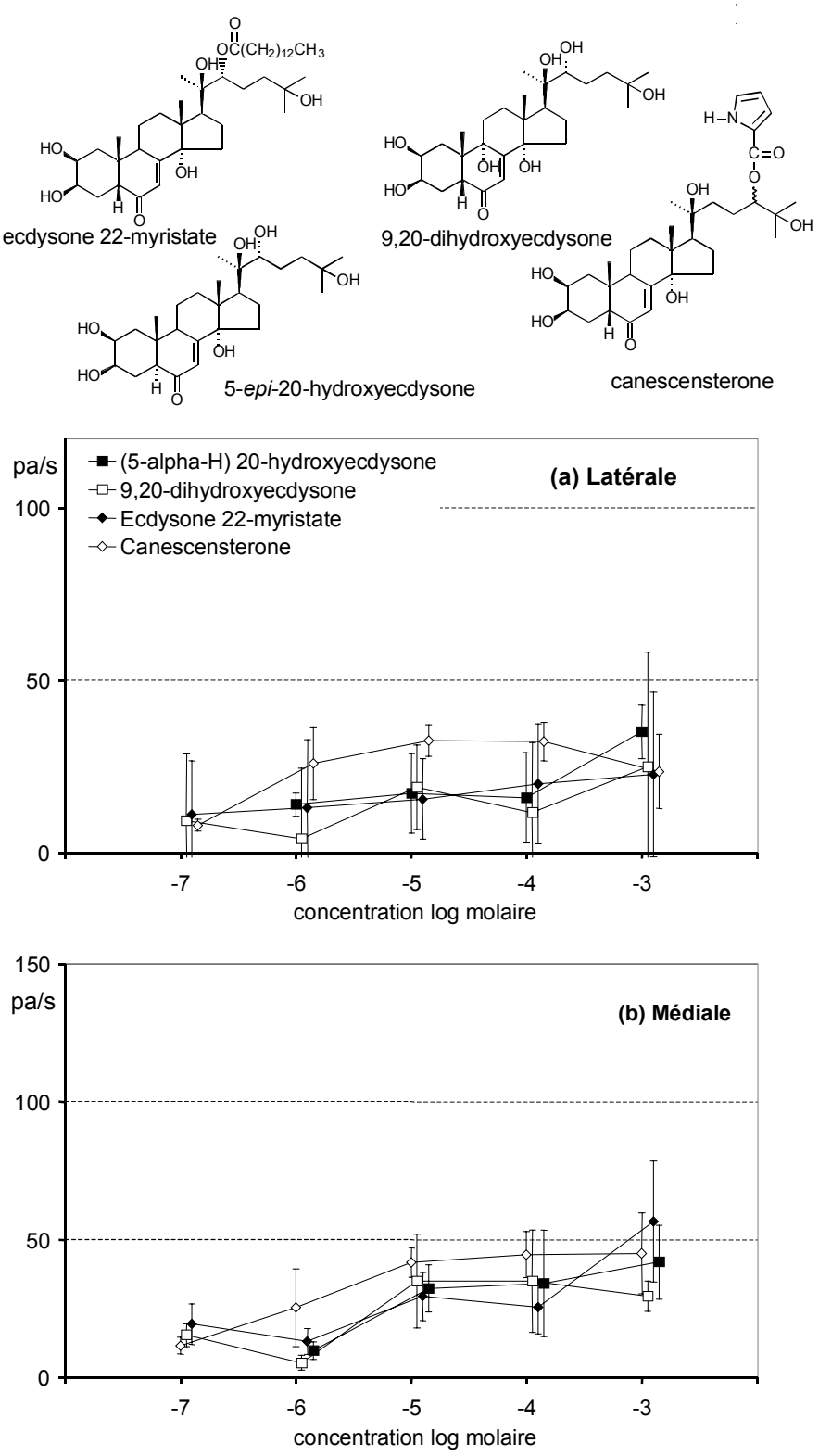


Figure 3-10 Groupe II – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales

Chaque point correspond à la moyenne de 8 à 20 mesures. Mêmes commentaires que pour la figure précédente.

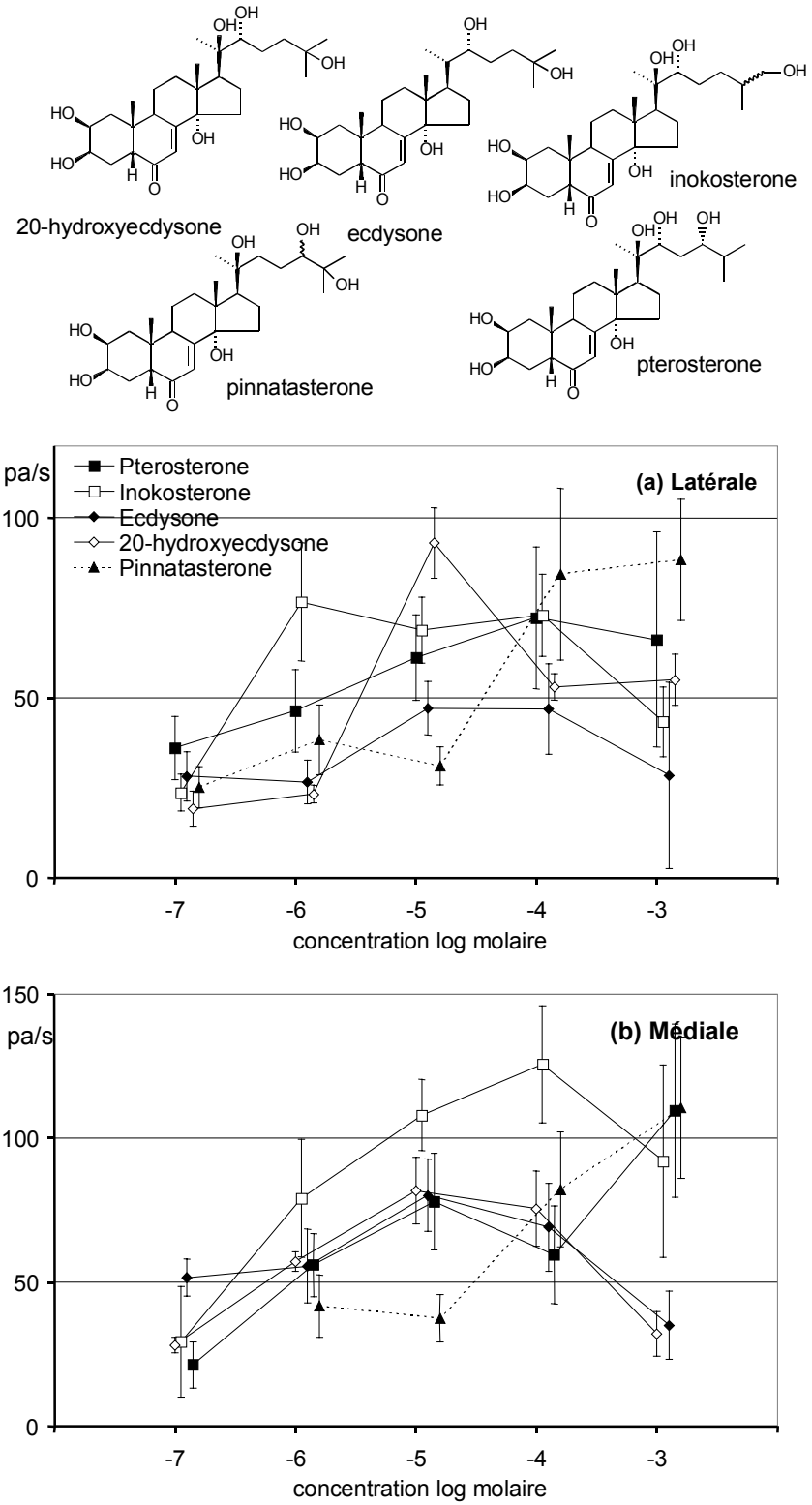
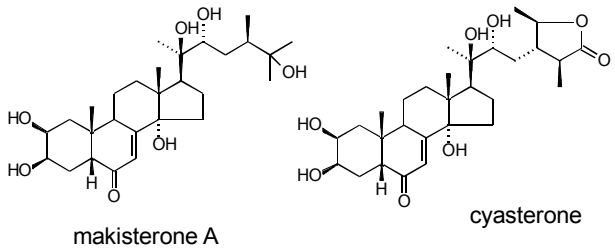


Figure 3-11 Groupe III - – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales

Chaque point correspond à la moyenne de 5 à 22 mesures. Mêmes commentaires que pour la figure précédente.



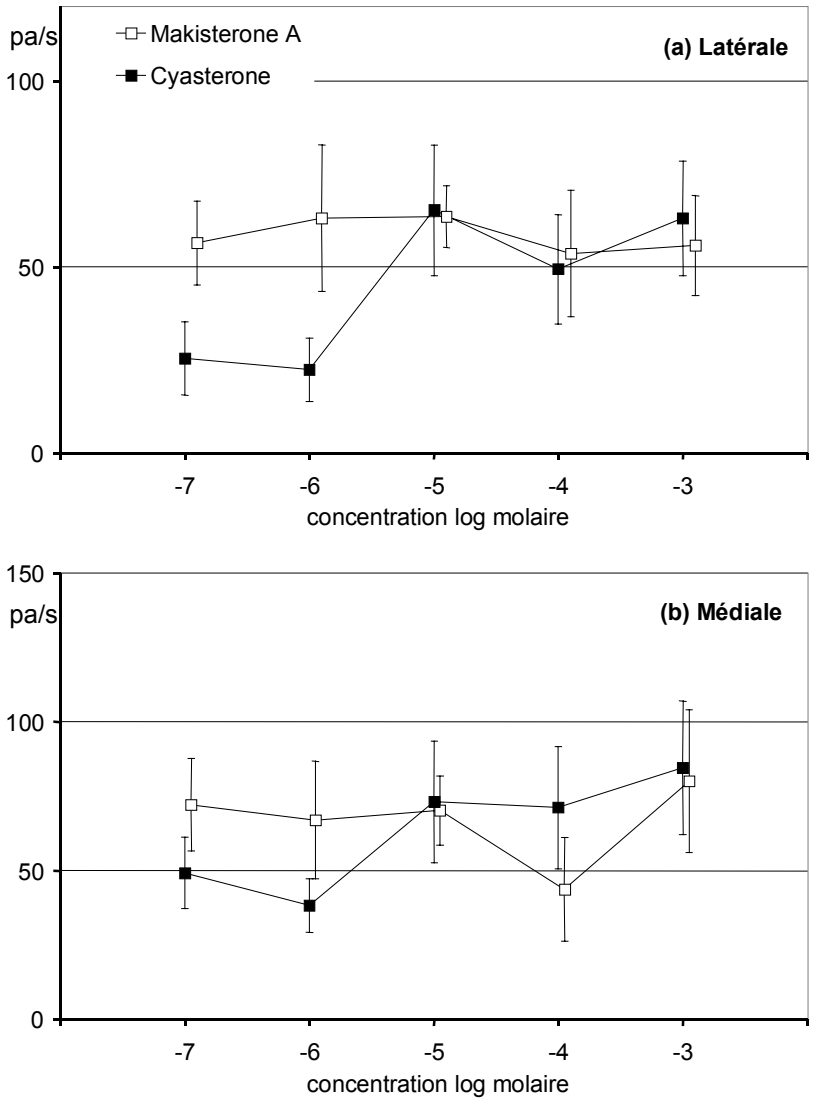


Figure 3-12 Groupe IV – structures chimiques et réponses des sensilles latérales et médiales

Chaque point correspond à la moyenne de 8 à 15 mesures. Mêmes commentaires que pour les figures précédentes.

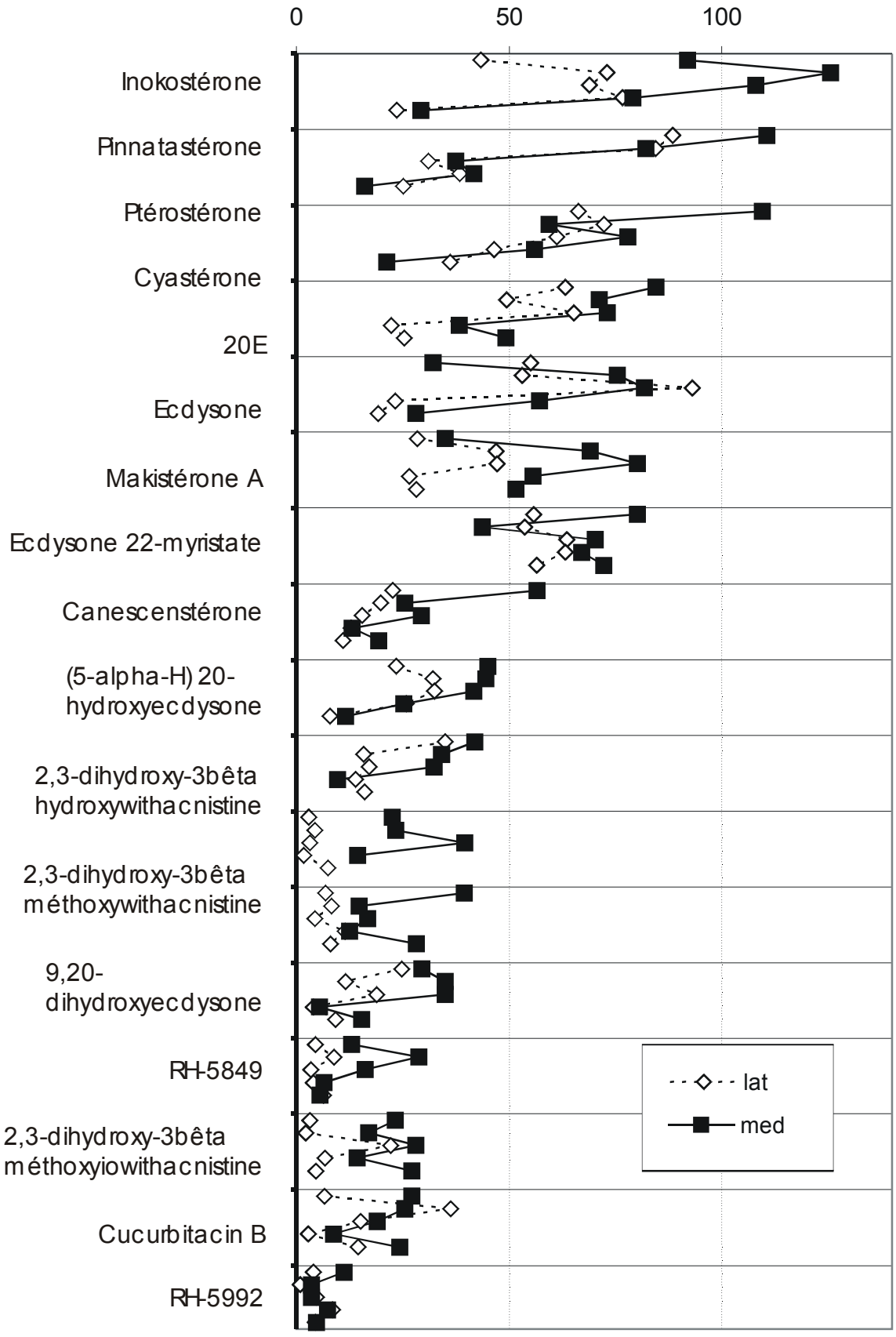


Figure 3-13 Comparaison des courbes dose-réponse des différents produits testés
Chaque point représente la moyenne des réponses obtenues (pour chaque produit : 10^{-7} à 10^{-2} M ; resp. du bas vers le haut). Les produits sont classés en fonction de la réponse maximale de la sensille médiale à la série de concentrations.

3.2.4 Discussion

3.2.4.1 Physiologie sensorielle

Les phytoecdystéroïdes agissent à deux niveaux, le premier est sensoriel quand les organes gustatifs sont en contact avec ces substances lorsque les chenilles analysent la qualité de leur source alimentaire, et le deuxième quand les molécules transitent dans le tube digestif. Le deuxième niveau a été très étudié (Kubo *et al.*, 1983; Blackford, 1995) alors que l'effet de ces substances sur les récepteurs sensoriels n'est pas trop connu.

Nos résultats indiquent clairement que les sensilles ont des sensibilités différentes selon leur type. Pour certains produits, les courbes sont quasiment équivalentes (Figure 3-13 : ptérostérone, cyastérone, makistérone A) alors que pour d'autres, les courbes dose-réponse sont très différentes (Figure 3-13 : inokostérone, ecdysone, ecdysone 22-myristate, canescenstérone). En outre, les sensilles médiales répondent aux phytoecdystéroïdes avec plus de potentiels d'action que les sensilles latérales. Cette différence de sensibilité est aussi révélée dans notre étude statistique, qui a montré que le type sensille était significatif. Il faut cependant prendre ce résultat avec une certaine précaution, dans la mesure où la concentration d'inositol utilisée était très stimulante (Figure 3-6), et pouvait contaminer la réponse aux produits présentés à sa suite. Si cette différence de sensibilité était confirmée, elle pourrait être liée au rôle que jouent les sensilles styloconiques dans la détection des antiappétents et des stimulants, selon leur position sur l'orifice buccal ou parce que l'une contiendrait plus de récepteurs membranaires que l'autre.

Ostrinia nubilalis est plus sensible aux analogues des phytoecdystéroïdes mais pas à tous. D'une manière générale, les antiappétents peuvent agir selon différentes voies, comme nous l'avons déjà noté dans l'introduction, soit en stimulant une ou plusieurs cellules sensibles, soit en inhibant d'autres cellules qui répondent aux phagostimulants (Schoonhoven *et al.*, 1992; Schoonhoven et Lin-er, 1994; van Loon et Schoonhoven, 1999). Les antiappétents les plus actifs, sont capables de stimuler plusieurs cellules y compris la cellule appelée « deterrent cell » (Schoonhoven, 1982). La « deterrent cell » serait capable de reconnaître une grande variété de structures chimiques. Elle possèderait une gamme de différents sites récepteurs, dont chacun possède sa propre

spécificité de la structure chimique. Ces hypothèses sont compatibles avec nos observations.

La sensibilité des sensilles latérales et médiales influence le processus de décision au niveau du système nerveux central, d'où résulte une réponse positive (préférence) ou négative (évitement). Cette décision dépend des composés et des concentrations utilisées (van Loon, 1990). Les réponses comportementales et électrophysiologiques montrent qu'il existe une généralement une bonne corrélation entre l'antiappétence et l'activation de ces sensilles. Ce fait a été confirmé chez *Bombyx mori*, où lors des études comportementales, l'alimentation était inhibée par la présence des phytoecdystéroïdes, et lors des tests d'électrophysiologie, les cellules gustatives répondaient d'une façon très marquée. On parle plutôt d'une cellule spécifique que les auteurs décrivent de récepteurs R (équivalent à la deterrent cell), un neurone qui est généralement stimulé par les antiappétents et codant une inhibition de l'alimentation (Ishikawa, 1966; Tanaka *et al.*, 1994). Dans notre cas, il est difficile d'affirmer qu'il existe vraiment une cellule spécialisée dans la réponse aux antiappétents. Nous allons quand même essayer de vérifier cette hypothèse au cours du troisième chapitre de ce travail.

3.2.4.2 Relation structure activité

Plusieurs caractéristiques structurales des molécules phytoecdystéroïdes influent sur leurs effets en tant que stimulants sensoriels, et cela explique les différents profils d'action entre leurs structures chimiques très voisines. Chez *Mamestra brassicae*, les activités des ecdystéroïdes dépendraient de la disposition des carbones et des liaisons sur les chaînes latérales (Marion-Poll et Descoins, 2002). Des différences importantes d'activité sont observées entre des molécules qui ne diffèrent que par un groupement hydroxyle : la ponastérone A (un groupement hydroxyle en C25), l'ecdysone (qui ne possède pas ce groupement) et la 20E (un hydroxyle en C20). C'est le cas aussi pour *O. nubilal*is. De même dans le présent travail, l'activité de la molécule stéroïde au niveau des récepteurs gustatifs de la larve variait d'une structure à l'autre. De telles variations pourraient aboutir à des molécules stimulant l'alimentation (Isman, 1995). Il serait nécessaire d'approfondir le mode d'action des phytoecdystéroïdes au niveau des récepteurs gustatifs d'autres espèces d'insectes, car l'un des points faibles de la

recherche d'un effet antiappétent est que ces molécules ne sont généralement testées que sur une seule espèce (Jermy, 1990).

Les expériences réalisées dans ce travail mériteraient d'être poursuivies. En effet, le protocole expérimental suivi ici était destiné à repérer les composés les plus stimulants dans un groupe de molécules connues pour leurs effets sur le récepteur hormonal. Plusieurs de ces molécules ont été trouvées comme ayant un effet plus marqué que la 20E, mais de nombreuses incertitudes restent à lever si l'on s'intéresse à l'affinité des récepteurs pour ces ligands. D'une part, il faudrait s'assurer que ces molécules agissent bien sur une cellule et non plusieurs. Les observations que nous avons réalisées montrent que ce n'est pas le cas, en particulier pour les concentrations élevées de ces ligands, où deux cellules au moins sont activées dans les sensilles. D'autre part, dans la mise en place de ce protocole, il est apparu que certaines molécules peuvent contaminer les réponses ultérieures et nécessiter des temps de repos inter-stimulation plus longs que 3 minutes. C'est le cas pour les molécules du groupe III pour lesquelles on obtient des courbes dose-réponse où les réponses aux concentrations fortes sont très atténuées par rapport aux réponses obtenues aux concentrations moyennes. C'est le cas aussi pour l'inositol dont nous avons observé une activation résiduelle sans doute liée à l'intensité des réponses provoquées. Enfin, dans les molécules testées, certaines possèdent des chaînes latérales assez complexes. Cela suggère que certaines des fonctions portées stimulent d'autres récepteurs que les récepteurs du neurone sensible aux antiappétents.

3.2.4.3 Comparaison avec l'affinité des récepteurs nucléaires pour les phytoecdystéroïdes

En comparant nos résultats avec les travaux conduits sur les récepteurs nucléaires, nous constatons que les concentrations d'ecdystéroïdes nécessaires pour activer des récepteurs gustatifs périphériques sont généralement 100 à 1000 fois plus grandes que celles nécessaires à l'activation des récepteurs nucléaires. Exemple : il faut $1x10^{-9}$M de 20E pour obtenir une affinité avec le récepteur nucléaire dans les cellules BII de *Drosophila melanogaster* (Dinan, 1985; Dinan *et al.*, 1996) alors qu'il faut au moins $1x10^{-7}$M à 10^{-6}M de 20E pour observer une activité au niveau des récepteurs gustatifs.

En réalité, comparer la perception gustative chez un Lépidoptère à l'affinité d'un récepteur nucléaire chez un Diptère serait un travail nécessitant un plus grand

investissement expérimental que le nôtre. Il serait préférable de conduire le travail sur des insectes de la même espèce ou phylogénétiquement proches.

3.3 Détection des phytoecdystéroïdes dans le genre Ostrinia

3.3.1 Introduction

La Pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner, est un Lépidoptère qui représente un des plus grands ravageurs de l'Europe et de l'Amérique du Nord (Bourguet *et al.*, 2000). C'est un insecte polyphage, dont plus de 224 espèces végétales ont été répertoriées comme plantes-hôtes par Hodgson en 1928. En tant qu'insecte polyphage, il est susceptible de rencontrer des plantes contenant des phytoecdystéroïdes. Les études montrent que la plupart des plantes-hôtes de la Pyrale ne contiennent pas ou contiennent des quantités minimes d'ecdystéroïdes (< 5 ppm de poids sec) à l'exception de quelques plantes appartenant à la famille des Chenopodiaceae telles que *Spinacea oleracea* L (épinard), *Chenopodium album* L. dont le taux en ecdystéroïdes peut atteindre 175 ppm (Dinan, 1995).

Cependant, nous avons montré dans la partie précédente que les phytoecdystéroïdes sont antiappétentes pour les larves de la Pyrale du maïs et qu'elles étaient perçues à des doses faibles (20E 10^{-7}M et 10^{-6}M) par ses récepteurs gustatifs. Cette observation ne cadre pas avec les observations rapportant que les insectes polyphages sont peu sensibles aux substances antiappétentes (Bernays et Chapman, 2000; Bernays *et al.*, 2000). Eviter les plantes contenant des ecdystéroïdes ne représente pas non plus une nécessité absolue pour *Ostrinia nubilalis* car les larves sont capables de détoxiquer de l'ecdysone présente dans le milieu alimentaire par conjugaison en 22 pour former un ester d'acide gras (mémoire de DEA de Simon Moyal, 1999).

En ce qui concerne la sensibilité comportementale et métabolique aux phytoecdystéroïdes, les travaux de Blackford distinguent trois catégories d'insectes :

1. La première catégorie est **très sensible** à de faibles doses de 20E qui provoquent des troubles hormonaux, un développement anormal et inhibent l'alimentation. Ces insectes se développent sur des plantes qui ne contiennent pas de phytoecdystéroïdes et sont généralement monophages comme *Inachis io*. Ce serait le cas de *Bombyx mori* qui est sensible à la 20E (Tanaka et Takeda, 1993) et s'alimente sur *Morus sp.*, qui ne contiennent pas de quantités notables

d'ecdystéroïdes. Chez ces espèces, la métabolisation des ecdystéroïdes est lente, indiquant une mauvaise détoxication du produit (Blackford et Dinan, 1997). L'inhibition de l'alimentation serait liée à la présence de la cellule phago-dissuasive ou deterrent cell. Cette cellule est très sensible aux ecdystéroïdes comme c'est le cas chez *B. mori* (Tanaka *et al.*, 1994) et *Pieris brassicae* (Ma, 1972).

2. La deuxième catégorie est constituée par des **espèces semi-tolérantes**, généralement oligophages comme *Tyria jacobaeae.* Elles supportent de bas niveaux d'ecdystéroïdes durant leur alimentation mais sont sensibles à de fortes doses. Ces espèces ont probablement la capacité de détecter et d'éviter les plantes contenant des ecdystéroïdes durant leur quête de nourriture. Les travaux de Moyal en 1999, stage de DEA, suggèrent qu*'Ostrinia nubilalis* appartient à cette catégorie d'insectes.

3. La troisième catégorie regroupe des **espèces tolérantes**, généralement polyphages comme *Spodoptera littoralis, Lacanobia oleracea* et *Plutella xylostellae*. Ces espèces s'alimentent sur une large variété de plantes contenant des phytoecdystéroïdes (Blackford, 1995). Un autre exemple est celui de *Manduca sexta* qui s'alimente sur des *Solanaceae,* une famille où l'on a isolé récemment des taux significatifs d'ecdystéroïdes, en particulier chez *Nierembergia hippomanica* et *Nierembergia solanacea*. Ces espèces d'insectes possèdent des mécanismes de détoxication particuliers et efficaces, qui leur permettent de s'alimenter sur des milieux très concentrés en 20E. Cette détoxication résulte de la conversion – démontrée au niveau du tube digestif - par une estérification de l'hydroxyle en C22 de la chaîne latérale par des acides gras à longue chaîne ou par une excrétion de la 20E non métabolisée (Blackford, 1995). Chez ces espèces, la perception des ecdystéroïdes devrait être faible ou nulle.

Pour résoudre ces contradictions entre la sensibilité gustative de la pyrale et son régime alimentaire, une des explications possibles consiste à considérer la pyrale comme pas vraiment polyphage ou comme ayant adopté cette stratégie trop récemment pour se conformer à cette règle. Il existe en effet différentes populations de Pyrale de maïs, différenciées aux niveaux morphologique, physiologique et écologique (Hudon *et al.*, 1986; Frolov, 1994). Ces populations pourraient exprimer

des sensibilités différentes aux ecdystéroïdes (nous avons testé une souche provenant de prélèvements sur maïs). Cette sensibilité aux ecdystéroïdes est peut-être un reliquat d'une sensibilité partagée par des espèces ancestrales ou proches de la pyrale. *Ostrinia* qui forme un complexe d'une vingtaine d'espèces, extrêmement proches sur le plan morphologique, mais vivant sur des plantes-hôtes différentes. Certaines de ces espèces sont polyphages tandis que d'autres sont oligophages. Il nous a paru intéressant de vérifier si la sensibilité aux phytoecdystéroïdes était conservée chez des espèces voisines d'*Ostrinia*, et si la sensibilité vis à vis des phytoecdystéroïdes pouvait dépendre du régime alimentaire. Ce travail a été rendu possible grâce à une collaboration avec Yukio Ishikawa (Faculté d'Agronomie, Université de Tokyo), qui s'intéresse à la phylogénie du genre *Ostrinia* et a pu collecter et nous envoyer des larves de Pyrales de différentes espèces.

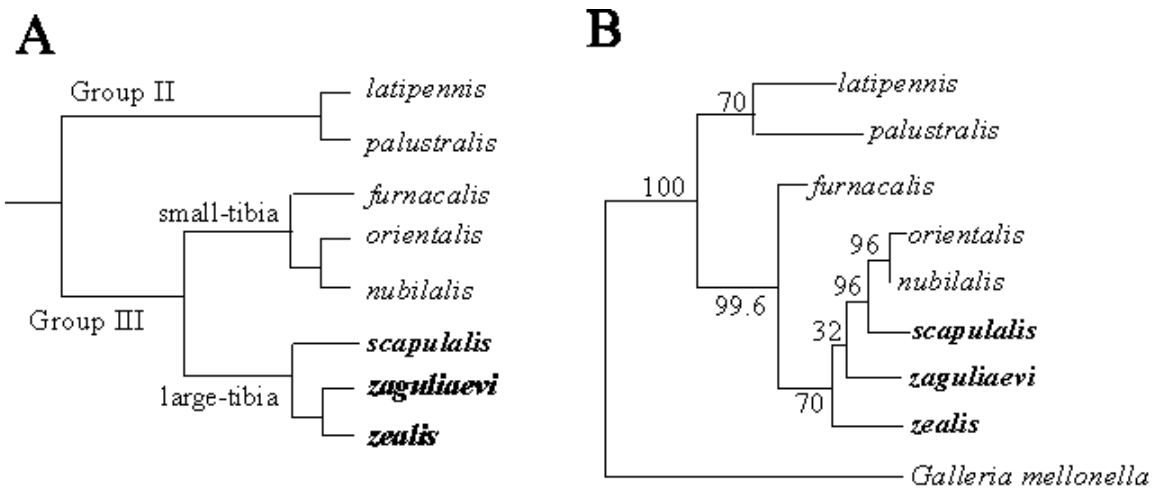


Figure 3-14 Arbres phylogéniques du genre *Ostrinia*

L'arbre (A) est estimé à partir de la morphologie des adultes. L'arbre (B) a été estimé à partir de l'analyse de séquence du gène mitochondrial C0II (Ishikawa *et al.*, 1999).

Mondialement, il existe 20 espèces différentes d'*Ostrinia* (Mutuura et Munroe, 1970). Leur caractérisation était basée essentiellement sur des critères morphologiques et phéromonaux (Ishikawa *et al.*, 1999). Leurs relations phylogénétiques basées sur une analyse de l'ADN mitochondrial sont présentées dans la Figure 3-14. Sept espèces sont répertoriées au Japon : *furnacalis*,. *orientalis*, *scapulalis*, *zealis*, *zaguliaevi*, *palustralis* et *latipennis*. Les cinq premières sont très proches morphologiquement et forment le complexe *furnacalis*. L'identification de ces espèces est impossible au stade larvaire et très difficile au stade adulte. Les

plantes-hôtes fournissent un bon moyen d'information lors de l'identification mais quelquefois on rencontre les mêmes plantes-hôtes pour différentes espèces. Malgré leur grande ressemblance morphologique, *nubilalis* et *orientalis* montrent des différences dans leurs plantes-hôtes et leur distribution géographique. Bien que *orientalis*, soit l'espèce la plus proche de *nubilalis*, elle ne s'alimente pas sur le maïs.

Selon l'hypothèse de Blackford concernant le lien entre l'effet de la 20E et le régime alimentaire, on devrait s'attendre aux résultats suivants :

- *O. zealis* et *zaguliaevi* devraient être sensibles aux ecdystéroïdes car elles sont monophages
- *O. nubilalis*, *orientalis* et *scapulalis* devraient être peu sensibles aux ecdystéroïdes car elles sont polyphages

Plus généralement, on s'attend à ce que les espèces polyphages soient insensibles aux ecdystéroïdes (sur le plan de la toxicité et du comportement d'évitement) contrairement aux espèces monophages ou oligophages. Etant donné que le comportement d'évitement est basé sur les capacités de détection gustatives, nous avons testé cette hypothèse en évaluant la capacité de détection de la 20E chez plusieurs espèces d'*Ostrinia*.

Tableau 3-2 Plantes-hôtes préférées des espèces d'*Ostrinia* trouvées au Japon (d'après Ishikawa)

Species	Diet range	Preferred host plants	Plant family**
O. latipennis	oligophagous	*Polygonum* spp.(knot weeds)	Polygonaceae
O. palustralis	oligophagous	*Rumex* spp. (docks)	Polygonaceae
O. furnacalis (Asian corn borer)	polyphagous	*Zea mays* (maize) *Sorghum bicolor* *Zingiber officinalis*(ginger) *Rumex* spp.(docks)	Gramineae Solanaceae, Gingiberaceae Polygonaceae
O. orientalis	oligophagous	*Xanthium* spp.(cockleburs) *Senecio* sp. *Rumex* spp.(docks)	Compositae Polygonaceae
O. nubilalis (European corn borer)	polyphagous	known as the pest of *Zea mays* (maize) , but actually extremely polyphagous	Many families

O. scapulalis (adzuki bean borer)	polyphagous	*Vigna* spp.(legumes) *Humulus lupulus* (hop) *Xantium* spp (cockleburs) *Rumex* spp.(docks)	Leguminosae Compositae Moraceae Polygonaceae
O. zealis (burdock borer)	oligophagous	*Arctium lappa*(burdock) *Cirsium* spp.(thistles) *Dahlia* spp. (Dahlia)	Compositae
O. zaguliaevi (butterbur borer)	monophagous	*Petacites japonicus* (butterbur)	Compositae

Tableau 3-3 Taux de phytoecdystéroïdes dans les plantes-hôtes des espèces d'*Ostrinia.* Ce tableau regroupe des mesures effectuées par RIA (DBL-1 antiserum; µg E eq./g) dans les différentes plantes-hôtes des espèces *Ostrinia* (d'après Dinan, 1992, Dinan, 1995 ; Dinan, 1999)

Espèce	**Plantes hôtes**	**Phytoecdystéroïdes**
O. furnacalis *(japonaise)* *O. nubilalis*	*Zea mays* Polyphage Graminae	4.0 (dans les cas d'épis frais commercialisés) Rien
O. palustralis	*Rumex (*Polygonacae)	Rien
O. orientalis	*Xanthium (*Compositae) *Rumex* (Polygonacae) *Senecio*	Rien
O. latipennis	Polygonum	Rien
O. scapulalis	Polyphage	

3.3.2 Matériels et méthodes

3.3.2.1 Matériel biologique

Les larves étaient capturées dans la nature au Japon et triées selon le stade larvaire avant d'être expédiées en France. Dès leur réception dans le site à Versailles, elles étaient maintenues en élevage sur un substrat alimentaire dans lequel elles étaient envoyées. Le milieu d'*O. palustralis* et *orientalis* contenait de la poudre de *Rumex*. Nous avons essayé de maintenir les larves *d'O. palustralis* sur des plantes de *Rumex* prélevées dans le parc du château de Versailles, mais nous n'avons pas réussi à obtenir des pontes permettant de développer sur le site, notre propre élevage. Nous avons rencontré des problèmes d'élevage, comme le nombre de chenilles était très limité surtout pour les espèces d*'Ostrinia orientalis*, *zealis* et *zaguliaevi* qui sont des espèces rares, et quelquefois très difficiles à trouver. Un lot de 6 larves d'*Ostrinia*

furnacalis chinoise (capturées par Y. Ishikawa) a été élevé et testé uniquement pour voir si cette espèce oligophage pouvait être sensible à la 20E.

Ces larves étaient gardées dans des boites noires à des températures de 21 °C, sous une photopériode de 16 heures de jour / 8 heures de nuit et une humidité relative de 75-80 %. Les larves (jeunes L5) caractérisées par une capsule céphalique claire étaient sélectionnées pour effectuer les enregistrements.

3.3.2.2 Les produits chimiques

La 20E, le chlorure de potassium, le fructose, l'inositol provenaient de chez Sigma-Aldrich. L'électrolyte choisi était le KCl 10^{-3}M.

3.3.2.3 Les enregistrements électrophysiologiques

La préparation est celle décrite précédemment. L'enregistrement des potentiels d'action est réalisé sous loupe binoculaire, par l'intermédiaire d'un amplificateur spécialisé (TASTEProbe01, Synthec, Hollande).

3.3.2.4 Protocole expérimental

Nous avons évalué les réponses des sensilles styloconiques latérales et médiales, principalement. Chaque série d'enregistrements débutait par la présentation de KCl 10^{-3} M, fructose 10^{-3} M et inositol 10^{-3} M. Nous avons ajouté le fructose car c'est un sucre très répandu dans la nature, qui n'active pas la même cellule que l'inositol. Cette série de stimulations permettait d'écarter les larves ne répondant pas (10 %). Ensuite pour la 20E, une série de concentrations de 10^{-6}M à 10^{-3}M était testée. Chaque sensille était stimulée une fois par un produit et une dose déterminés. Entre deux enregistrements successifs sur une même sensille, un temps de 3 minutes était respecté. Pour 8 à 10 larves utilisées par espèces, ce qui nous donne une moyenne de 32-40 mesures par point expérimental.

Nous avons également essayé d'enregistrer l'activité nerveuse des neurones gustatifs du palpe maxillaire (5-6 neurones gustatifs) en coiffant ce palpe avec une électrode contenant diverses solutions. La qualité technique des enregistrements n'étant pas bonne, ces enregistrements n'ont pas été réalisés de manière systématique.

3.3.3 Résultats

3.3.3.1 Réponses aux stimuli standards

Les réponses des larves aux stimuli standards figurent dans le tableau 2-4. La réponse au KCl était faible voire nulle dans le cas des deux sensilles styloconiques pour toutes les larves testées. La réponse *d'O. nubilalis* aux stimuli standards, était caractérisée par une forte perception de l'inositol et du fructose (Figure 3-15) au niveau de la sensille médiale tandis que la sensille latérale n'est pas sensible à l'inositol et faiblement excitée par le fructose. Une réponse identique a été obtenue dans le cas *d'O. zealis*. Des réponses moyennes pour les deux types de sucres ont été obtenues dans le cas d*'O. scapulalis* et surtout au niveau de la sensille médiale. L'inositol activait fortement la sensille médiale uniquement chez *O. palustralis*, alors que le fructose n'était pas actif. Chez *O. latipennis*, les deux sucres sont aussi perçus mais faiblement. *O. furnacalis* semblait ne pas détecter l'inositol, et détectait peu le fructose 10^{-3}M du côté de la sensille latérale. Par contre la sensille médiale chez cette espèce était très sensible au fructose.

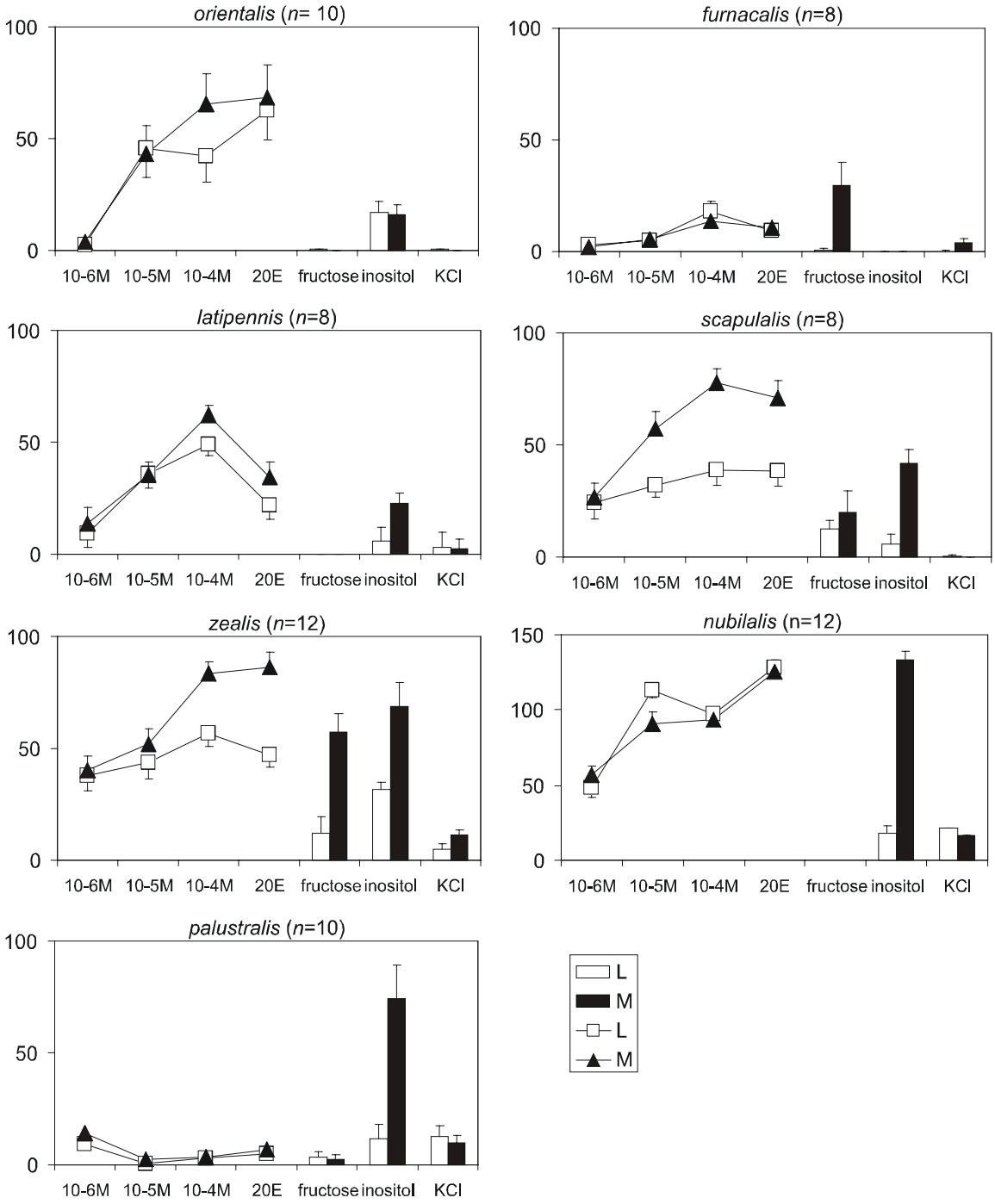


Figure 3-15 Réponses électrophysiologiques des sensilles gustatives de Pyrales japonaises aux différents stimuli

Les histogrammes représentent la moyenne des potentiels d'action (+sem) obtenus en réponse aux différents stimuli. Les courbes regroupent les réponses à des doses croissantes de 20E (10^{-6} M à 10^{-3} M). Sur la colonne de gauche sont regroupés les résultats obtenus avec les espèces oligophages ; sur la colonne de droite, les espèces polyphages.

3.3.3.2 Réponses à la 20E

Une forte réponse a été enregistrée dans les cas de trois espèces de Pyrale japonaises, *O. zealis, O. orientalis*, et *scapulalis*. Les seuils de sensibilité étaient très

bas mais différents d'un insecte à un autre. C'est à dire, *O. zealis* et *scapulalis*, percevaient la 20E 10^{-6}M d'une manière comparable à *O. nubilalis*, au niveau des deux sensilles latérales et médiales. Chez *O. orientalis*, le seuil de détection était décalé à 10^{-5}M.

Dans le cas des larves d*'O. zealis*, pour des concentrations de 10^{-4}M et 10^{-3}M, nous avions observé une stabilisation du nombre de potentiels d'action (plateau de réponses), alors que dans le cas d*'O. scapulalis* et *O. nubilalis*, le nombre de potentiels d'action est quasi linéaire à partir de 20E 10^{-6}M et subit une chute au-delà de 10^{-4}M. Ce phénomène suggère que les neurones s'adaptent au stimulus. Si l'on avait respecté, un intervalle de repos plus long (entre deux stimulations), ce phénomène adaptatif aurait probablement disparu donnant un type de réponse semblable à celui obtenu chez *O. orientalis*.

Par rapport aux larves d*'O. latipennis*, elles semblaient percevoir la 20E et l'inositol d'une façon moins marquée qu'*O. orientalis* et *zealis*. Les sensilles médiales et latérales d*'O. latipennis* étaient très stimulées par la 20E 10^{-4}M, alors qu'à 10^{-3}M, elles l'étaient moins. Ce qui suggère que chez cet insecte le temps de repos de la sensille dusse être prolongé.

Qu'en est-il de la perception de la 20E chez O. *furnacalis* et *palustralis ?* Chez ces deux espèces, la sensille médiale, était plus sensible que la sensille latérale. Cependant, cette sensille montrait une faible sensibilité vis à vis de la 20E. Les seuils de détection étaient en fait les seuils de détection du soluté KCl 10^{-3}M. D'autre part, les larves d*'Ostrinia furnacalis* d'origine chinoise ne possédaient pas le même profil de la sensibilité vis à vis de la 20E que les larves d'origine japonaise (voir Figure 3-16).

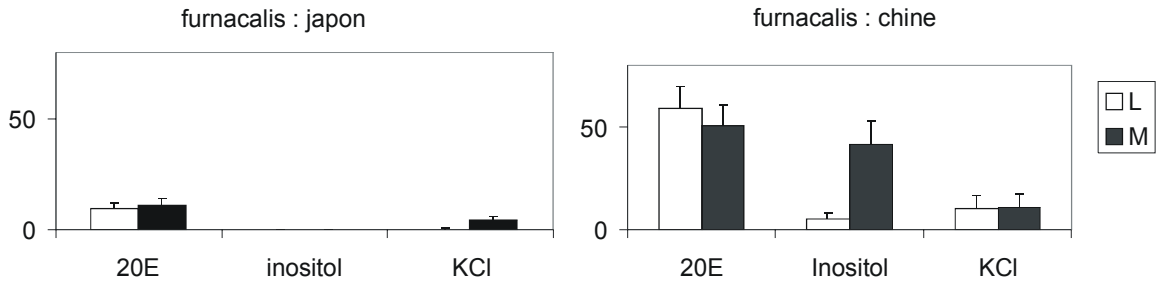


Figure 3-16 Réponses obtenues sur des larves d'*Ostrinia furnacalis* de chine et du japon

Dans le premier graphique, les histogrammes représentent l'intensité de la réponse après la stimulation par le KCl 10^{-3}M (*n* = 10), l'inositol (*n* = 12) et la 20E 10^{-3}M (*n* = 13) pour *O. furnacalis* japonaise. Dans le deuxième graphique les histogrammes représentent l'intensité de la réponse après la stimulation par le KCl 10^{-3}M (*n* = 5), l'inositol (*n* = 6) et la 20E 10^{-3}M (*n* = 6) pour *O. furnacalis* chinoise.

3.3.3.3 Réponse des palpes maxillaires vis à vis de la 20E

Nous avons essayé également d'enregistrer l'activité des neurones gustatifs présents sur les palpes maxillaires, chez cinq espèces d'*Ostrinia* : *nubilalis, palustralis, latipennis, zealis, zaguliaevi.* Nous avions réussi à mesurer l'activité nerveuse lors du contact avec le stimulus sans pouvoir conduire une série de tests à cause de la difficulté de pouvoir enregistrer sur ce type de chimiorécepteurs déjà rencontrées par beaucoup d'auteurs car leur taille est trop réduite (Glendinning *et al.*, 1998). Les observations qui suivent sont donc limitées. Ce travail permet de souligner l'importance des sensilles du palpe maxillaire et montre que la sensibilité gustative varie dans le genre *Ostrinia* en fonction du type de sensille et de l'espèce. Ces données sont présentées dans le Tableau 3-4 et la Figure 3-17.

Les larves d*'O. latipennis* perçoivent la 20E à 10^{-5}M et la makistérone A 10^{-5}M, au niveau des sensilles des palpes maxillaires, tandis qu'elles ne pouvaient pas détecter la 20E au niveau des sensilles styloconiques médiales et latérales. De son côté *O. zealis* détecte la 20E et le mélange 20E+azadirachtine sur les deux sensilles latérales et médiales (voir Tableau 3-4). Les sensilles du palpe maxillaire d*'O. zaguliaevi* détectent faiblement l'azadirachtine 10^{-5}M (15 PA/s) et le mélange azadirachtine+20E 10^{-5}M (40 PA/s), tandis que le KCl activait aussi un ou des neurones dans les palpes maxillaires (40 PA/s) ainsi que la pinnatastérone 10^{-5}M (35 PA/s). Chez *O. latipennis*, les palpes maxillaires détectent la 20E et le mélange 20E+azadirachtine 10^{-5}M, ainsi que les sensilles médiales et latérales (Figure 3-17).

Tableau 3-4 Tableau récapitulatif des réponses observées chez trois espèces d'*Ostrinia* : *O. nubilalis* (polyphage), *O. scapulalis* (polyphage) et *O. zealis* (monophage). L=sensille latérale, M=sensille médiale, X=palpe maxillaire.

Produit	Type de sensille	*O. nubilalis*	*O. scapulalis*	*O. zealis*	Commentaires

20E 10^{-3}M	L	+++	++	++	La sensille latérale est excitée par la 20E chez les trois espèces
	M	+++	++	+++	Perception de la 20E élevée chez les deux espèces mono et oligophage
	X	+++		+++	Même le palpe maxillaire est très stimulé par la 20E.
Azadirachtine 10^{-3}M	L	_	_	_	Les trois espèces sont indifférentes à cet antiappétent.
	M	+++		_	Détecté par le polyphage *nubilalis* mais pas chez le monophage *zealis*
	X	+		_	Le palpe maxillaire semble moins sensible que la sensille médiale.
inositol 10^{-3}M	L	_	_	+	Latérale peu sensible seulement dans le cas de zealis.
	M	+++	++	++	*Ostrinia nubilalis* plus sensible à ce sucre que les autres espèces..
	X				Pas de données.
Fructose 10^{-3}M	L	+	_	_	Fructose peu ou pas actif sur la sensille latérale des trois espèces.

	M	++	++	+	Une activité de ce sucre apparaît chez les trois sensilles médiales.
	X				Pas de données.

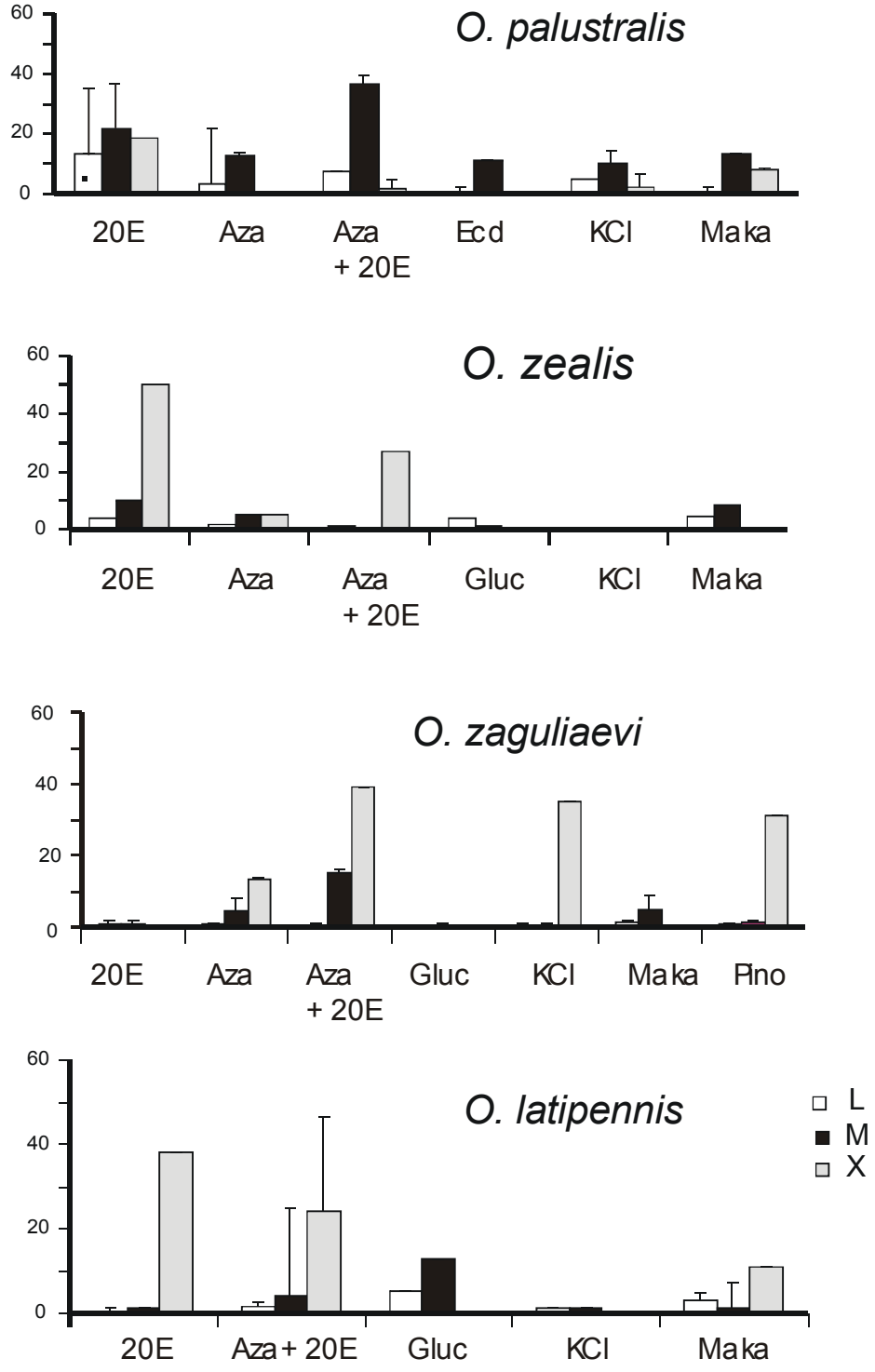


Figure 3-17. Réponses des sensilles du palpe maxillaire chez *O. palustralis, zealis, zaguliaevi, latipennis*

Les histogrammes représentent l'intensité des réponses (moyenne ± erreur standard) à différents stimuli chez 4 espèces. Trois larves de chaque espèce ont été testées. Abscisses : L=sensille latérale, M=sensille médiale et X=palpes maxillaires. ECD= ecdysone, MAKA= Makistérone A, PINO= pinnatastérone, AZA = azadirachtine. Ordonnées: réponse nerveuse (PA/s).

3.3.4 Discussion

Dans ce travail, nous avons évalué la sensibilité de deux sensilles styloconiques gustatives chez des espèces proches du genre *Ostrinia*. La réponse de ces sensilles à un petit nombre de composés stimulants (un sel, deux sucres – l'inositol et le fructose – et un composé antiappétent, la 20E) a été mesurée électrophysiologiquement chez des larves de cinquième stade, prélevées dans la nature et maintenues sur milieu artificiel pendant quelques semaines. Nous voulions, par ce protocole, tester l'hypothèse selon laquelle des espèces de lépidoptères polyphages présenteraient une sensibilité plus faible aux antiappétents que des lépidoptères oligophages (Bernays et Chapman, 1994; Bernays et Chapman, 2000; Bernays *et al.*, 2000; Bernays, 2001). Une deuxième hypothèse, un peu similaire, avait été avancée par Blackford (1995), qui proposait que la sensibilité physiologique et comportementale aux ecdystéroïdes soit liée au régime alimentaire.

Dans cette perspective, on pouvait s'attendre à ce que le protocole mis en place démontre que les espèces réputées polyphages (*O. nubilalis, O. scapulalis* et *O. furnacalis*) soient peu sensibles à la 20E. De la même manière, on pouvait s'attendre à ce que, inversement, les espèces oligophages (*O. orientalis, O. latipennis, O. zealis* et *O. palustralis*) soient très sensibles aux ecdystéroïdes. Cette sensibilité devrait se manifester au niveau des sensilles gustatives médiale et latérale, compte tenu de leur importance dans la sélection d'une plante-hôte et dans l'alimentation (de Boer *et al.*, 1992; de Boer, 1993; Peterson *et al.*, 1993). Les résultats obtenus contredisent ces prédictions. Ainsi les espèces polyphages *Ostrinia nubilalis* et *scapulalis* présentent une forte réponse à la 20E. Inversement, deux espèces oligophages, *O. latipennis* et *palustralis* répondent faiblement à la 20E. Le régime alimentaire n'a donc aucune valeur prédictive par rapport à la sensibilité gustative à la 20E.

Quelle est la validité de ces résultats ? En ce qui concerne le test des hypothèses décrites ci-dessus, la 20E pourrait représenter un contre-exemple. Il faudrait naturellement évaluer d'autres substances antiappétentes ou bien d'autres ecdystéroïdes pour distinguer si la 20E a un statut particulier parmi les substances antiappétentes ou bien si réellement ces deux hypothèses ne sont pas fondées. Les données que nous avons collectées avec l'azadirachtine vont cependant bien dans le

sens du rejet de la première hypothèse puisque *O. nubilalis* (polyphage) y est très sensible (Tableau 3-4 et dernier chapitre de cette thèse), tandis que *O. palustralis, zealis,* et *zaguliaevi* (espèces oligophages) y sont peu sensibles (Figure 3-17 et Tableau 3-4).

Ces observations sont basées sur l'enregistrement des sensilles médiale et latérale qui sont les plus accessibles électrophysiologiquement. Les larves de lépidoptères possèdent d'autres sensilles gustatives, d'une part sur les palpes maxillaires, d'autre part sous le clypeus et dans la cavité préorale. Ces sensilles gustatives possèdent également des récepteurs aux anti-appétants (de Boer *et al.*, 1977; Asaoka et Shibuya, 1995; Asaoka, 1996; Glendinning *et al.*, 1999), bien que les auteurs qui aient effectué ces observations rapportent que la sensibilité de ces récepteurs est redondante (en d'autres termes, l'échantillonnage des deux sensilles médiale et latérale est souvent suffisant). Nous avons voulu essayer d'enregistrer l'activité nerveuse des sensilles gustatives des palpes maxillaires en coiffant cet organe avec une électrode d'enregistrement. Dans ces conditions, il est impossible de distinguer quels sont les récepteurs impliqués, mais la présence de potentiels d'action démontre indubitablement qu'il existe une réponse nerveuse. C'est le cas pour *O. nubilalis* qui présente une réponse forte à la 20E dans une de ces sensilles. C'est aussi le cas pour *O. zealis, zaguliaevi* et *latipennis* qui répondent assez fortement à la 20E et (ou) à l'azadirachtine (Figure 3-15). Ces observations nuancent bien sûr les précédentes car elles montrent que l'étude des seules sensilles médiale et latérale ne suffit pas à caractériser totalement le spectre de sensibilité des récepteurs gustatifs d'une chenille. Cependant, ces observations n'infirment pas le rejet de l'hypothèse d'un lien entre le régime alimentaire et la sensibilité des récepteurs gustatifs aux antiappétents.

Il n'en reste pas moins que la démonstration d'un lien entre la sensibilité aux antiappétents et le régime alimentaire n'est pas complète car (1) la totalité de l'équipement sensoriel gustatif de ces larves n'a pas été évaluée et (2) leur comportement de choix alimentaire face aux ecdystéroïdes n'est pas connu. Seules des observations comportementales seront en mesure de confirmer ces propositions. Nous n'avons pas pu les réaliser au laboratoire pour des raisons de temps et de disponibilité de matériel. Ce travail est sur le point d'être repris par notre collègue japonais, le professeur Y. Ishikawa, qui souhaite compléter ces observations au Japon

en 2003. Si l'on se réfère aux résultats publiés sur ce sujet, on devrait s'attendre à ce que les différences s'expriment principalement au niveau comportemental et non au niveau électrophysiologique (Bernays et Chapman, 2000; Bernays *et al.*, 2000). Ces observations ont conduit Elisabeth Bernays à proposer que les différences de sensibilité étaient probablement dues à une structuration différente du système nerveux central (Bernays et Chapman, 2000).

Ces observations électrophysiologiques présentent également un intérêt dans une perspective phylogénétique. En effet, on peut s'attendre à ce que des espèces proches présentent des spectres de sensibilité proches, tandis que des espèces lointaines pourraient manifester des spectres très différents. Le protocole que nous avons mis en place ne permet pas de tester rigoureusement une telle hypothèse car il aurait fallu élargir le type de composés évalués à des composés présents dans les plantes-hôtes et mieux préciser la gamme de concentrations auxquels les récepteurs sont sensibles. Une telle approche a été employée avec succès sur quelques espèces de lépidoptères, en particulier des lépidoptères du genre *Yponomeuta* dont le choix d'une plante-hôte semble directement lié à la détection d'un sucre spécifique, le dulcitol (van Drongelen, 1979; Roessingh *et al.*, 1999). Cependant, ces observations si elles s'appliquent aux larves, ne semblent pas valides pour les adultes de ces mêmes espèces (Roessingh *et al.*, 2000).

D'après la relation phylogénétique qui lie ces différentes espèces sur l'arbre phylogénétique (Figure 3-14), nous nous attendions à ce que *O. nubilalis* ait une sensibilité proche d*'O. orientalis*. En effet, toutes les deux montrent une sensibilité mais elle est beaucoup plus marquée du côté d*'O. nubilalis* que du côté *O. orientalis*. Cependant, ces deux espèces possèdent des régimes alimentaires très différents (ex : *O. orientalis* ne s'alimente pas sur le maïs). Un phénomène semblable apparaît dans le cas de *O. latipennis* et *O. palustralis*. Le régime alimentaire ne semble donc pas déterminé principalement par la sensibilité gustative périphérique, au moins en considérant les composés que nous avons testés dans ce travail.

Les résultats les plus curieux que nous ayons obtenus concernent les différences de sensibilité observées entre chenilles de la même espèce, *O. furnacalis*, prélevées au Japon et en Chine. Les différences observées sont quantitatives et qualitatives. Sur le plan quantitatif, l'activité globale des sensilles en réponse aux trois produits (KCl,

inositol et 20E) est plus importante chez les pyrales originaires de Chine. Sur le plan qualitatif, le spectre de réponse est différent ce qui est manifeste dans la détection du myo-inositol, forte dans les sensilles médiales de la souche chinoise et faible dans la souche japonaise. Il nous semble impossible d'aller plus loin que la simple constatation que les différences observées correspondent à un phénomène réel sur le plan expérimental. Il faudrait bien sûr approfondir la question en vérifiant qu'il s'agit réellement de pyrales de la même espèce, que leurs conditions d'élevage et de prélèvement étaient identiques et élargir la gamme de composés testés. Si la différence que nous avons observée était avérée, il serait intéressant d'évaluer ensuite les conséquences que peuvent représenter un tel changement de sensibilité sur le choix des plantes-hôtes en milieu naturel.

La question de la polyphagie et de la sensibilité aux phytoecdystéroïdes et aux antiappétents n'est donc pas aussi évidente que nous l'avions considéré initialement. Le choix de ce groupe d'espèces a permis de mettre en lumière l'importance des variations liées à l'espèce plutôt qu'au régime alimentaire. Les organes sensoriels chez les larves du genre *Ostrinia* très proches morphologiquement expriment des sensibilités différentes, ce qui est visible même avec un petit nombre de composés. Apparemment, les capacités de détecter de la 20E sont présentes chez la plupart des espèces d'*Ostrinia* soit dans les sensilles latérales et médiales soit dans les sensilles gustatives du palpe maxillaire. Ces observations ne permettent cependant pas de dire s'il s'agit du même gène qui est responsable de la sensibilité gustative aux ecdystéroïdes, ni si la détection des phytoecdystéroïdes a un effet antiappétent chez toutes les espèces. Ce travail devrait donc être complété par d'autres approches expérimentales.

4 MODULATION DE LA PERCEPTION

Les insectes, comme tous les arthropodes, possèdent un squelette externe rigide qui les oblige à avoir une croissance discontinue. Pour pouvoir grandir, l'insecte doit détruire régulièrement ce squelette pour en fabriquer un plus grand : c'est le phénomène de la mue. Il correspond à un bouleversement de la physiologie de l'animal et à une période de grande fragilité. Ce phénomène est en grande partie gouverné par un système hormonal faisant intervenir, entre autres, des hormones stéroïdes appelées ecdystéroïdes. La mue est un phénomène complexe, où l'hormone de mue pourrait affecter les récepteurs gustatifs comme les autres récepteurs. La 20E induit des mues surnuméraires lorsqu'elle est injectée dans les larves de Lépidoptères, comme chez le ver à soie, *Bombyx mori* (Tanaka et Takeda, 1993). En observant que les larves de Lépidoptères s'arrêtent de s'alimenter avant la mue, phénomène induit par la liaison entre la 20E avec des récepteurs nucléaires spécifiques, et que le pic de 20E circulant dans l'hémolymphe coïncide avec une entrée des larves dans la phase de déplacement (wandering phase), nous nous sommes posé deux questions :

1- Est-ce que les récepteurs gustatifs perdent leur sensibilité lors de la phase de déplacement (avant la mue), c'est à dire lorsqu'il y a une élévation de 20E circulante ?

2- Est-ce qu'une exposition prolongée à la 20E modifie la physiologie des sensilles ?

Aucune donnée dans la littérature ne permet de répondre directement à ces questions, bien qu'un certain nombre de travaux suggèrent que la sensibilité des récepteurs gustatifs varie en fonction de l'âge (Schoonhoven, 1967), de la nature du régime alimentaire (Städler et Hanson, 1978) et des expériences alimentaires antérieures (Renwick et Lopez, 1999; del Campo *et al.*, 2001). La sensibilité des récepteurs est modulable à court terme par le rythme circadien, l'état de satiété et les hormones circulantes (Blaney *et al.*, 1986; Bernays et Chapman, 1994). Il semble

donc raisonnable de s'attendre à une variation de la sensibilité des récepteurs gustatifs, soit en fonction de l'état hormonal de l'insecte, soit en fonction de l'exposition des animaux à une alimentation contenant des ecdystéroïdes.

Nous proposons d'analyser des modifications de la sensibilité par deux démarches conduites en parallèle : électrophysiologique en mesurant la réponse des récepteurs gustatifs à une série de stimuli standard et comportemental en observant les capacités de discrimination de larves auxquelles on aura proposé un choix entre un substrat traité ou non. Nous avons entrepris les démarches suivantes :

1- Si le pic de 20E modifie la détection gustative, on devrait pouvoir observer une modification de l'activité à la suite d'une injection de 20E. Ces modifications des capacités de détection devraient être (1) dépendantes de la dose de 20E et (2) spécifiques de la 20E.

2- Exposer une sensille à une solution de 20E et comparer son activité avec celle d'une sensille non traitée sur le même insecte.

3- Observer l'évolution de la sensibilité des récepteurs gustatifs au cours du dernier stade larvaire, en particulier au moment du pic d'ecdystéroïdes circulants.

4.1 *Est-ce qu'un pic d'ecdystéroïdes module la sensibilité gustative ?*

4.1.1 Introduction

Nous avons supposé que la 20E circulante avait un effet direct sur la régulation de la mue et sur la sensibilité des récepteurs gustatifs. Une des manières de vérifier cette hypothèse est d'injecter directement de la 20E dans la cavité générale. C'est une approche qui a été utilisée très tôt dans l'étude de la physiologie des ecdystéroïdes sur de nombreux insectes ou arthropodes et que l'on continue d'utiliser par exemple pour évaluer l'effet d'analogues d'hormones (Kubo *et al.*, 1983; Linn *et al.*, 1994; Smagghe *et al.*, 1999).

Comment observer la modification de la perception gustative ? Pour y répondre, nous avons étudié si les chenilles percevaient toujours la 20E comme un antiappétent grâce à des tests de comportement alimentaire. Si la 20E perturbe le fonctionnement des récepteurs gustatifs, les larves devraient perdre leur capacité à détecter la présence d'un antiappétent ou s'arrêter de s'alimenter si le produit injecté est toxique.

Nous avons également essayé d'enregistrer l'activité nerveuse chez les larves injectées, mais les résultats obtenus n'ont pas été concluants. Les larves n'étaient pas en aussi bon état pour conduire un travail d'enregistrement à terme surtout qu'on obtenait des enregistrements avec des signaux très bruités. Nous ne savons pas si cette difficulté est causée par un dysfonctionnement de l'amplificateur ou à la préparation des larves et l'expérience elle-même. Nous nous limiterons donc à présenter la modulation de la perception par l'injection de la 20E au niveau comportemental.

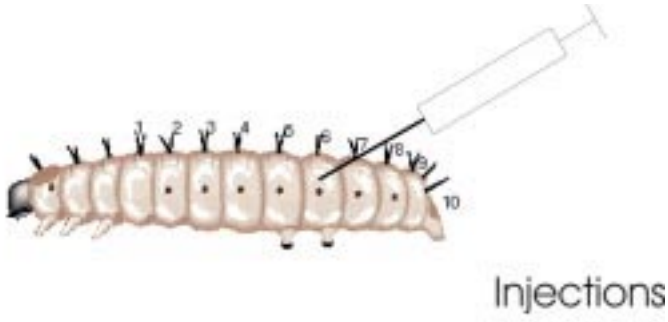


Figure 4-1 Injection de 20E dans l'hémolymphe

4.1.2 Matériels et méthodes

4.1.2.1 Matériel biologique

Cette étude a été réalisée sur des larves de pyrale du maïs au stade L5. Les larves provenaient de l'élevage conduit à l'INRA du Magneraud, à l'exception de quelques-unes que nous avons élevées au laboratoire. Les larves étaient entreposées dans des boîtes contenant du milieu nutritif artificiel (voir composition annexe II). Nous avons utilisé deux lots de larves : des larves jeunes (< 6 heures) (*i.e.* âgées de quelques heures pour avoir des larves de stade homogène) et des larves L5 plus âgées (> 3 jours). Deux classes d'âges ont été choisies pour limiter l'effet du facteur âge qui s'est révélé très significatif dans l'évaluation de la perception sensorielle gustative chez les chenilles au cours du chapitre précédent.

4.1.2.2 Injections

Nous avons constitué deux groupes témoins. Un premier a été traité avec 1 µl de sérum physiologique (n = 15), le deuxième avec de l'inositol (n = 15). Le premier groupe est destiné à évaluer l'effet de la procédure opératoire. Le deuxième groupe est destiné à tester si un produit très stimulant sur un des neurones gustatifs étudiés, pouvait modifier la détection d'un antiappétent (la 20E).

Plusieurs lots de larves ont été traités avec de la 20E ou de l'inositol, à différentes concentrations (10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} et 10^{-2}M dans du sérum physiologique). Deux répétitions de 30 larves chacune ont été utilisées pour chaque concentration de 20E injectée et une série de 15 larves par dose d'inositol injectée. Nous avons effectué des injections de 1 µl. Ces injections étaient appliquées au niveau de la troisième fausse patte de la larve à l'aide d'une seringue micro-volumétrique lavée préalablement à l'acétone puis rincée à l'eau pure. Les larves étaient ensuite placées dans des boîtes et mises à jeûner pendant 24 heures.

4.1.2.3 Test de comportements alimentaires

Nous avons effectué des tests comportementaux similaires à ceux décrits dans le premier chapitre de notre thèse, en remplaçant le maïs par des cylindres de milieu artificiel. Chaque larve était placée dans une boîte de Pétri en présence de deux sections de milieu nutritif, l'un ayant reçu 10 µl d'éthanol, l'autre étant traité avec

10 µl de 20E dilué dans l'éthanol à une concentration de 1 µg / µl. Les sections de milieu étaient obtenues en coulant du milieu au fond d'une boîte et en prélevant des rondelles avec un emporte pièce. Cette technique permet de constituer des rondelles assez homogènes (moyenne : 170,5 mg, écart type : 20,6 soit $\sigma/\mu = 0,1$ sur 20 observations). Les observations étaient faites 24 h après avoir placé les larves dans l'obscurité, en notant les pastilles présentant des encoches. Ces observations permettent de compter le nombre de chenilles ayant consommé un côté (traité ou non-traité), ayant consommé les deux (contrôle + traité) ou bien n'ayant pas consommé.

4.1.3 Résultats

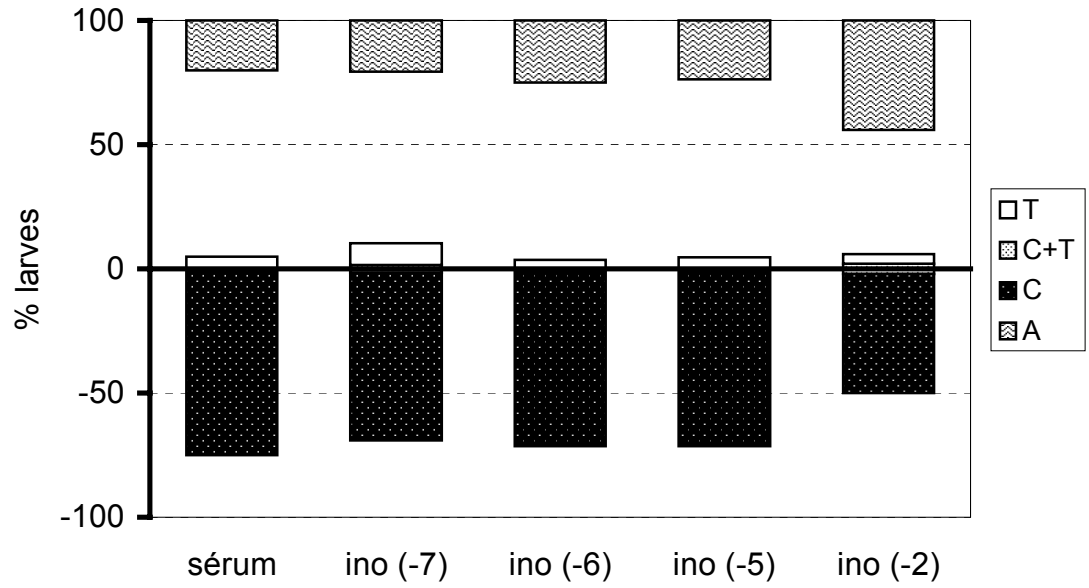


Figure 4-2 Choix alimentaires effectués par des chenilles traitées avec du sérum ou de l'inositol

Les chenilles ont subi une injection de 1 µl de sérum physiologique (sérum ; *n* = 15) ou d'inositol (ino) 10^{-7} M (*n* = 15), 10^{-6} (*n* = 45), 10^{-5} (*n* = 15) et 10^{-2} (*n* = 15). Leurs choix alimentaires ont été notés 24 h après ce traitement. Les barres représentent le pourcentage moyen de larves ayant mordu le substrat traité (T), non traité (C), les deux (C+T) ou n'ayant rien consommé (A).

4.1.3.1 Comportements des larves témoins (Figure 4-2)

Lorsque les larves jeunes étaient traitées avec du sérum physiologique, la majorité d'entre elles détectaient la 20E et choisissaient de s'alimenter sur le contrôle (75 %). L'injection d'inositol avec les doses de 10^{-7}, 10^{-6} et 10^{-5}M ne perturbe pas le

comportement alimentaire. A 10^{-2}M, les larves continuent à détecter la présence de 20E, mais 35 % d'entre elles n'ont pas consommé.

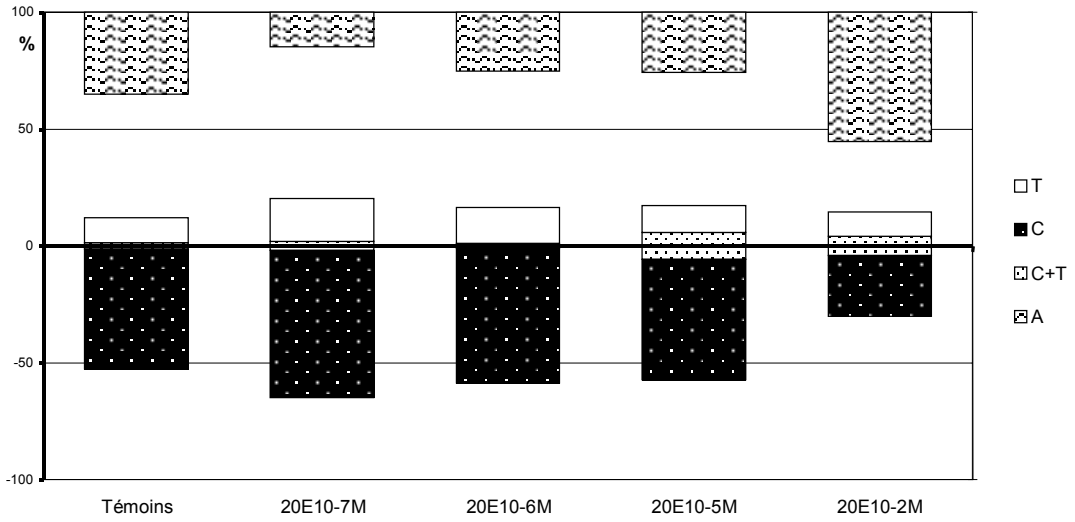


Figure 4-3 Comportement alimentaire des larves jeunes (< 6 heures) traitées à la 20E

Ces chenilles ont subi une injection de 20E à 10^{-7}, 10-6, 10^{-5} et 10^{-2} M (*n* = 45 pour chaque série). Mêmes conventions que dans la Figure 4-2.

4.1.3.2 Injection de la 20E sur des larves jeunes (< 6 heures) (Figure 4-3)

Comme chez les témoins, la majorité des larves s'alimente sur le milieu contrôle. Le pourcentage de larves s'alimentant sur le milieu traité ou sur les deux milieux est faible (5 à 10 %). Par contre, lorsque les larves sont traitées avec une solution de 20E à 10^{-2}M, la proportion de larves ne s'alimentant pas augmente à 50 % contre 25 % s'alimentant sur le milieu non traité.

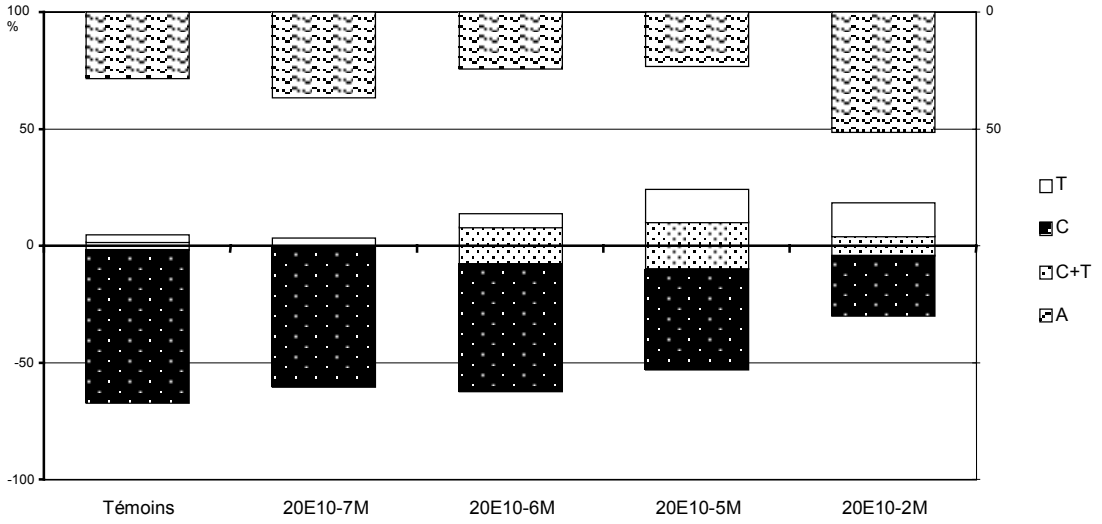


Figure 4-4 Comportement alimentaire des larves plus âgées (> 3 jours) traitées à la 20E

Ces chenilles ont subi une injection de 20E à 10^{-7}, 10-6, 10^{-5} et 10^{-2} M (*n* = 45 pour chaque série). Mêmes conventions que précédemment.

4.1.3.3 Injection de 20E sur des larves plus âgées (>3jours) (Figure 4-4)

La proportion de larves s'alimentant sur le milieu non traité décroît parallèlement avec les doses de 20E. La proportion de larves s'alimentant sur le milieu traité (T : 15 %) ou sur les deux milieux (C+T : < 20 %) reste faible. En revanche, la proportion de larves ne s'alimentant pas est relativement constante (entre 25 et 30 %) pour les doses inférieures à 10^{-2} M. Pour cette dernière concentration, cette proportion est très élevée (55 %) alors que la proportion de larves s'alimentant sur le milieu non traité chute à 25 %.

Il n'y a pas de différences significatives entre les larves âgées de moins de 6 heures et celles âgées de plus de 3 jours dans leur comportement alimentaire après une injection de 20E 10^{-2} M (test de t, $p < 0,05$). Les résultats des larves âgées et ayant récemment mué sont donc comparables : la 20E présente un effet antiappétent sur les témoins, les larves injectées avec de la 20E perdent leur appétit, d'autant plus que la dose est forte. Ceci se manifeste très clairement pour les larves injectées avec de la 20E à 10^{-2} M. Cependant, il est à noter que les témoins eux-mêmes présentent une proportion non négligeable de larves ne s'alimentant pas.

4.1.4 Discussion

4.1.4.1 Tests comportementaux

Que représentent les données que nous avons réunies en observant le comportement des chenilles ? Les tests réalisés ne mesurent pas la quantité d'aliment ingéré mais évaluent qualitativement si un milieu alimentaire est consommé ou non. Si l'on fait l'hypothèse que les chenilles ont un comportement relativement sédentaire, c'est à dire que lorsqu'elles ont choisi un substrat elles y restent pour s'abriter et manger, le problème se pose lorsque les chenilles ont consommé à la fois du milieu traité et non traité. Nous avons considéré implicitement qu'elles ont consommé des deux côtés de manière égale et que le choix « final » n'a pas plus de poids que ce qui a précédé. En outre, on ne tient compte que des morsures visibles. A ces approximations près, ce test est simple à réaliser et rapide à évaluer et il est bien adapté à notre propos qui n'est pas de mesurer la quantité ingérée, mais de détecter des changements de comportement alimentaire d'origine sensorielle.

Dans cet essai, nous avons pu montrer que le comportement alimentaire des larves jeunes ou âgées est affecté par des injections fortes de 20E (1 µl 10^{-2}M). Un plus grand nombre de larves s'alimentaient sur le milieu traité à la 20E, comme si ces larves ne pouvaient plus différencier entre les deux substrats. En outre, un plus grand nombre cessaient de s'alimenter (pas de morsures visibles) et elles se déplaçaient peu comme si elles avaient perdu leur activité ambulatoire et qu'elles étaient intoxiquées.

L'injection de sérum physiologique n'a aucun effet sur le comportement alimentaire puisque 75 % des larves injectées avec du sérum, s'alimentent sur le milieu non traité et évitaient le côté traité. Ces chenilles percevaient donc la 20E comme antiappétent. Nous ne savons pas comment expliquer le fait que dans cette expérience, beaucoup de larves, même chez les témoins, ne se soient pas alimentées. Ce phénomène ne peut être dû à la composition du milieu nutritif, parce que toutes les expérimentations étaient faites sur ce milieu et ce qui n'interférait pas apparemment pas avec l'effet antiappétent de la 20E.

4.1.4.2 L'effet de la 20E par injection est-il spécifique ?

Non, l'injection de la 20E n'est pas spécifique. Il ne semble pas y avoir de relation entre une injection de 20E et les capacités de détection. L'injection de la 20E à 10^{-5}M et 10^{-6}M n'entraîne pas une perturbation de la physiologie des récepteurs gustatifs et par conséquent une diminution reproductible de la sensibilité des larves puisqu'elles continuent de consommer le milieu traité.

Par contre, l'injection de 1 µl de 20E 10^{-2}M semble inhiber le comportement d'alimentation. Mais cette injection ne reproduit pas les effets comportementaux observés avant la mue. Les récepteurs restent fonctionnels puisque les larves restent capables de discriminer un substrat alimentaire traité. On n'a pas remarqué un effet dose-dépendant des injections chez les larves jeunes âgées de 6 heures, alors qu'un effet dose-dépendant semble se dessiner chez les larves âgées plus de 3 jours.

4.1.4.3 Devenir de la 20E injectée ?

Nous avons utilisé des quantités physiologiques de 20E (10^{-6} M et 10^{-5}M). Nous ne contrôlons pas la quantité de 20E qui parvient effectivement aux sensilles car les injections sont réalisées dans la cavité générale (niveau de la troisième fausse patte). Nous ne savons pas si une partie de la dose injectée passe dans le tube digestif et est détoxiquée. En effet, il a été montré que la Pyrale du maïs est capable de détoxiquer la 20E circulante dans l'hémolymphe (DEA Simon Moyal, 1999). Nous ne savons donc pas si la 20E injectée dans l'hémolymphe reste à une concentration constante dans l'hémolymphe et si le taux de 20E circulante est similaire à celui observé avant la mue. Obtenir des informations sur le devenir de la 20E supposerait d'analyser le contenu en ecdysone de l'hémolymphe et de comparer précisément ces mesures avec les taux d'ecdystéroïdes dans des chenilles en fin de stade.

Le système sensoriel périphérique n'est pas stable, ni indépendant de la physiologie de l'insecte. La 20E injectée à une dose de 10^{-2}M ne semble pas perturber la sensibilité des récepteurs gustatifs comme nous l'avons déjà signalé, mais elle affecte le comportement alimentaire des larves. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'injection de telle dose de 20E sur la sensibilité des récepteurs à d'autres stimuli alimentaires dans le futur. Il pourrait être également intéressant d'évaluer l'effet de l'hormone juvénile sur la sensibilité des récepteurs gustatifs, puisque cette hormone

est également nécessaire à la mue. Plusieurs travaux récents ont d'ailleurs montré que l'hormone juvénile pouvait directement moduler la sensibilité de neurones olfactifs centraux chez d'autres lépidoptères (Anton et Gadenne, 1999; Gadenne et Anton, 2000).

Nous ne possédons pas les données suffisantes pour trancher sur le rôle de la 20E dans la baisse de l'alimentation observée chez les larves d*'Ostrinia nubilalis*, ni sur la validité de l'hypothèse qui prétend qu'il existe un transport de matériel de l'hémolymphe vers le liquide dendritique des neurones (hypothèse de Hodgson, 1968; Angioy *et al.*, 1983). Nous n'avons pas pu mettre en évidence un transport de tel type qui permettrait aux phytoecdystéroïdes circulants dans l'hémolymphe d'atteindre des récepteurs spécifiques qui peuvent se trouver sur les cellules gustatives (ou sur les cellules accessoires) et d'envoyer un message spécial pour préparer la mue et orienter les insectes vers une phase de déplacement et d'arrêt d'alimentation.

Finalement, le protocole que nous avons mis au point permet d'obtenir des résultats intéressants pour les injections, mais il serait nécessaire de l'améliorer. Il faudrait utiliser une technique d'injection plus fine (avec une aiguille de très petit diamètre, etc.…) afin de pouvoir réaliser ces traitements de manière moins traumatique. Une telle évolution permettrait d'évaluer directement la sensibilité des récepteurs gustatifs à l'aide de techniques électrophysiologiques. Les résultats obtenus en effet suggèrent que la sensibilité des récepteurs n'est pas affectée, à l'exception des chenilles traitées par la dose la plus forte de 20E. A cette dose, on peut s'attendre à une baisse significative des réponses à la 20E mais probablement aussi à d'autres composés gustatifs. Cet effet à forte dose s'apparente plutôt à une intoxication qu'à une inhibition spécifique de la sensibilité de ces récepteurs.

4.2 Effet d'une exposition à la 20E sur les sensilles gustatives

4.2.1 Introduction

L'incidence des phytoecdystéroïdes sur les insectes comme celles des substances secondaires des plantes est généralement évaluée par leurs effets sur le développement et la mortalité des insectes qui en consomment. Cependant, avant même d'être ingérés, les sensilles gustatives auront été en contact prolongé avec ces substances. Une telle exposition à un milieu alimentaire contenant des substances secondaires est généralement considéré comme susceptible de moduler le choix alimentaire (Simpson *et al.*, 1991; Glendinning et Slansky, 1994; Glendinning *et al.*, 2001; Renwick, 2001) mais peu d'études se sont intéressées directement aux modifications qui peuvent affecter le fonctionnement des sensilles gustatives de ces insectes (del Campo *et al.*, 2001; Glendinning *et al.*, 2001).

Les cellules qui sont susceptibles d'être directement en contact avec les phytoecdystéroïdes sont celles qui bordent la cavité sensillaire, c'est à dire les cellules accessoires et les cellules nerveuses gustatives. Ces deux catégories de cellules sont d'origine épidermique et sont affectées par les pics d'hormones endogènes d'ecdystéroïdes. Ces hormones passent au travers des membranes lipidiques grâce à leurs propriétés amphilitiques, on peut supposer qu'elles puissent aussi bien agir de l'intérieur (dans l'hémolymphe) (Phillips et Van de Berg, 1976; Jachmann *et al.*, 1982), que de l'extérieur (dans la lymphe sensillaire).

Nous avons donc entrepris d'exposer une sensille gustative à des solutions de 20E afin d'évaluer si cette exposition pouvait affecter le fonctionnement des sensilles. Nous avons voulu évaluer si l'exposition prolongée d'une sensille à la 20E (1) affectait sa sensibilité sans affecter la sensibilité des autres sensilles et si (2) cette perturbation était spécifique à l'action de la 20E (et pas d'un autre stimulus). Il nous a semblé nécessaire de compléter ces observations électrophysiologiques par des observations comportementales, pour évaluer si cette exposition affectait le comportement alimentaire. Les expériences ont été menées sur des chenilles en début de stade L5 puisque nous avons montré que la perception sensorielle était meilleure à ce niveau du stade larvaire.

Nous avons testé l'effet de la 20E, de l'inositol et du KCl.



Figure 4-5 Exposition des sensilles gustatives à une solution de 20E

4.2.2 Matériels et méthodes

4.2.2.1 Larves de la pyrale du maïs

Les chenilles de pyrale du maïs utilisées étaient au stade L5. La plupart des larves provenaient de l'INRA le Magneraud, quelques-unes provenaient de notre propre élevage. Les larves étaient entreposées dans des boîtes contenant du milieu nutritif artificiel à une température de 23 °C 18h de jour et 6h de nuit (voir composition annexe II). Les larves destinées à notre expérience étaient prélevées dans ces boîtes, en choisissant des individus de stade L5 dont la capsule céphalique était encore incomplètement sclérotinisée, c'est à dire ayant mué quelques heures auparavant. Nous avons également utilisé des larves âgées de quelques jours.

4.2.2.2 Protocole d'exposition

Le protocole était une expérience exploratoire. Nous souhaitions étudier l'effet de l'hormone de mue, lorsqu'elle était en contact externe (artificiel) avec les récepteurs. Dans cette situation, on peut faire varier plusieurs paramètres à la fois : la durée d'exposition, et la répétition, la concentration du stimulus et la période d'observation. Après plusieurs tentatives d'exposition, nous avons mis au point un protocole qui nous permettait d'observer un effet au niveau du nombre de potentiels d'action émis par les sensilles styloconiques (baisse ou disparition de l'activité neuronale). Ce protocole consistait en deux étapes : la première est une étape d'exposition des sensilles et la seconde est une étape d'enregistrement des sensilles.

Pour bien exposer les sensilles et pouvoir les coiffer avec des électrodes contenant de la 20E, nous avons réalisé les opérations suivantes :

1. Les larves étaient immobilisées en les enrobant de Parafilm® étiré, tout en laissant leur capsule céphalique libre et leurs pièces buccales visibles. Nous avons utilisé des larves de 12 à 48 heures. Les larves étaient fixées sur le dos et placées sous loupe binoculaire afin de les exposer à une solution
2. Une des deux paires de sensilles styloconiques était alors coiffée avec un capillaire de verre pendant une durée de 20 min. Ce capillaire contenait du KCl 10^{-3}M, de l'inositol 10^{-3}M (n = 10) ou de la 20E 10^{-3}M (n = 19). Lors de tests préliminaires, nous avons exposé une seule sensille à la fois, mais par la suite, nous avons exposé les deux sensilles d'une même paire. La 20E (pure à 95 %) nous avait été gracieusement fournie par Juraj Harmatha (République Tchèque). Le KCl et l'inositol provenaient de chez Sigma Aldrich.
3. Chaque larve ayant subi une exposition était ensuite placée dans une boîte de Petri, sans enlever le Parafilm, pendant 24 h. Dans ces conditions, elles étaient maintenues immobiles et restaient à jeun.
4. Enfin, les larves étaient testées en électrophysiologie en utilisant les procédures décrites précédemment. Chaque sensille a été stimulée avec de la 20E 10^{-3}M et d'inositol 10^{-3}M. Nous avons noté les réponses de chaque individu en fonction de la présence de potentiels d'action, en plusieurs catégories décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau 4-1). Si les sensilles d'un insecte étaient inaccessibles à l'électrode d'enregistrement, l'individu était éliminé de la série.

Tableau 4-1 Critères utilisés pour caractériser les réponses électrophysiologiques.

Dans chaque ligne, figurent les réponses des sensilles traitées (latérales et médiales). (+) : indique si la sensille répond normalement à la 20E et à l'inositol. (–) indique que la sensille ne répond pas.

Sensilles traitées		Sensilles non traitées		Catégorie
Latérale	Médiale	Latérale	Médiale	
+	+			Sans effet
-	-			Inhibition sensilles traitées
+/-	-/+			Inhibition partielle
-	-	-	-	Inhibition totale

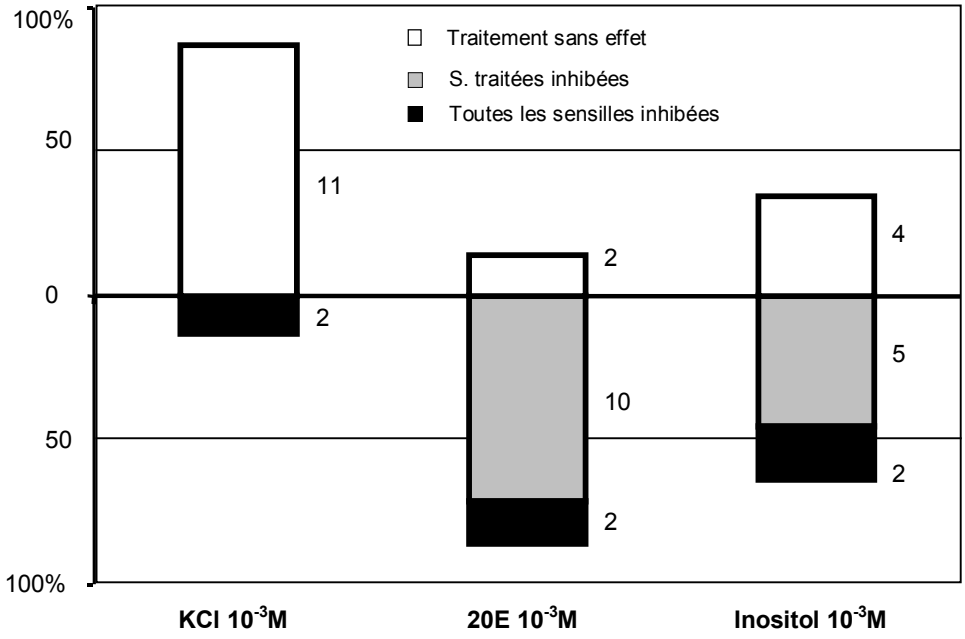


Figure 4-6 Incidence d'une exposition prolongée à un stimulus sur la sensibilité gustative

Une paire de sensilles a été exposée pendant 20 min à l'un des trois produits : 20E 10^{-3}M (*n* = 19), inositol 10^{-3}M (*n* = 10) et KCl 10^{-3}M (*n* = 15). Ce diagramme représente la fréquence des réponses observées, classées en trois catégories : (1) sensilles exposées affectées= pas de réponses nerveuses au niveau de la paire exposée ; (2) toutes les sensilles affectées = inhibition totale de la réponse nerveuse chez les deux paires de sensilles (exposées et témoins) (3) pas de changement.

4.2.2.3 Protocoles des tests de comportement alimentaires

Nous avons également essayé de pratiquer un test de comportement alimentaire sur des larves traitées comme pour le test électrophysiologique, en utilisant le

protocole de choix décrit précédemment. A l'issue du traitement (exposition d'une paire de sensilles pendant 20 min) et de la période d'incubation (24 h), chaque larve était placée sur un papier buvard humidifié disposé au fond d'une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre, contenant deux sections cylindriques de milieu artificiel (poids moyen 171 mg). Chaque section était traitée soit avec 2 × 5 µl d'éthanol absolu, soit avec 2 × 5 µl d'éthanol absolu contenant de la 20E (1 µg / µl), et laissées 15 min à l'air libre afin de laisser l'alcool s'évaporer. Comme dans les expérimentations précédentes, nous avons cherché à noter les capacités de discrimination en notant la présence de morsure sur les rondelles de milieu alimentaire.

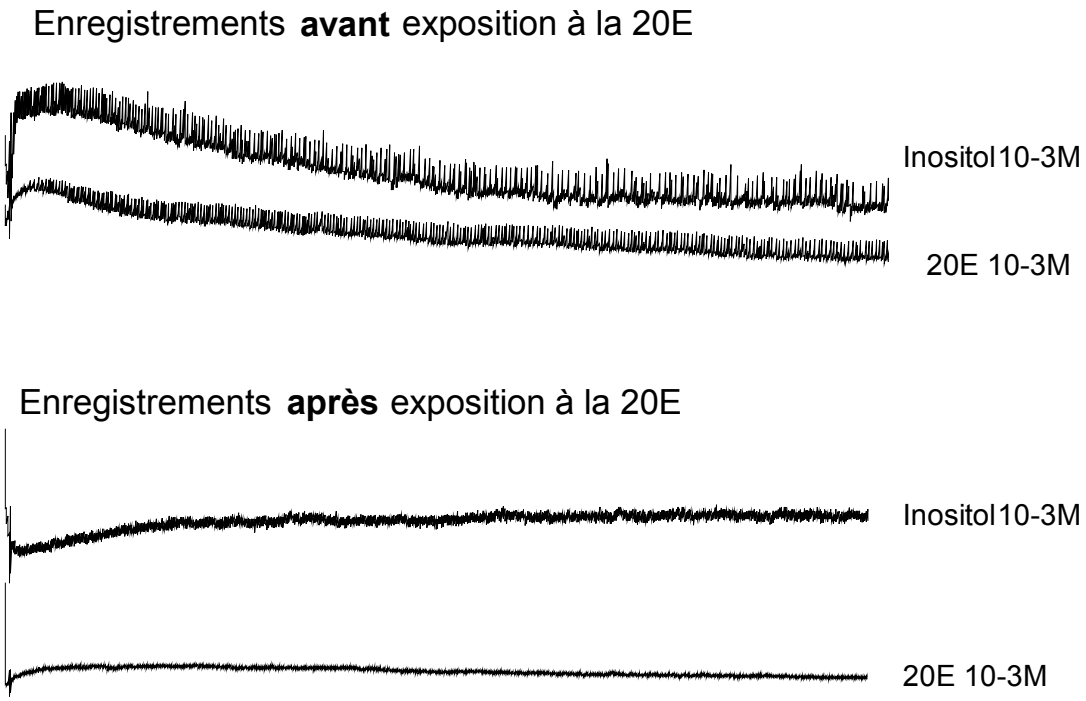


Figure 4-7 Exemples d'enregistrement obtenus après une exposition à la 20E

Exemples d'enregistrements obtenus (sur des insectes différents) avant et après exposition à de la 20E 10^{-3} M pendant 20 min.

4.2.3 Résultats

4.2.3.1 Effets sur le comportement alimentaire

Après exposition d'une paire de sensilles gustatives avec de la 20E, aucune larve ne s'est alimentée (n = 10). Après exposition avec du KCl à 10^{-3} M, aucune des larves ne s'est alimentée (n = 4 ; 2 étaient mortes après 24 heures). En l'absence d'exposition, mais en faisant subir aux larves le même traitement (n = 10), cinq larves

ne se sont pas alimentées, quatre ont foré dans le substrat non-traité et une a consommé un peu des deux substrats (traité et non-traité). Au vu de ces résultats, nous avons décidé de ne pas poursuivre ce protocole car nous avons considéré que la manipulation était trop traumatique pour les chenilles.

4.2.3.2 Effets sur la réponse sensillaire

Après exposition d'une paire de sensilles gustatives à une solution de KCl 10^{-3} M (*n* = 15 insectes), l'activité des cellules gustatives ne semble pas être modifiée aussi bien dans les sensilles traitées que dans les sensilles non-traitées (Figure 4-6). Dans cette expérience, onze individus présentaient une réponse normale 24 h après le traitement et deux avaient des sensilles inactives. Deux larves ont été écartées de la série car leurs sensilles étaient inaccessibles. Par « réponses normales », nous entendons une réponse égale ou supérieure à 80 PA/s. Cette valeur correspond à ce que nous avons pu observer précédemment sur un lot de 40 chenilles non traitées.

Après une exposition prolongée à la 20E 10^{-3}M (*n* = 19 insectes), une majorité de neurones gustatifs ne répond ni à la 20E ni à l'inositol (Figure 4-7). Cette inactivation est soit ipsilatérale (*n* = 2) soit bilatérale (*n* = 10) (Figure 4-6). Ce traitement n'affecte cependant pas tous les animaux car un petit nombre présente des réponses normales (*n* = 2). Deux larves ont été éliminées de la série pour les mêmes raisons que précédemment.

Lorsque l'inositol est utilisé à la place de la 20E, son effet est comparable à celui de la 20E, quoique moins accentué (Figure 4-6). Dans cette série (*n* = 10), trois larves traitées ont été écartées.

4.2.4 Discussion

Notons que la perception qui suivait une exposition dépendait de la concentration du produit utilisé : avec la 20E, au-dessous de 10^{-3}M et pendant moins de 20 min d'exposition, nous n'avons pas observé beaucoup d'inhibition lors des tests préliminaires. L'effet de l'exposition dépendait de la nature du produit et de sa concentration.

4.2.4.1 Quelle est l'origine de l'effet de l'exposition ?

Aucune étude sur l'exposition des sensilles n'a été réalisée auparavant sinon dans la perspective d'une exposition consécutive à l'absorption d'une ressource alimentaire naturelle ou artificielle. L'exposition des sensilles à la 20E 10^{-3}M et à l'inositol entraîne chez beaucoup d'individus une inhibition complète de l'activité nerveuse (Figure 4-6 : 71 % pour la 20E et 45 % pour l'inositol). D'après nos données, la 20E et l'inositol activent fortement un des neurones gustatifs lors d'un contact rapide de 2,5 s. Ils inhibent ces mêmes récepteurs lors d'un contact plus long (20 min). Cette inhibition est irréversible, des tests rapides conduits 2 heures après les premiers enregistrements montrent une persistance de l'inhibition. L'origine de l'effet demeure inconnue, on peut avancer plusieurs hypothèses :

1. La différence d'osmolarité entre le milieu extérieur et le milieu intérieur pourrait léser les cellules gustatives et par conséquent inhiber toute activité subséquente.
2. Le protocole expérimental était visiblement trop traumatisant et pourrait avoir un effet inhibiteur sur la sensibilité des récepteurs.
3. L'exposition pourrait altérer la structure du pore terminal des sensilles gustatives traitées (mais cela n'explique pas pourquoi les sensilles non exposées sont souvent également inhibées).
4. L'effet de l'exposition pourrait être mécanique. En comparant l'effet de la 20E à celui du KCl, on pourrait supposer que l'exposition perturbe la physiologie des récepteurs et qu'il est hormonal. Comme l'inositol induit un effet comparable, il nous faut éliminer l'hypothèse d'un effet hormonal spécifique à la 20E.

4.2.4.2 L'inhibition est-elle due uniquement à un protocole traumatique ?

Non, l'inhibition n'est pas uniquement due à un effet traumatique. L'intéressant dans notre travail est que nous avons mis en évidence que lors de l'exposition d'une paire de sensilles, la paire non exposée est aussi inhibée. Cette inhibition concomitante pourrait résulter :

(1) d'une perturbation de l'intégration de l'information au niveau du système nerveux central et d'une action centripète. Nous ne pouvons pas déterminer ses causes physiologiques.

(2) d'un transport de 20E ou d'inositol à travers l'hémolymphe du côté gauche vers le côté droit ou vice versa. La quantité de matériel transporté pourrait être extra-physiologique et suffisante pour déclencher un dysfonctionnement des récepteurs périphériques. Quelques travaux ont suggéré la probabilité d'un transport de matériels entre l'hémolymphe et le milieu dendritique des cellules sensorielles (Angioy *et al.*, 1983). Les expériences d'injection de 20E et d'inositol que nous avons réalisées permettent d'éliminer cette hypothèse.

On note aussi que par rapport à l'étude comportementale, le protocole expérimental était visiblement trop endommageant pour les larves. Aucune des larves exposées n'était capable de se déplacer lors du test, ce qui explique l'absence de résultats pour cette expérience. Pour cela il faudrait trouver un moyen de les immobiliser pendant 20 minutes sans avoir à les entortiller dans du Parafilm™ en utilisant de la glace, du CO2 ou bien en plaçant leur corps dans une solution saline, comme cela est pratiqué avec succès sur *Manduca sexta* (Gothilf et Hanson, 1994).

4.2.4.3 Est-ce que cet effet est physiologique ?

Nous possédons trop peu de recul par rapport à cette expérience pour évaluer si ces conditions sont susceptibles d'être réalisées dans la nature. Ce qui pose question ici, ce sont les mécanismes physiologiques mis en jeu lors de l'inactivation des sensilles contra-latérales, aussi bien avec la 20E qu'avec l'inositol. Il paraît peu vraisemblable que les sensilles gustatives restent en contact prolongé avec un milieu contenant de la 20E pendant une vingtaine de minutes. Lorsque le comportement alimentaire a été observé chez des chenilles de lépidoptères, soit par des observations directes soit par des enregistrements actographiques, il a été montré que les activités alimentaires ne sont pas continues mais constituées de courtes séquences suivies de repos (Reynolds *et al.*, 1986). Même dans ces conditions, l'adaptation à une substance antiappétente est relativement rapide, que ce soit de l'azadirachtine ou d'autres substances agissant sur le système gustatif. Par exemple, une période de 48 h d'exposition à une alimentation contenant de la caféine est suffisante pour inhiber les réponses électrophysiologiques à cette substance chez *Manduca sexta* (Glendinning *et al.*, 1999).

Afin de mettre en évidence quels sont les mécanismes à l'œuvre dans une telle adaptation, les chercheurs de ce groupe ont réalisé des expériences un peu similaires

aux nôtres, en étudiant l'effet d'expositions alimentaires ou directes avec trois substances antiappétentes, de la caféine, de l'acide aristolochique et de la salicine (Glendinning *et al.*, 1999; Glendinning *et al.*, 2001; Glendinning *et al.*, 2001). Le protocole d'exposition directe qui est employé diffère du nôtre en ceci qu'il dure 23 h, mais est composé d'une succession d'expositions de 10 min suivies d'un repos de 30 min (à comparer à notre protocole où nous avons utilisé une exposition unique de 20 min). Dans leurs expériences cependant, ils observent une diminution des réponses à la caféine dans les sensilles exposées mais pas dans les sensilles contra-latérales non exposées. L'hypothèse qu'ils avancent pour expliquer cet effet est une inhibition de la cascade de transduction activée par la stimulation prolongée de caféine (Glendinning *et al.*, 1999; Glendinning *et al.*, 2001). Les mêmes expériences réalisées avec la salicine ne donnent pas les mêmes résultats en ceci que la réponse nerveuse des sensilles gustatives à la salicine et aux autres antiappétents n'est pas affectée par une exposition alimentaire bien que le comportement alimentaire soit adapté à la suite d'une exposition (Glendinning *et al.*, 2001). Les auteurs concluent de cette expérience que dans ce cas, l'adaptation est réalisée au niveau du système nerveux central.

En résumé, l'adaptation à une alimentation contenant des substances anti-appétantes implique, chez *Manduca sexta*, soit une modification de la sensibilité périphérique soit un changement de l'interprétation du message nerveux par le système nerveux central. Les résultats que nous avons obtenus sont originaux et n'ont pas été signalés dans la littérature, même chez *Manduca sexta* où un protocole d'exposition assez proche du nôtre a été utilisé. Les durées d'exposition et les concentrations que nous avons employées sont différentes des précédentes et l'on peut supposer que les effets physiologiques correspondants ne sont pas de même nature. La différence la plus importante entre les deux protocoles, réside probablement dans l'intensité et la durée de la réponse nerveuse induite dans les cellules gustatives.

Il paraît peu vraisemblable que ce mécanisme intervienne dans l'adaptation à une nourriture contenant des substances antiappétentes mais plutôt dans l'adaptation à des stimuli constants et trop intenses. Il faudrait pour cela envisager des tests plus systématiques et résoudre le problème de la manipulation de ces insectes, pour l'instant assez traumatique comme nous l'avons vu. Si ce phénomène est générique,

nous devrions pouvoir le reproduire avec d'autres molécules stimulantes, et sur d'autres insectes à l'état larvaire ou adulte.

4.3 Modulation de la sensibilité gustative par l'âge et le régime alimentaire.

4.3.1 Introduction

Nous avons vu dans les chapitres précédents que la sensibilité gustative ne semblait pas affectée directement par l'hormone de mue mais qu'une exposition externe avec de la 20E ou de l'inositol pouvait inhiber les réponses des récepteurs. Ces expériences ne permettent pas d'invalider l'hypothèse selon laquelle la cessation de l'alimentation des chenilles juste avant la mue était liée à une inactivation des récepteurs gustatifs. Ce que nos expériences ont montré, c'est qu'un pic d'ecdysone ne semblait pas modifier la perception. Qu'en est-il en fin de stade ? Pour répondre à cette question, l'approche la plus directe consisterait à mesurer la sensibilité des récepteurs gustatifs sur des chenilles en fin de stade.

Postuler que la sensibilité des récepteurs gustatifs puisse varier n'est pas une idée nouvelle. Toute une série de facteurs ont été mis en évidence et il est nécessaire d'en tenir compte afin de mettre au point un protocole expérimental qui permette d'obtenir des résultats interprétables.

Le premier facteur qui est relevé est celui de l'âge. Les travaux d'électrophysiologie conduits sur des larves ou des adultes préconisent l'utilisation d'insectes de jeune âge ou ayant récemment mué (Rees, 1970; Schoonhoven, 1976; Städler *et al.*, 1987; Schoonhoven *et al.*, 1991; Städler et Schöni, 1991). La qualité des enregistrements électrophysiologiques et l'intensité des réponses s'affaiblissent avec l'âge. C'est le cas du système gustatif où par exemple chez la mouche du cerisier adulte, *Rhagoletis cerasi* L (Diptera, Tephritidae), la réponse des cellules gustatives sensibles au sucre baisse avec l'âge (Städler et Schöni, 1991). Sur le système olfactif, plusieurs auteurs ont décrit des sensilles insensibles chez des Lépidoptères, lorsque l'adulte atteint 5 à 7 jours alors que la plupart répondent après l'émergence (Städler *et al.*, 1987). La présence de telles modifications dans les réponses enregistrées ne correspond pas forcément à un changement de sensibilité car les techniques d'enregistrement utilisées sont extracellulaires et ne donnent pas une image fidèle des évènements électriques qui affectent les neurones sensoriels. Il faut s'assurer que le

comportement des insectes manifeste une baisse des capacités de discrimination avant de conclure à une inactivation des cellules nerveuses. Un travail récent effectué chez *Antherea polyphemus* suggère cependant que cette baisse soit réellement liée à une dégradation des cellules sensorielles en liaison directe avec l'âge (Kumar *et al.*, 1998).

Le second facteur modulant la perception des substances gustatives est la nature du milieu nutritif ou les conditions d'élevage, c'est à dire la composition du milieu alimentaire qui influe et conditionne la réceptivité des sensilles gustatives (Städler et Hanson, 1978; Schoonhoven *et al.*, 1991; Simmonds *et al.*, 1992). Chez *Ostrinia nubilalis*, Canney et Gardner (1989) ont conduit des études d'électrophysiologie et de microscopie électronique pour comparer la perception sensorielle gustative chez des larves élevées sur deux milieux, le premier était un milieu artificiel utilisé pour l'élevage, le second étant constitué de tiges et de feuilles de maïs fraîchement coupées. Les enregistrements électrophysiologiques conduits sur les larves élevées sur milieu artificiel avaient un rapport signal / bruit de moins bonne qualité que ceux obtenus dans le cas des larves élevées sur un milieu naturel. Ces auteurs ont examiné les sensilles gustatives de ces chenilles en microscopie électronique à balayage et en ont déduit que la fréquence d'occlusion des pores sensillaires était plus élevée chez les larves élevées sur un milieu artificiel.

La nature du milieu nutritif peut moduler l'effet des antiappétents sur les récepteurs gustatifs et le choix de la source alimentaire. Par exemple, Städler et Hanson (1978) ont pu montrer que des larves de *Manduca sexta* élevées sur un milieu artificiel contenant de la farine de blé percevaient peu cette farine alors que des larves élevées sur des feuilles de tomates, leurs plantes hôtes, la percevaient comme un antiappétent. Renwick et son équipe ont pu montrer à travers leurs études faites sur *Manduca sexta* que des larves n'ayant jamais été en contact avec les feuilles de tomates, lorsqu'elles étaient élevées sur celles-ci, n'acceptaient plus ultérieurement de s'alimenter sur un autre milieu, évoquant par ce comportement une sélectivité induite (del Campo *et al.*, 2001). Donc la présence de certains composants inhabituels à un insecte affecte la sensibilité vis à vis de la plante-hôte et oriente son choix.

D'autres facteurs peuvent moduler la perception, et affecter la réponse sensorielle gustative tels que l'humidité relative de l'air. Après avoir contrôlé les facteurs principaux comme l'âge et le milieu alimentaire, Städler a montré qu'une humidité

relative de l'air dans les cages d'élevage inférieure à 75 % induit une diminution du nombre de sensilles fournissant des enregistrements ayant un bon rapport signal/bruit (Städler *et al.*, 1987). La sensibilité peut dépendre aussi du rythme circadien, les sensilles étant plus sensibles le matin que le soir (Bernays et Chapman, 1994), plus sensibles en phase lumineuse qu'en phase obscure du cycle journalier (Schoonhoven, 1976; Blaney *et al.*, 1986). Des études faites par Grosmaitre (2001) indiquent que l'octopamine peut moduler les réponses des neurones gustatifs.

Nous avons abordé le problème de la modulation de la sensibilité vis à vis de la 20E par l'âge et le milieu alimentaire grâce à deux protocoles. Ces protocoles étaient destinés à déceler un changement dans la réponse de la perception des sensilles gustatives. L'étude de ce changement était qualitative (qualité des enregistrements) et quantitative (nombre des potentiels émis) par chaque sensille. Les protocoles consistaient à observer ces deux paramètres en fonction du temps après la mue chez des larves et en fonction du milieu d'élevage (artificiel ou sur plante). Pour des raisons matérielles, nous n'avons pas mené l'élevage sur végétal à partir de l'éclosion de l'œuf mais en conditionnant les chenilles au stade L4.

Les effets de l'âge et du milieu alimentaire ont été testés dans deux expériences en présentant une gamme de stimuli appétants et antiappétents à des larves conditionnées à deux types de milieu alimentaire, en notant le taux de succès des enregistrements et l'intensité des réponses. En effet, évaluer l'évolution de la sensibilité gustative au cours du temps, sur des animaux différents, pose des problèmes méthodologiques. Le seul paramètre auquel nous avons accès en électrophysiologie, est l'intensité des réponses, qui se manifeste par un nombre de potentiels d'action détectés dans les enregistrements extracellulaires.

La présence de ces potentiels d'action dépend tout d'abord de la configuration électrique des tissus situés entre l'électrode d'enregistrement et l'électrode de référence (épithélium, cellules accessoires, cellules nerveuses, ouverture du pore terminal de la sensille gustative). C'est le premier paramètre que nous avons évalué, en notant le pourcentage de larves sur lesquelles il était possible d'obtenir des enregistrements électrophysiologiques corrects.

L'intensité de la réponse nerveuse n'a en elle-même aucun sens en soi. Ce qui compte tout d'abord, c'est l'interprétation que va en faire le système nerveux central de l'insecte, paramètre auquel nous n'avons pas accès par notre méthode d'enregistrement. On peut cependant s'attendre à deux types de changements : une baisse générale de la sensibilité ou une modification de la sensibilité à l'égard de certains composés. Nous avons essayé de répondre à ces questions en présentant aux chenilles une gamme de concentrations de 20E ainsi qu'un petit nombre de composés stimulant des cellules différentes de celles qui sont mobilisées en réponse à la 20E.

4.3.2 Matériels et Méthodes

4.3.2.1 Composés chimiques

La 20E (pureté : 99 %) nous a été généreusement fournie par le Dr Juraj Harmatha (République Tchèque). L'inositol et le GABA proviennent de chez Sigma. Les composés étaient dissous dans une solution saline KCl 10^{-3}M de façon à augmenter la conductivité des solutions. Les dilutions finales étaient conservées à une température de 4 °C. Les réponses obtenues avec KCl représentaient le seuil inférieur de réponses. Le GABA a été choisi comme produit standard car c'est un acide aminé détecté par les chenilles de pyrale et supposé être impliqué dans la reconnaissance des antiappétents tel que les cucurbitacines pour les adultes du coléoptère de la pomme de terre *Diabrotica* (Mullin *et al.*, 1994).

4.3.2.2 Expérience 1 : conditionnement sur milieu artificiel

Des larves en début de stade L4 étaient prélevées de l'élevage de masse et maintenues individuellement sur milieu artificiel dans des boîtes de Pétri. Le moment de la mue était noté lorsque les chenilles avaient une tête blanche, c'est à dire incomplètement sclérotinisée. Compte tenu de la sclérotinisation, l'incertitude sur cet âge était d'environ 2 h. Les chenilles ont été testées 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 et 84 h après l'éclosion. Chaque larve était immobilisée sur un support à l'aide de parafilm, puis stimulée avec les produits suivants : KCl 10^{-3} M, inositol 10^{-3} M, GABA 10^{-3} M et des concentrations croissantes de 20E (de 10^{-8} M jusqu'à 10^{-3} M), en respectant l'ordre dans la série de stimuli à chaque fois. Une série de 10 à 20 larves a été testée

pour chaque lot. Chaque stimulation durait 2,5 s et un temps de repos d'environ 3 minutes était respecté avant de faire une autre stimulation sur la même sensille.

4.3.2.3 Expérience 2 : Conditionnement sur milieu naturel

Le même protocole de stimulation a été appliqué à des larves élevées sur maïs. Les plants de maïs provenant de l'INRA de Versailles (variété DéA), étaient cultivés dans des chambres climatisées à 23 °C et une humidité relative de 75 à 85 %, 18 h de jour et 6 h de nuit. Les feuilles et les tiges étaient prélevées 4 semaines après le semis. Des chenilles en début de stade L4 étaient prélevées de l'élevage de masse sur milieu artificiel, et étaient maintenus dans des beurriers contenant des feuilles et tiges de maïs changées quotidiennement. Les chenilles présentant une capsule céphalique blanche étaient prélevées et maintenues individuellement dans des boîtes de Pétri jusqu'à l'expérimentation, en leur fournissant le même milieu alimentaire.

La préparation des insectes et les stimulations réalisées respectaient le même protocole que précédemment. Dans chaque lot, 2 à 5 larves ont été testées. Cet élevage étant beaucoup plus lourd que le premier, le nombre de larves dont nous avons disposé pour l'expérimentation était plus faible. Chaque sensille était testée (l'équivalent de quatre sensilles par larves) ce qui donne 8 à 20 enregistrements par produit et par concentration. Les chenilles ont été testées 24, 36, 48, 60, 72, 84, 144 et 168 heures après l'éclosion. Entre 84 et 144 heures, seulement quelques larves ont été testées. Nous avons rencontré de grandes difficultés à obtenir des enregistrements sur des larves en bon état et à avoir des données exploitables. Nous avons choisi 2 larves de 144 heures et 168 heures uniquement pour illustrer que les signaux obtenus sont de très mauvaise qualité à cette classe d'âge.

4.3.3 Résultats

4.3.3.1 Proportion de larves accessibles à l'enregistrement

Le pourcentage d'insectes sur lesquels il a été possible de pratiquer des enregistrements électrophysiologiques est présenté sur la Figure 4-8. Au début du stade larvaire, sur milieu artificiel et naturel, quasiment tous les insectes présentent des sensilles à partir desquelles il est possible d'enregistrer des signaux électrophysiologiques. Quand les larves sont élevées sur milieu artificiel, la

proportion chute très rapidement après le troisième jour jusqu'à moins de 40 %. Sur milieu naturel, la proportion d'insectes est maintenue à 80 % au-delà du quatrième jour et chute à 25 % au 7ème jour. Chez ces animaux, lorsque les enregistrements sont possibles, ils sont de mauvaise qualité. Les manifestations de cette dégradation (Figure 4-9) sont multiples :

1. Le début de la réponse nerveuse ne coïncide pas toujours avec le contact entre l'électrode de stimulation et la sensille, comme si le pore terminal n'était pas ouvert et mette du temps à se débloquer.
2. Le contact se perd souvent au cours de l'enregistrement, ce qui se manifeste par une disparition des potentiels d'action et des fluctuations importantes de la ligne de base.
3. L'amplitude des potentiels d'action est plus faible chez des animaux âgés qu'en début de stade.
4. Le niveau de bruit des enregistrements augmente avec l'âge. Le rapport signal sur bruit est maximal en début de stade.

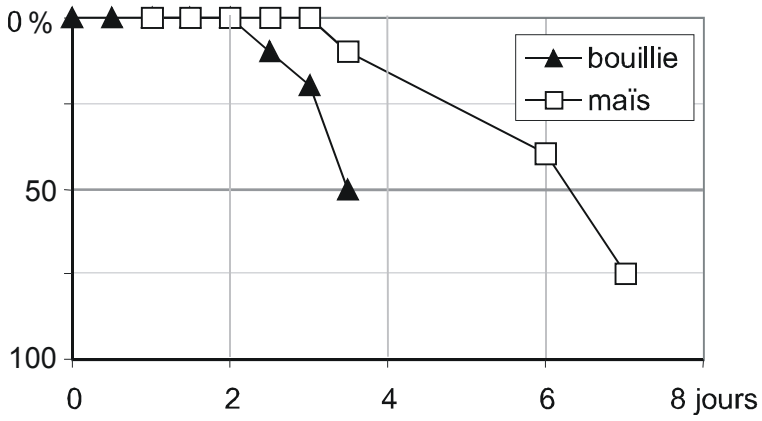


Figure 4-8 Fréquence des larves éliminées en fonction de l'âge

Des larves prélevées dans l'élevage de masse au stade L4 ont été maintenues soit milieu artificiel (bouillie ; triangles noirs) ou sur feuilles de maïs (maïs ; carrés blancs). Ce diagramme représente le pourcentage de larves sur lesquelles il n'a pas été possible d'obtenir un enregistrement correct sur les sensilles médiales ou latérales, en fonction du temps écoulé depuis la dernière mue larvaire.

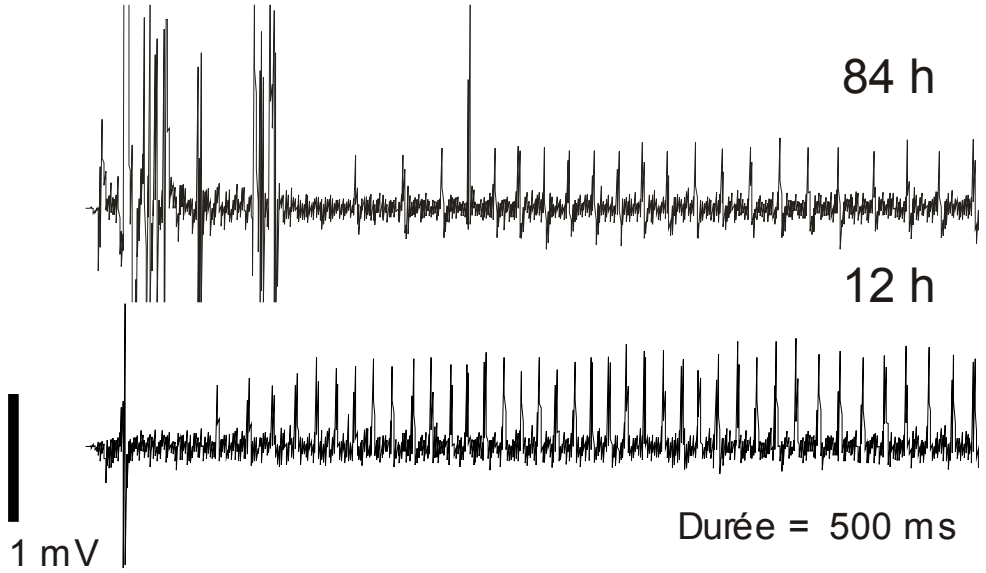


Figure 4-9 Exemples d'enregistrements obtenus sur larves de pyrales de différents âges

Les chenilles utilisées étaient âgées de 84 h (trace supérieure) et de 12 h après la mue (trace inférieure) en réponse à de la 20E 10^{-5} M (sur la sensille latérale). Les enregistrements présentés sont filtrés (par une médiane courante, ce qui enlève les fluctuations de la ligne de base). L'amplitude des signaux est donnée par la barre verticale sur la gauche du schéma (1 mV). La durée des enregistrements présentés est de 500 ms.

Lors de cette expérimentation, de nombreux enregistrements présentaient des potentiels d'action dont l'amplitude était double de celle des potentiels d'action normaux (Figure 4-10), voire même présentant deux maxima. De tels potentiels d'action étaient plus fréquents chez des larves jeunes, de 0 à 24 h. Cette caractéristique s'est révélée après notre expérimentation, être un artefact. L'amplificateur TastePROBE est muni d'un circuit de détection du contact initial entre l'électrode et la sensille gustative. Ce circuit provoquait un artefact électrique lors de son déclenchement ; il était activé lors de l'occurrence de potentiels d'action de grande amplitude, plus fréquents chez les jeunes insectes. Ce disfonctionnement a été corrigé à la suite de notre travail.

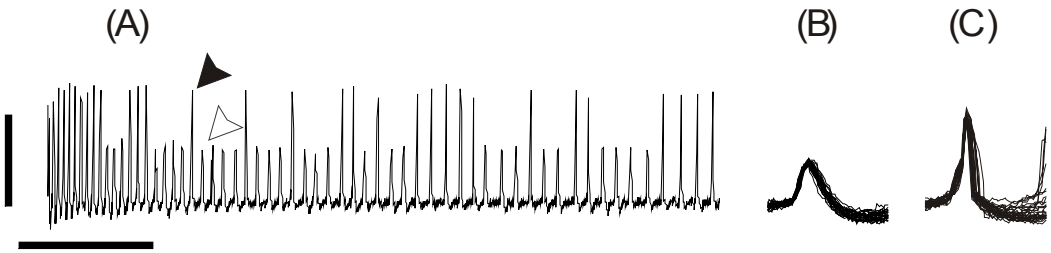


Figure 4-10 Exemple de potentiels d'action anormaux fréquents chez des larves jeunes

Réponse obtenue chez une larve L5 de 72 h à l'inositol 10^{-3}M dans la sensille médiale). (A) : 500 ms d'enregistrement après le contact initial ; échelle verticale : 4 mV ; échelle horizontale : 100 ms. Les flèches indiquent respectivement un potentiel d'action normal (blanche) et anormal (noire). (B) : potentiels d'action normaux; (C) : potentiels anormaux. Echelles (B-C) : verticale comme pour (A), durée représentée = 6 ms. Ces potentiels sont constitués de la superposition d'un potentiel d'action normal et d'un artefact provenant des circuits de détection de TastePROBE1.

4.3.3.2 Evolution de la sensibilité au cours du temps

Dans la majorité des enregistrements, le KCl à 10^{-3} M active une cellule gustative dont les potentiels d'action émis variaient entre 13 PA/s et 20 PA/s (Figure 4-11). Le GABA 10^{-3} M n'était pas très stimulant, l'intensité des réponses ne dépassait pas les 40 PA/s dans la majorité des enregistrements dans les deux types de sensilles (données non représentées). L'inositol à 10^{-3} M stimulait fortement une cellule localisée dans la sensille médiale chez presque toutes les larves testées : 120 PA/s et 135 PA/s de moyenne chez des larves de 12 et de 24 h. Les potentiels d'action étaient réguliers et de grande amplitude. Chez les larves élevées sur milieu artificiel, les réponses à l'inositol sont irrégulières. Chez les larves élevées sur feuilles de maïs, les réponses décroissent régulièrement au cours du temps.

Les réponses à la 20E restent cohérentes au cours du temps et se situent dans la même gamme de concentrations (10^{-7} à 10^{-3} M). Les réponses à la 20E 10^{-3} M montrent une plus grande variabilité, avec un affaissement des réponses par rapport à la dose précédente selon les lots expérimentaux. Il ne semble pas cependant qu'il y ait une relation nette avec l'âge des insectes. Ce qui apparaît le plus nettement est un affaissement de l'amplitude des courbes dose-réponse avec l'âge, ce qui est manifeste chez les larves élevées sur milieu artificiel vers 3 jours et sur les larves élevées sur feuilles de maïs à 6 jours.

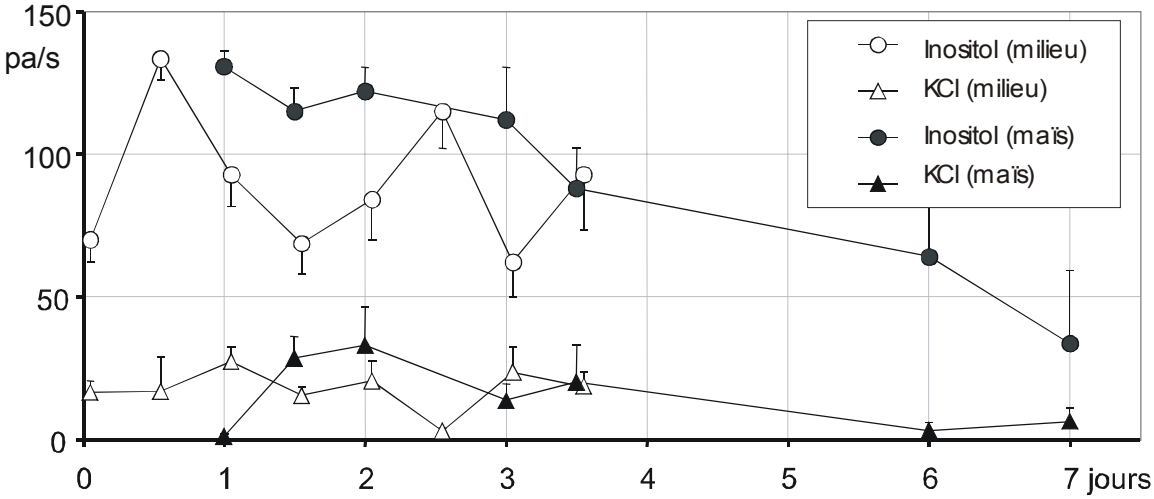


Figure 4-11 Evolution de la réponse au KCl et à l'inositol au cours du dernier stade larvaire

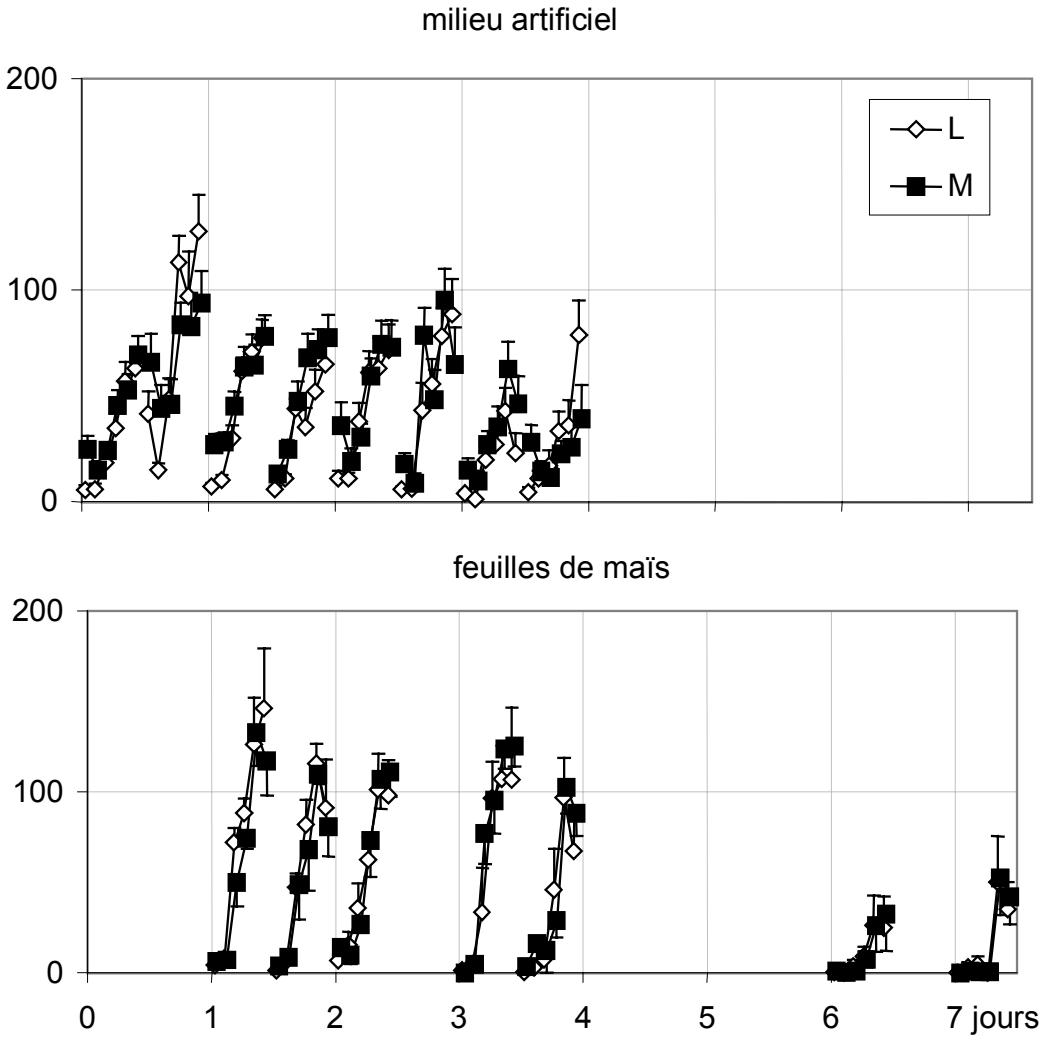


Figure 4-12 Evolution de la réponse à la 20E au cours du dernier stade larvaire.

Sur le graphique « milieu artificiel » figurent les courbes dose-réponse (moyenne + erreur standard) pour la 20E de 10^{-8}M à 10^{-3}M. Le nombre d'insectes évalués n'est pas identique selon les catégories: 0 h (*n*=20), 12 h (*n*= 10), 24 h (*n*=20), 36 h (*n*=25), 48 h (*n*=20), 60 h (*n*=15), 72 h (*n*=15-19), 84 h (*n*=8 à 15).
Sur le graphique « feuilles de maïs » figurent les courbes dose-réponse (moyenne + erreur standard) pour la 20E de 10^{-8}M à 10^{-3}M. Le nombre d'enregistrements par points varie selon la série expérimentale : 24h (*n*=2 à 4), 36 h (*n*=5 à 6), 48 h (*n*=5 à 6), 72 h (*n*=3 à 10), 84 h (*n*=4 à 8), 144 h (*n*=3 à 4), 168 h (*n*=2 à 7).
Symboles : losange blanc = sensille latérale (L), carrés noirs : sensille médiale (M).

4.3.4 Discussion

4.3.4.1 Relation entre âge et sensille

En essayant d'étudier si la perception évolue au cours du dernier stade larvaire, nous avons remarqué que la perception de la 20E persiste mais baisse au cours du temps. Les données que nous possédons ne nous permettent pas de conclure que la baisse observée résulte d'un effet direct de la 20E circulante, mais au simple fait que le vieillissement affecte la perception gustative.

La baisse de la sensibilité vis-à-vis de la 20E, est plus visible à la fin du quatrième jour pour le milieu artificiel et le septième jour pour le milieu naturel. Cette baisse est faible vis à vis de l'inositol, ainsi l'inositol s'avère encore très efficace au niveau des récepteurs gustatifs au moment où la 20E ne l'est plus. Ceci est peut être associé au fait que les larves âgées perçoivent moins les antiappétents, sans toutefois perdre leur sensibilité d'une manière totale comme nous l'avions supposé. C'est ainsi que la réponse neuronale de la sensille médiale vis à vis de la 20E 10^{-3}M chez des larves de 12 heures élevées sur milieu artificiel est de 125 PA/s alors qu'elle est de 50 PA/s pour des larves de 84 heures élevées sur le même milieu et pour la même dose. Pour l'inositol, la baisse observée dans les mêmes conditions n'est que marginale (de 130 à 100 PA/s).

Chez les larves âgées, nous avons affronté des problèmes techniques durant les enregistrements, en particulier parce que nous n'arrivions pas à détecter de manière nette le début de la stimulation (le contact se fait mais l'activité cellulaire n'était enregistrée que 500 ms après : 2 insectes sur 10). Ceci serait dû à une grande impédance des sensilles gustatives testées ou à une fermeture du pore terminal qui rend la sensille insensible à la stimulation en empêchant les molécules de pénétrer (Blaney *et al.*, 1986).

4.3.4.2 Relation entre milieu alimentaire et sensille

Le second résultat concerne l'effet très net de l'alimentation. Nous retrouvons des résultats publiés par Canney et Gardner (1989). Ceux-ci expliquaient la différence de sensibilité entre les larves issues de deux milieux différents par la consistance physique du milieu ou par la présence d'antibiotiques. Renwick a décrit un phénomène similaire chez *Pieris rapae* et l'attribue à des facteurs antiappétents présents dans les milieux artificiels contenant du germe de blé (Huang et Renwick, 1997).

4.3.4.3 Modulation de la perception

Le protocole expérimental que nous avons suivi ne permet pas de répondre à la question initiale qui était de vérifier s'il existe une relation entre la perception des phytoecdystéroïdes et l'âge de la larve. En réalité, il ne nous a pas permis de faire une étude de la sensibilité tout le long du dernier stade larvaire, et de vérifier le profil de l'évolution de la perception gustative dès le début du stade jusqu'à la mue. Par contre, il a permis d'observer que pour pratiquer des enregistrements électrophysiologiques au moment où l'insecte est en bon état physiologique, le meilleur moyen est de l'élever dans son milieu naturel et de le choisir jeune.

Si ces résultats sont valides, c'est à dire s'ils reflètent bien une évolution dans la sensibilité du système gustatif des larves, cela signifie que les jeunes larves auraient de meilleures capacités de détection et de discrimination que les larves plus âgées. L'insecte en pleine phase de croissance aurait-il un besoin de reconnaître sa plante-hôte d'une manière plus précise que vers la fin du stade où il doit préparer sa mue et arrêter de s'alimenter ?

Est-ce que les chenilles deviennent réellement « aveugles » aux composés des plantes et les premiers jours de chaque stade sont-ils critiques pour les « fixer » sur la plante ? Il serait intéressant par la suite de voir s'il existe une relation entre la baisse de la sensibilité observée et une modification du comportement alimentaire, en pratiquant des tests de choix alimentaire sur des larves élevées dans les mêmes conditions d'élevage. L'hypothèse que la baisse de sensibilité observée soit un artefact n'est pas à exclure, et que les capacités de détection ne sont pas affectées.

Le phénomène de la modulation des récepteurs reste un terrain largement inconnu !

4.4 Conclusion

Un effet clair de l'injection d'une dose de 10^{-2}M de 20E a été observé au niveau du comportement alimentaire larvaire et spécialement leur capacité à discriminer entre antiappétent ou témoin (i.e. la sensibilité des récepteurs). Il serait intéressant de pouvoir compléter ce travail par une étude sur la modulation de la perception gustative directement par l'intermédiaire de tests d'électrophysiologie. Ces observations permettraient de clarifier si l'absence de choix exprimé par les larves est liée à un changement de leur motivation ou bien à une modification de la sensibilité des récepteurs gustatifs.

Nous avons également conduit des tests d'exposition des sensilles gustatives à la 20E. Nous avons observé que les sensilles gustatives exposées pendant une vingtaine de minutes étaient apparemment incapables de générer des potentiels d'action 24 heures plus tard. Il serait intéressant d'étudier les effets d'une exposition externe à la 20E pour une durée et des concentrations différentes de 10^{-3}M, vérifier si la 20E circule entre les deux sensilles gustatives en utilisant de l'ecdysone marquée et étudier son activité au niveau des récepteurs internes. Cependant comme nous avons observé qu'une exposition à l'inositol inhibe également les sensilles exposées et les sensilles contra-latérales, il est probable que les effets observés ne sont pas spécifiques à la 20E.

Enfin, nous avons montré que l'activité sensillaire est plus élevée et facilement enregistrable au début du stade larvaire, une période où les sensilles jouent un rôle important dans l'acceptation ou le rejet d'une source alimentaire, ressource qui dans le cas des chenilles de dernier stade permettra la croissance de la larve et par conséquent la mise en réserve des aliments pour le stade chrysalide. La baisse de sensibilité et la dégradation de la qualité de l'enregistrement observée pourraient résulter d'une quiescence, d'un état où l'insecte arrête sa croissance (7 à 8 jours après la mue) et prépare sa chrysalidation. Ce qui nous a ouvert le chemin vers une question qui impliquerait l'effet direct ou indirect d'un facteur interne sur les récepteurs gustatifs ou sur la modulation de la perception sensorielle. Cependant compte tenu du fait que l'effet de l'âge se manifeste sur d'autres systèmes gustatifs (chez l'adulte) ou olfactifs, il est plus vraisemblable de postuler que cette dégradation est un phénomène général, lié à une dégradation de l'état physiologique des récepteurs. Cette hypothèse pourrait

être testée, notamment à l'aide des paramètres cytologiques proposés récemment pour le système olfactif (Kumar *et al.*, 1998).

Ainsi, l'effet de la 20E par injection sur le comportement alimentaire ne rejoint pas l'effet de la 20E par application externe sur la perception sensorielle. Cela suggère que le comportement de déplacement observé en fin de stade n'est pas lié ou causé par une inactivation des récepteurs gustatifs. Les résultats obtenus par l'application externe de la 20E et de l'inositol ne sont pas cohérents mais pourraient indiquer une réponse de stress face à une blessure.

5 QUELLES CELLULES REPONDENT AUX PHYTOECDYSTEROÏDES ?

5.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est d'approfondir l'étude de l'activité nerveuse du récepteur stimulé par la 20E. D'une manière générale, quatre mécanismes peuvent être impliqués dans la perception des antiappétents (Schoonhoven, 1982) :

1. Activation d'une cellule gustative spécialisée dans la détection de substances antiappétentes
2. Inhibition des cellules impliquées dans la détection des substances appétantes (récepteurs aux sucres).
3. Apparition des trains de potentiels d'action irréguliers.
4. Perturbation de l'intégration de l'information nerveuse.

L'hypothèse la mieux connue et soutenue, dit qu'il existe une cellule gustative responsable de la reconnaissance d'une multitude de molécules antiappétentes (Dethier et Crnjar, 1982; Schoonhoven, 1982; Blaney *et al.*, 1987; Schoonhoven, 1987; Schoonhoven et Fu-Shun, 1989; Peterson *et al.*, 1993; Glendinning, 1996; van Loon, 1996; Glendinning et Hills, 1997; Glendinning *et al.*, 2000). Nous avons adopté cette hypothèse de travail pour la détection des phytoecdystéroïdes chez *Ostrinia nubilalis*.

En effet, plusieurs études ont montré que la 20E activait au moins une cellule que les auteurs ont postulé être la « deterrent cell », c'est à dire une cellule dont l'activation est corrélée avec une inhibition des activités alimentaires. Ces études sur la 20E ont été conduites chez plusieurs espèces de Lépidoptères : *Pieris brassicae* (Ma, 1969), *Bombyx mori* (Tanaka *et al.*, 1994), *Mamestra brassicae* (Descoins et Marion-Poll, 1999), *Pieris rapae* (van Loon et Schoonhoven, 1999), *Lobesia botrana*

(Mondy *et al.*, 1999) et *Ostrinia nubilalis* (Darazy, 1997; Marion-Poll et Descoins, 2002). Les cellules sensibles à la 20E diffèrent des cellules sensibles aux substances appétantes par plusieurs caractères, la gamme de sensibilité et le décours temporel des réponses. Alors que les cellules répondant aux sucres et acides aminés présentent un seuil d'activation de 10^{-3}M à 10^{-2}M, les cellules répondent à la 20E à partir de 10^{-6}M-10^{-5}M. En ce qui concerne les réponses, les cellules qui répondent aux sucres et acides aminés répondent généralement par une bouffée initiale de potentiels d'action suivie d'une activité qui s'atténue assez vite. On dit que ces réponses sont phasi-toniques. Les cellules qui répondent à la 20E maintiennent une activité soutenue pendant longtemps (plusieurs minutes). La décharge de ces cellules est dite tonique (Figure 5-1). Enfin, aux doses faibles et intermédiaires, les cellules excitées par la 20E répondent avec une latence de l'ordre de 100-200 ms.

Ces arguments fonctionnels ainsi que les tests de comportement alimentaire que nous avons présenté dans le premier chapitre de ce travail, nous ont conduit à supposer que la 20E est détectée chez *Ostrinia nubilalis* par une cellule spécialisée dans la détection des antiappétents. Il existe deux moyens pour confirmer ce dernier rôle : (1) pratiquer des tests d'ablation des sensilles gustatives, mais l'inconvénient c'est qu'il faudrait sectionner la sensille entière (les quatre cellules chimioréceptrices) et on perturberait ainsi à la fois la détection des substances antiappétentes et celle des substances appétantes, (2) étudier la détection d'autres antiappétents par la même cellule. Nous avons choisi de prendre l'azadirachtine comme témoin antiappétent et de comparer son effet sur les récepteurs gustatifs d*'Ostrinia nubilalis* à celui de la 20E.

Pour répondre à cette question et aborder le problème de l'identification de la (ou les) cellule (s) spécifique (s) dans la réponse à la 20E et l'azadirachtine, nous avons utilisé différentes techniques comme les tests d'adaptation, les tests de mélanges, analyses des intervalles inter-spikes (ISI) et de la décharge temporelle.

Tout au long du travail de ce dernier chapitre, nous avons rencontré de multiples problèmes techniques et électroniques qui étaient dus à un disfonctionnement du nouvel amplificateur installé en automne 1999 (TastePROBE02, Syntech, Hollande). Les données que nous présentons dans ces chapitres sont donc limitées et préliminaires.

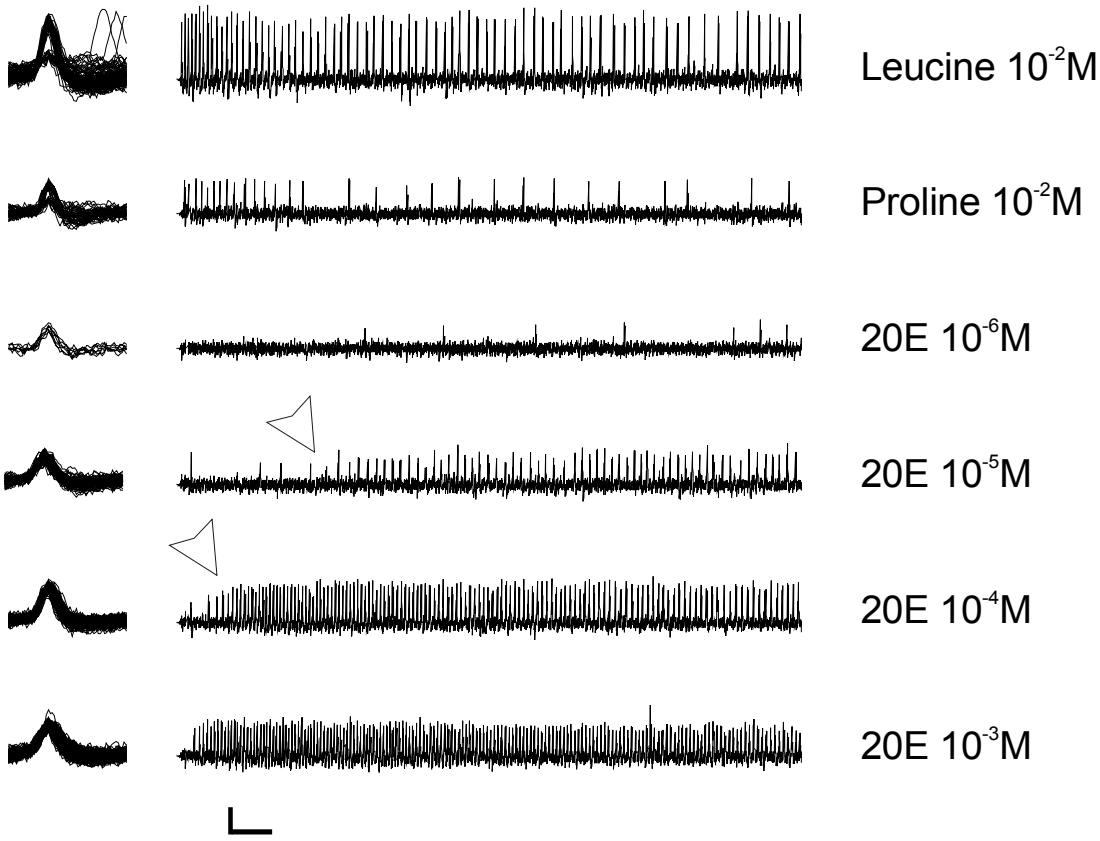


Figure 5-1 Exemples de réponses de la sensille latérale à la 20E, à la proline et à la leucine

Les réponses obtenues à la présentation de 20E sont toniques, contrairement aux réponses obtenues à des sels, à des sucres ou encore aux acides aminés, comme illustré ici avec la proline et la leucine. Elles apparaissent aussi après une latence qui peut durer de 100 à 200 ms (début de la réponse indiqué par une flèche blanche). Colonne de gauche : superposition des potentiels d'action détectés dans l'enregistrement correspondant. Droite : enregistrements obtenus (1 seconde représentée) et stimulus utilisé. Tous les enregistrements sont à la même échelle (barre verticale gauche = 1 mV).

5.2 Adaptation croisée

Si l'on souhaite savoir à quels composés une cellule gustative répond, la seule technique réellement rigoureuse consisterait à pratiquer des enregistrements électrophysiologiques intracellulaires. Malheureusement, une telle technique est quasiment impossible à réaliser sur des sensilles cuticulaires d'insectes. Dans ces conditions, il est impossible d'identifier de manière rigoureuse et non ambiguë de quelle cellule provient chaque potentiel d'action enregistré. Il faut donc trouver des approches indirectes qui nous permettront de faire des hypothèses sur l'identité de ces cellules. Nous nous sommes demandés si c'était la même cellule qui répondait à la 20E et à l'azadirachtine, substance antiappétente pour la pyrale mais de structure

chimique complètement différente. L'approche la plus directe consisterait à faire des enregistrements de chaque substance séparément, puis en mélange. Si les neurones activés émettent des potentiels d'action de forme différente, il serait possible de conclure que deux cellules détectent séparément la 20E et l'azadirachtine. Comme nous n'avons pas observé de différence marquée entre les potentiels d'action enregistrés dans ces conditions, il reste impossible de trancher entre l'hypothèse de l'activation d'une seule cellule ou de deux cellules.

Une des approches proposées dans la littérature, consiste à réaliser des tests d'adaptation croisée (Glendinning et Hills, 1997; Roessingh *et al.*, 1999; Bernays et Chapman, 2000). Dans ce protocole, on mesure la réponse d'un neurone à un produit A après une longue stimulation (par exemple 30s) avec un produit B. Si les deux produits stimulent la même cellule, on observe une réduction des réponses aussi bien après la présentation du stimulus A que du stimulus B. Si les produits A et B activent deux cellules, A ne pourrait pas adapter le récepteur de B et B ne pourrait pas adapter le récepteur de A. C'est ce que nous avons essayé de réaliser dans ces expériences.

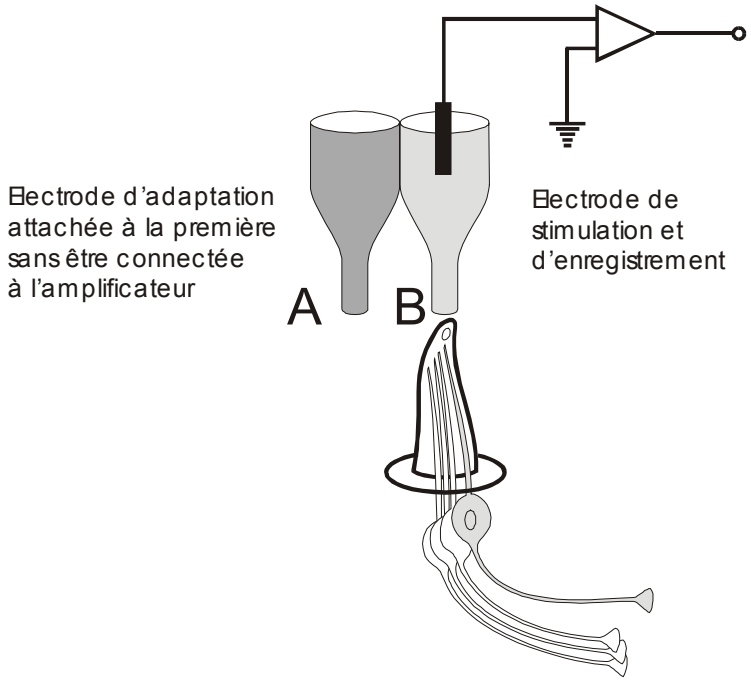


Figure 5-2 Dispositif mis au point pour permettre de pratiquer des enregistrements en adaptation croisée.

La mise au point d'une technique d'enregistrement électrophysiologique sur un neurone adapté puis stimulé n'était pas une tâche facile surtout que nous ne disposions

pas d'outils électroniques préconisés pour ce genre de test dans la littérature. Il a fallu finalement modifier le dispositif d'enregistrement décrit précédemment. Nous avons attaché un capillaire (A) à côté de l'électrode d'enregistrement (B). Ce capillaire A est rempli de la solution utilisée pour l'exposition, tandis que l'électrode (B) contient le produit à tester (Figure 5-2). Cela nous a permis d'enregistrer tout d'abord la réponse à la 20E à 10^{-3}M, de stimuler la sensille pendant 30 s avec de l'azadirachtine 10^{-3}M puis de passer rapidement à la seconde électrode (B) afin d'enregistrer la réponse au stimulus (20E 10^{-3}M) après l'exposition (Figure 5-3).

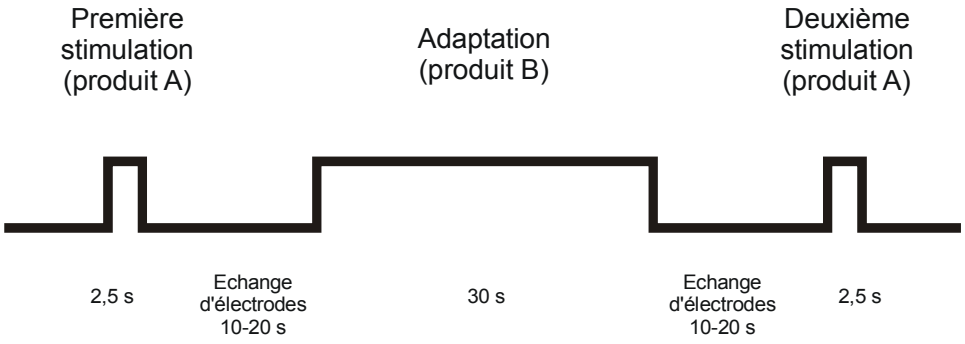


Figure 5-3. Protocole de stimulation utilisé pour les tests d'adaptation croisée.

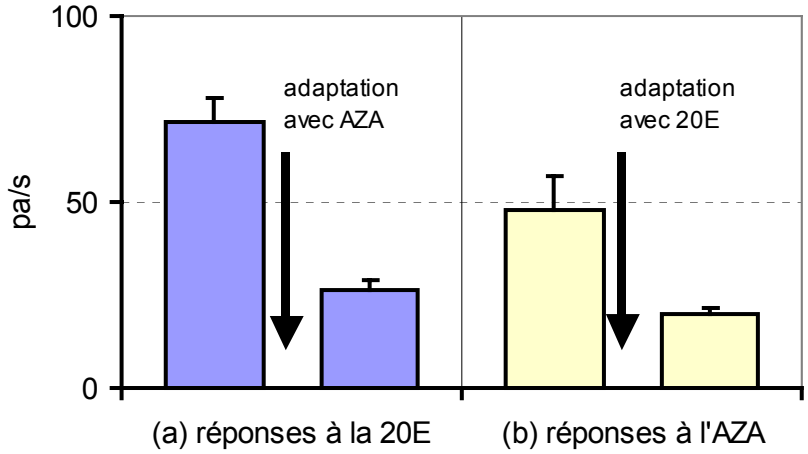


Figure 5-4 Adaptation croisée 20E / azadirachtine sur la sensille médiale.
(a) réponses à la 20E 10^{-3}M avant et après une stimulation de 30 s par l'azadirachtine 10^{-3}M (*n* = 8 ; moyenne ± sem). (b) réponses à l'azadirachtine avant et après une stimulation de 30 s par la 20E (*n* = 3).

Nous n'avons pas observé d'adaptation totale à la suite d'une exposition à la 20E ou bien à l'azadirachtine. L'intensité de l'adaptation variait selon les chenilles, diminuant en moyenne de moitié. Dans la Figure 5-4, la réponse à la 20E baisse

d'environ 50 % après une exposition prolongée avec de l'azadirachtine (et réciproquement).

Les résultats de cette expérience sont cohérents avec l'hypothèse que la 20E et l'azadirachtine agissent sur une même cellule dans la sensille médiale. Ils montrent également que l'adaptation n'est pas totale. Il faudrait compléter cette expérience avec différents contrôles, d'une part afin d'évaluer l'auto-adaptation, d'autre part afin de vérifier que cette adaptation concerne spécifiquement la cellule qui répond à la 20E et pas celles qui répondent aux sucres, aux sels et à l'inositol.

5.3 Mélanges binaires

5.3.1 Introduction

En présence de mélanges binaires de stimuli, deux types de réponses sont possibles (Glendinning et Hills, 1997; Roessingh *et al.*, 1999; Bernays et Chapman, 2000) (Figure 5-5) :

1. une réponse bicellulaire, lorsque les deux composants d'un mélange A et B activent respectivement au moins deux cellules distinctes, cette réponse se concrétise par un nombre de potentiels d'action égal à la somme des décharges des deux cellules activées simultanément ; résultat =A+B,
2. une réponse monocellulaire, lorsque les deux composants A et B excitent une seule cellule dont la décharge est très difficile à déterminer et à prévoir mais doit être logiquement entre les deux décharges individuelles.

Ainsi, nous avons conduit des tests de mélange pour comparer l'activité nerveuse du récepteur gustatif aux antiappétents en comparant les réponses induites par des mélanges de 20E et de sucres, 20E et acide aminé, et des mélanges d'azadirachtine et de 20E. En plus, ces tests permettront de vérifier si la 20E pouvait inhiber la réponse de la cellule aux sucres.

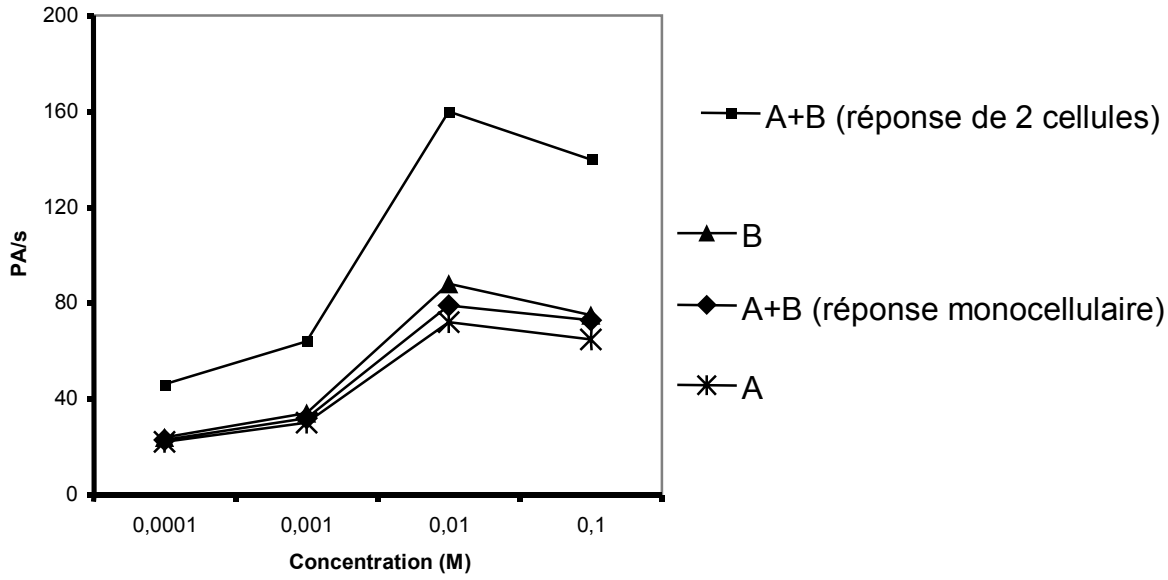


Figure 5-5. Types de réponses obtenues avec des mélanges binaires

Courbes dose-réponse théoriques . * : La courbe relative au produit A pur ; ▲ : la courbe dose-réponse relative au produit B pur ; ■ : la courbe dose-réponse prévue dans le cas d'une réponse pluricellulaire où les deux produits A et B exciteraient deux cellules gustatives dans une même sensille) ; ◊ :La courbe dose-réponse prévue dans le cas de la stimulation par une seule cellule gustative suite à une stimulation par un mélange binaire A+B (réponse monocellulaire).

5.3.2 Matériels et Méthodes

Les larves testées proviennent de l'élevage maintenu au laboratoire sur un milieu artificiel à une température de 23 °C 18 h de jour et 6 h de nuit. Elles étaient triées et mises à jeun pendant une heure avant les tests d'enregistrements.

Dans une première étape, nous avons effectué une série de courbes dose-réponse de chaque produit seul et ensuite en mélange. La gamme des produits était formée d'un acide aminé (leucine), de deux sucres (fructose, inositol), de deux antiappétents (l'azadirachtine et la 20E), puis tous les mélanges binaires possibles entre eux, à des doses de 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} et 10^{-3} M. Le nombre de larves était de 5 à 10 pour chaque test. Cette série de tests n'a pas été conduite au bout, à cause des problèmes matériels rencontrés.

Dans une deuxième étape, nous avons préparé des solutions mères de 2×10^{-5} M de 20E et d'azadirachtine respectivement, et un mélange de (20E+AZA)10^{-5} M. La concentration à 10^{-5}M a été choisie parce qu'elle est la concentration la plus faible

ayant une activité visible au niveau des récepteurs pour les deux stimuli (voir Glendinning et Hills, 1997). Nous avons enregistré l'activité sur des larves de jeune âge (< 24 h) à raison de 10 répétitions minimum pour chaque produit et concentration. Une période de 3 min séparait les enregistrements conduits sur une même sensille. Avant chaque stimulation, l'extrémité de l'électrode de stimulation était brièvement mise en contact avec un papier filtre, de manière à renouveler la solution et à éviter une concentration du stimulus liée à l'évaporation. Tous les produits ont été dilués dans du KCl 10^{-3}M.

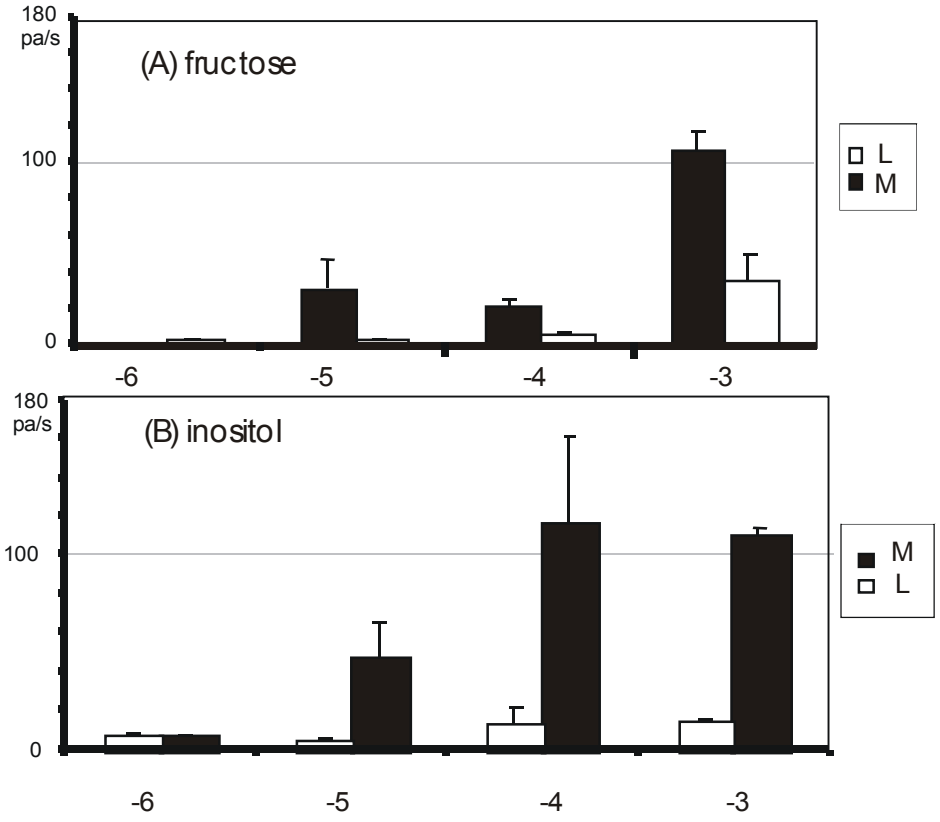


Figure 5-6 Réponses au fructose et à l'inositol

(a) Réponses des sensilles styloconiques d'*Ostrinia nubilalis* aux doses croissantes de fructose (*n* = 10). (b) Réponses à l'inositol (*n* = 10). Abscisses : logarithme décimal de la concentration molaire. Ordonnées : fréquence de décharge (potentiels d'action / s).

5.3.3 Résultats

5.3.3.1 Composés purs

Dans un premier temps, nous allons présenter les résultats de la première étape en présentant d'abord les effets du fructose, de l'inositol et de l'azadirachtine et leurs effets lorsqu'ils sont appliqués en mélange binaire.

Les réponses au fructose avaient lieu à partir de 10^{-3}M, au-dessous de cette concentration, les deux sensilles n'étaient pas excitées. La sensille médiale était plus sensible que la sensille latérale (Figure 5-6a). En ce qui concerne l'inositol : (Figure 5-6 b), nous avons remarqué que seule la sensille médiale chez *Ostrinia nubilalis* possédait un récepteur à l'inositol, qui était activé à partir de 10^{-5} M. L'inositol était très actif au niveau de la sensille médiale à des doses de 10^{-4} M et 10^{-3} M. Le récepteur semblait être adapté à partir de ces deux dernières doses.

Sur le graphe de la Figure 5-7, l'azadirachtine est mieux perçu du côté médial que du côté latéral. Un plateau dans la réponse sensorielle gustative vis à vis de ce stimulus commence à apparaître vers la concentration de 10^{-4}M pour la sensille médiale et une adaptation des réponses au-delà de 10^{-5} M pour la sensille latérale.

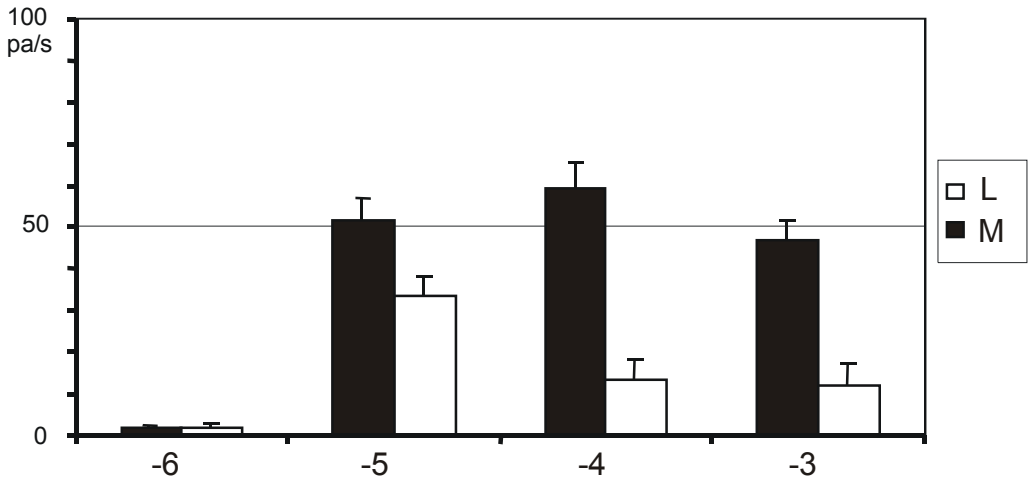


Figure 5-7. Réponses à l'azadirachtine

Réponses des sensilles styloconiques d'*Ostrinia nubilalis* à des doses croissantes d'azadirachtine (*n* = 10). Abscisses : logarithme décimal de la concentration molaire. Ordonnées : fréquence de décharge (potentiels d'action / s).

5.3.3.2 Mélanges binaires (tests préliminaires)

Cette gamme de produits a été testée chez une vingtaine de larves mais à cause des problèmes de l'amplificateur, les enregistrements de seulement trois larves étaient exploitables. Elles ont été sélectionnées, parce qu'elles étaient les seules à présenter de bons enregistrements pour la série de produits testés successivement. Nous avons alors établi deux graphiques montrant l'activité des sensilles médiales vis à vis de la 20E lorsqu'elle est en mélange avec des stimuli appétants à des concentrations de 10^{-3}M et 10^{-4}M uniquement. Les sensilles médiales ont été choisies parce qu'elles

percevaient l'inositol alors que les sensilles latérales ne le percevaient pas (Figure 5-8). Nous ne pouvons pas nous baser sur la comparaison de l'effet mélange avec la somme théorique des deux produits, parce que l'interaction et l'indépendance de deux cellules différentes au sein d'une même sensille est un sujet difficile. Beaucoup d'auteurs ont décrit la difficulté dans l'identification des différents récepteurs dans une même sensille excitée par un mélange donné (Roessingh *et al.*, 1999; Schoonhoven et van Loon, 2002).

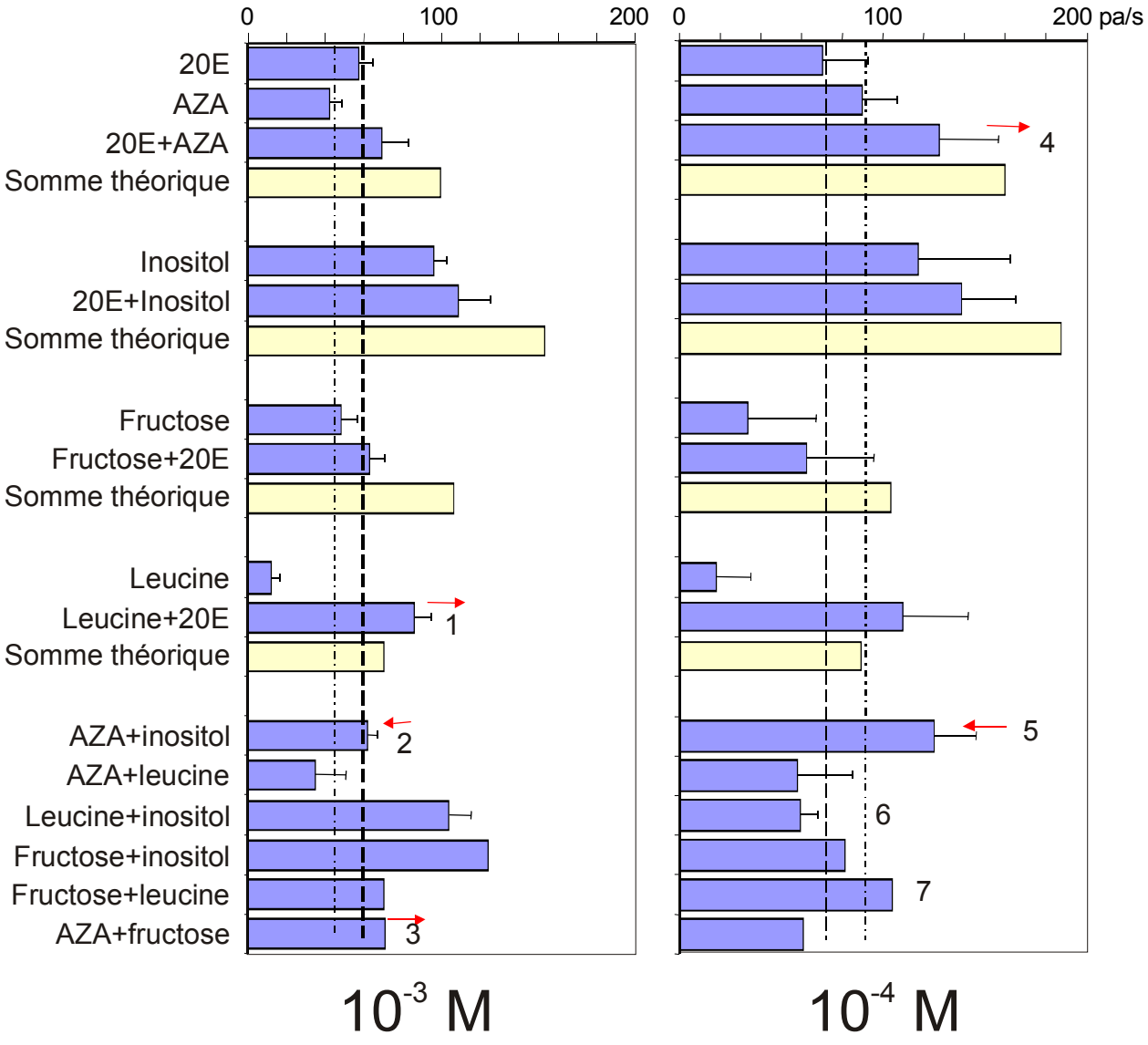


Figure 5-8 Réponses des sensilles médiales à des produits purs et en mélange avec la 20E à des doses de 10^{-3}M et 10^{-4}M (3-6 répétitions par point expérimental)

Sur ces résultats, faisons quelques remarques :

1- La leucine et la 20E semblent stimuler deux cellules différentes. En effet, le mélange leucine+20E à 10^{-4}M induit une activité nerveuse de la sensille égale 120 PA/s, activité qui est supérieure à la somme des potentiels d'action émis par chaque produit individuellement (95 PA/s). Le même cas de figure est observé dans les tests à 10^{-3}M.

2- La deuxième remarque concerne l'effet azadirachtine et inositol. L'inositol semble être moins actif en présence de l'azadirachtine à 10^{-3}M. Nous ne savons pas s'il s'agit de l'interaction de l'azadirachtine sur le récepteur à l'inositol ou sur la sensille entière. Ce phénomène ne se produit pas avec l'inositol en présence de la 20E.

3- Les résultats obtenus dans la Figure 5-8 favorisent l'hypothèse que deux récepteurs différents sont excités par le mélange azadirachtine+fructose, car le nombre de potentiels d'action émis est égal à la somme des potentiels de deux produits appliqués individuellement. Les résultats obtenus avec le mélange 20E+fructose 10^{-3}M ne sont pas aussi clairs mais un exemple d'enregistrement électrophysiologique montre que ce dernier mélange excite aussi deux neurones différents (Figure 5-9).

4- La 20E et l'azadirachtine, appliqués en mélange à 10^{-3} M, n'activent pas deux cellules indépendantes puisque leur mélange induit une réponse de 70 PA/s, inférieure à la réponse prévue théoriquement 100 PA/s. Un exemple d'enregistrement électrophysiologique montre l'excitation d'un seul récepteur par un mélange 20E+azadirachtine 10^{-3}M (Figure 5-9). D'un autre côté, ils ne semblaient pas perturber la réponse sensillaire en étant en mélange, en baissant son activité par exemple.

5- Le mélange azadirachtine+inositol induit moins de potentiels d'action que l'inositol lui-même, comme si l'azadirachtine inhibait l'activité du neurone sensible à l'inositol.

6- Le mélange leucine + inositol est plus faible que l'inositol, un résultat auquel on aurait pu s'attendre, certains auteurs pensant que c'est le même neurone qui est généralement excité par les acides aminés et par l'inositol (Schoonhoven et van Loon, 2002).

7- Le neurone sensible au fructose est différent de celui qui est sensible à la leucine. Quand la sensille médiale est excitée par ce mélange à 10^{-3}M ou 10^{-4}M, elle répond avec une intensité supérieure à la somme des intensités de chaque produit.

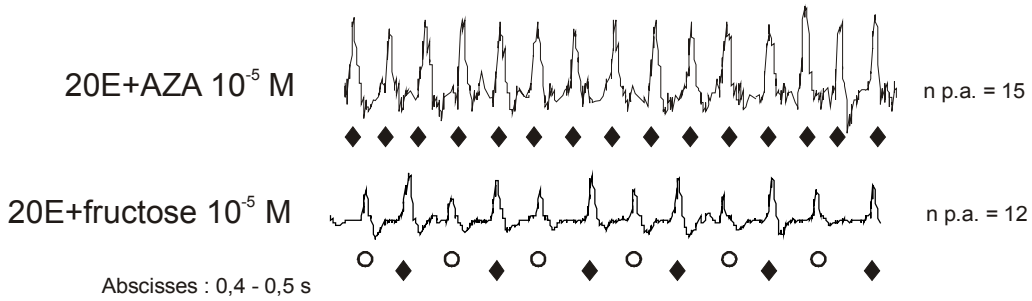


Figure 5-9 Exemples d'enregistrements obtenus avec un mélange binaire.

Réponses d'une sensille médiale montrant l'activité d'une seule cellule nerveuse (losanges noirs) lors d'une stimulation par un mélange 20E + azadirachtine 10^{-5}M (a), et de deux cellules (losange noir, cercle blanc) pour le mélange 20E+fructose 10^{-5}M (b).

Ces quelques remarques permettent de formuler une hypothèse sur la composition type d'une sensille médiale chez *Ostrinia nubilalis*, qui est schématisé dans la Figure 5-10.

Ce schéma montre les possibilités d'existence des chimiorécepteurs dans la sensille médiale d'*Ostrinia nubilalis*. Nous suggérons qu'il existe un récepteur à l'eau ou au sel, qui n'a pas été exprimé comme il a été inhibé par les autres produits.

En deuxième lieu, la présence d'un récepteur au fructose et aux sucres en général, différent de l'inositol.

En troisième lieu, la présence d'un récepteur à l'inositol, et à la leucine. Nous ne pouvons pas confirmer que l'azadirachtine interagit avec les autres molécules au niveau de ce récepteur

Un dernier récepteur aux antiappétents tel que l'azadirachtine, la 20E. serait-il aussi sensible quelquefois au fructose ?

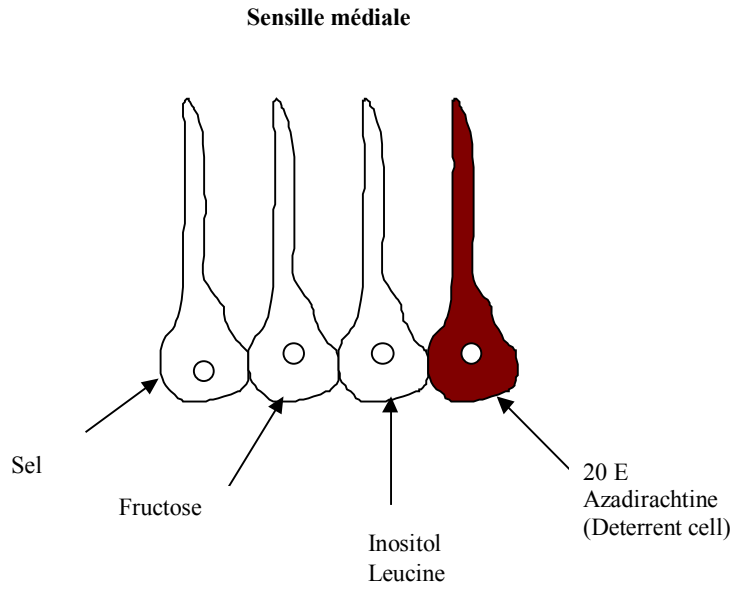


Figure 5-10. Dessin hypothétique sur la spécialisation et la distribution des 4 neurones gustatifs dans une sensille médiale d'*Ostrinia nubilalis*.

5.3.3.3 Effets du mélange binaire (20E et azadirachtine) 10^{-5}M

A des concentrations équivalentes, la 20E est plus active que l'azadirachtine au niveau des récepteurs périphériques. Si la 20E et l'azadirachtine excitaient indépendamment deux cellules différentes, le nombre de potentiels d'action émis par le mélange serait égal à la somme des deux nombres émis par la 20E et l'AZA respectivement. Ce qui est observé dans la figure 4-10, ne correspond pas à l'activité de deux cellules indépendantes, mais ne peut confirmer que c'est un unique récepteur qui est responsable de cette réponse, surtout que le nombre de PA/s est égal à 80, légèrement supérieur à celui de la 20E tout seul. On suppose que la présence de l'azadirachtine rend la 20E plus active.

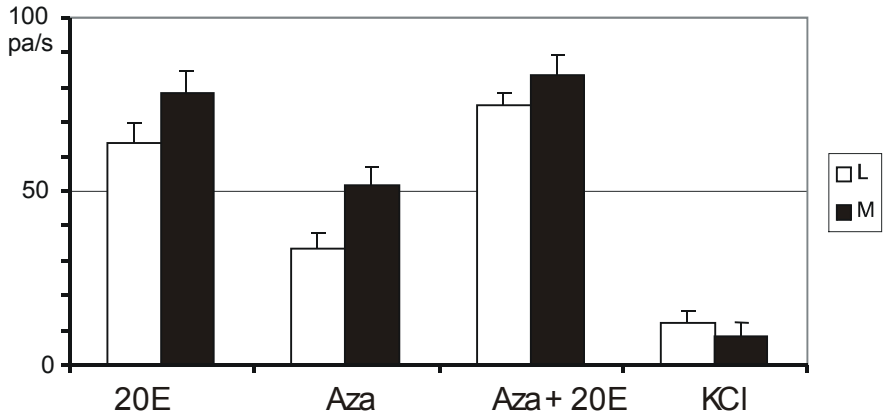


Figure 5-11 Réponses un mélange d'azadirachtine et de 20E

Réponses des sensilles latérales (L : barres blanches) et médiale (M : barres noires) à de la de 20E 10^{-5}M, de l'azadirachtine (AZA) 10^{-5}M, du mélange (AZA+20E) 10^{-5}M et du KCl 10^{-3}M. Ordonnées : pa/s.

5.4 Intervalles inter-spikes (ISI) :

En mesurant l'intervalle de temps qui existe entre deux potentiels d'action (Inter spikes intervals, ISI), nous pouvons évaluer si un composé excite une seule cellule ou plusieurs. Lorsqu'un produit à l'état pur stimule une cellule donnée, elle répond avec une fréquence maximale de 200 potentiels d'action par seconde. Donc entre deux potentiels d'action successifs, un intervalle de temps minimal de 10 ms est requis. La présence d'intervalles de temps inférieurs à 10 ms indique que plus d'une cellule est active dans l'enregistrement.

Nous avons analysé les enregistrements électrophysiologiques obtenus par les tests de mélanges, et nous les avons traités sous dbWave, un programme développé au laboratoire qui nous permettait d'obtenir sous Excel, les ISI pour chaque produit (seul ou en mélange).

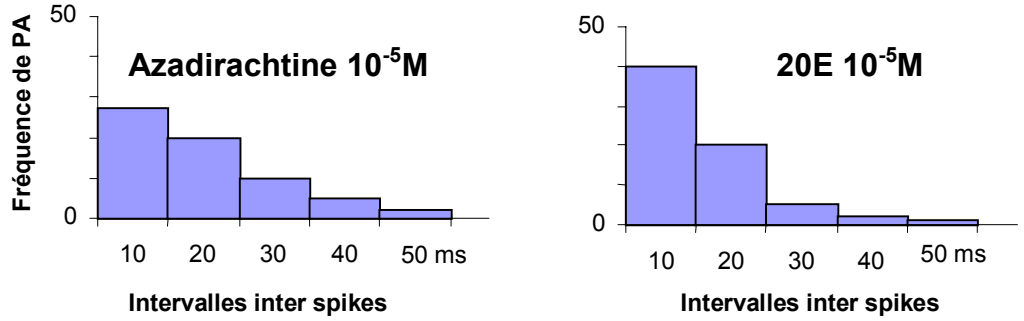


Figure 5-12 Distribution des potentiels d'action émis pendant les 100 premières ms suite à une stimulation par l'azadirachtine et la 20E à 10^{-5}M.

La Figure 5-12, montre la réponse qui résulte de la combinaison en un même fichier des différents intervalles de temps qui séparent les potentiels d'action émis lors de l'excitation par l'azadirachtine 10^{-5}M et la 20E 10^{-5}M (n = 10).

L'axe des abscisses représente les classes successives de l'intervalle de temps qui sépare les potentiels d'action, exprimé en ms, pour une totalité de 100 ms, et l'axe des ordonnées étant la fréquence des potentiels d'action. Lors d'une stimulation avec de la 20E 10^{-5}M, il existe à peu près 40 potentiels d'action qui ont un intervalle inter-spikes inférieur à 10 ms. Il pourrait donc exister au moins deux cellules excitées lors de la

stimulation par la 20E. Comme la 20E utilisée est diluée dans du KCl 10^{-3}M, cette deuxième cellule répond probablement au sel.

Le même schéma est observé dans le cas de l'azadirachtine, ce qui implique l'activité de deux cellules. L'étude de l'ISI du mélange nous a paru inutile car chacun des produits excitant deux cellules simultanément et il était difficile de trancher sur l'activité d'un récepteur en commun.

5.5 Test de PSTH

L'aspect de la **décharge temporelle** de la cellule activée par la 20E seule ou en mélange avec d'autres stimuli, nous indique si elle est phasique, tonique ou phasi-tonique. On parle de décharge phasique, lorsqu'une cellule émet beaucoup de potentiels d'action au début de la stimulation et peu après. Une décharge est tonique, lorsque le nombre de potentiels d'action ne varie pas tout au long de la stimulation. Finalement, une décharge est phasi-tonique, lorsqu'elle est entre les deux (Glendinning et Hills, 1997). La régularité de la décharge temporelle d'une cellule est un critère important dans l'identification d'un récepteur sensoriel. L'étude de cette décharge par des tableaux réalisés avec Excel à partir des données obtenues par les tests de mélanges binaires en électrophysiologie appelés tableaux Post-Stimulus Histogram (PSTH).

Nous avons analysé les enregistrements électrophysiologiques obtenus lors des tests de mélange. Le nombre d'enregistrements utilisés dans le cas de la 20E 10^{-3}M (n = 20), l'azadirachtine 10^{-3}M (n = 10), le mélange azadirachtine+20E 10^{-3}M (n = 10). Dans la Figure 5-13, la décharge temporelle de la sensille médiale stimulée par la 20E est comparée à celle de l'Azadirachtine. La décharge de 20E 10^{-3}M ressemblait qualitativement à celle de l'azadirachtine 10^{-3}M et au mélange binaire AZA+20E 10^{-3}M. Une réponse tonique du récepteur est notée dans les trois cas de stimulation.

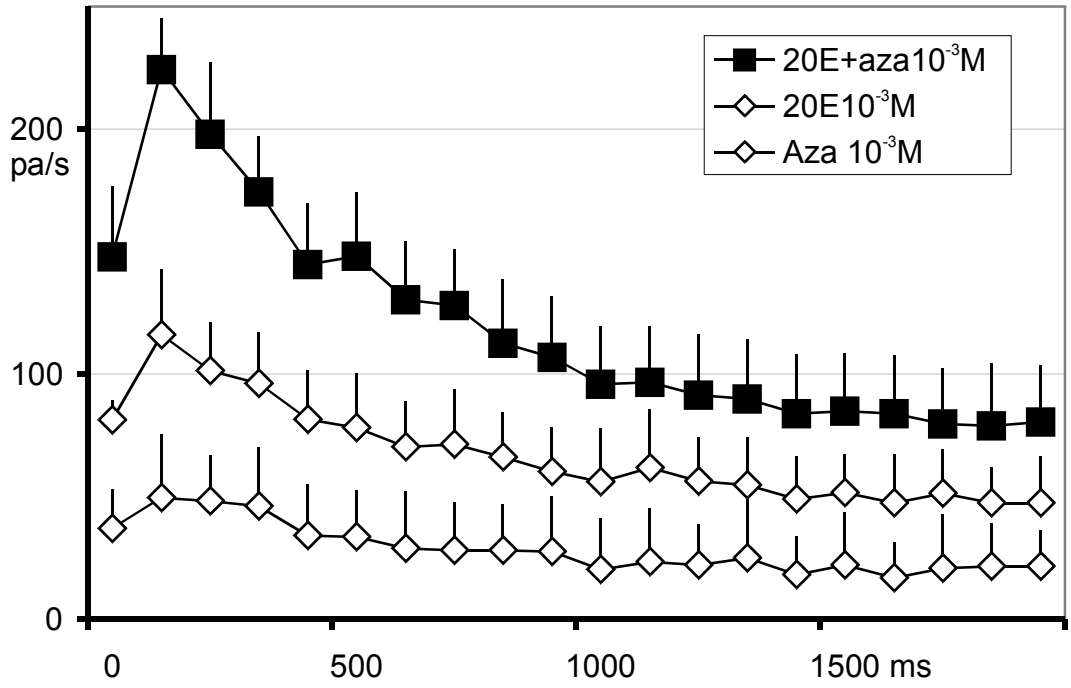


Figure 5-13 Décours temporel des réponses à la 20E et à l'azadirachtine.
PSTH des réponses de la sensille médiale en présence de 20E, d'azadirachtine et d'un mélange 20E + azadirachtine à des doses de 10^{-3}M. Ce graphe montre la moyenne des potentiels émis chaque 100 ms pour une période de 2 secondes.

5.6 Discussion

Nous avons utilisé quatre paramètres pour évaluer la réponse cellulaire vis à vis de la 20E et la comparer à la réponse à l'azadirachtine. Les résultats étaient les suivants :

(1) L'adaptation croisée réciproque entre les deux composés a été observée.

(2) Les intervalles inter potentiels d'action montrent l'activité de deux cellules différentes lors de la stimulation par la 20E toute seule et l'azadirachtine ainsi que par leur mélange.

(3) Les résultats des tests de mélange n'étaient pas tout à fait clairs. Ils suggèrent que les réponses présentent au moins deux cellules mais pas trois. Dans la littérature, lorsqu'on suppose que deux produits excitent le même récepteur, une analyse des tests de mélange est proposée. Elle consiste à mesurer un index appelé **Independant Component Index** ICI (Caprio *et al.*, 1989; Glendinning et Hills, 1997). Cet index permet d'indiquer si un composant d'un mélange binaire, active un récepteur cellulaire par un mode de transduction différent du mode de l'autre composé du mélange. Il est calculé selon la formule suivante :

$ICI = R_{ab}/ (R_a+R_b)$ où a et b représentent les deux stimuli du mélange. Ra et Rb représentent la valeur des réponses (nombre de potentiels d'action durant les 500 premières ms) pour le composé a et le composé b respectivement. Rab, représente le nombre de potentiels d'action induit par le mélange. Généralement, si deux composants activent le même récepteur par la même voie de transduction, alors ICI doit être supérieur ou inférieur à 1, sinon, ces deux produits activent le même récepteur par deux modes de transduction différents. Dans notre cas, Rab ou le nombre total de potentiel d'action émis par le mélange azadirachtine et 20E est égal à 82, Ra (nombre relatif à la 20E) = 78 et Rb (nombre relatif à l'azadirachtine = 52, ICI = 82/ (52+78) $\Rightarrow$ICI = 0,63 donc, l'azadirachtine et la 20E activent le même récepteur par la même voie de transduction.

(4) Les courbes dose-réponse et les PSTH que nous avons eu avec la 20E et l'AZA se ressemblaient.

En outre, nous avons noté que les réponses sensorielles induites par l'AZA et la 20E avaient une certaine amplitude de potentiels d'action constante au cours du temps, et des décharges de potentiels d'action très voisines.

Ces éléments soutiennent l'hypothèse que c'est le même récepteur qui est excité par les phytoecdystéroïdes et l'azadirachtine.

Identifier la cellule qui répond aux phytoecdystéroïdes et prouver que c'est la 'deterrent cell' n'est pas facile. Les résultats obtenus par les tests d'adaptation croisée et de mélanges, ainsi que les tests comportementaux du premier chapitre, montrent que la 20E induit une décharge importante de potentiels d'action, -en excitant la deterrent cell- et l'adapte aussi – en baissant son activité vis à vis de l'azadirachtine-, et rend le milieu auquel elle est ajoutée antiappétent et éloigne les larves d*'Ostrinia nubilalis*.

Une dernière remarque est à relever. Les informations acquises dans ce dernier chapitre, ne prennent pas en compte la possibilité d'une interaction entre les différentes cellules nerveuses d'une même sensille gustative. Jusqu'à présent, les études ne sont pas claires sur le problème de l'interaction et son importance dans l'interprétation des expériences de mélange et d'adaptation. Ce genre d'expériences est fondé sur l'hypothèse implicite que les réponses à différents produits en mélange

sont indépendantes entre elles. Il existe pourtant des exemples multiples sur l'interaction périphérique au niveau des chimiorécepteurs, qui montrent des réponses aux mélanges binaires très différentes des réponses aux composants du mélange seuls (Roessingh *et al.*, 1999).

6 CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail, nous décrivons l'effet des phytoecdystéroïdes sur les récepteurs gustatifs des larves *d'Ostrinia nubilalis* et quelques espèces voisines. Nous avons pu montrer leur efficacité en tant que substances antiappétentes. Nous nous sommes limités à étudier leurs effets à court terme, c'est à dire leur action rapide sur la physiologie de l'insecte sans aborder leurs effets à long terme et leur toxicité.

Notre étude montre que les larves de la Pyrale du maïs au cinquième stade larvaire détectaient les phytoecdystéroïdes présents dans le milieu alimentaire (20E et ecdysone) comme des antiappétents et que cette détection est corrélée avec une forte sensibilité vis à vis de ces produits au niveau des récepteurs gustatifs. Les chimiorécepteurs des larves de la Pyrale du maïs détectent en effet une vingtaine de molécules d'ecdystéroïdes ou de leurs analogues et antagonistes. Cette étude montre que les ecdystéroïdes les plus actifs sur la mue ne sont pas ceux qui stimulent le plus les récepteurs gustatifs et qu'ils différent selon le type de sensilles gustatives. Ces résultats suggèrent que d'autres molécules que l'hormone de mue peuvent avoir un effet antiappétent plus grand. Ils rappellent aussi les travaux de Tomaschko (1999), qui en analysant les données comportementales montrent des différences importantes entre le spectre de sensibilité des récepteurs nucléaires et celui des récepteurs membranaires.

Ces résultats nous ont incité à poursuivre l'étude de la perception chez d'autres espèces du genre *Ostrinia* qui ont un régime alimentaire différent (oligophage *versus* polyphage). Les larves de six espèces différentes ont été sélectionnées, élevées et testées en présence de la 20E en étudiant son effet sur l'activité neuronale des sensilles gustatives. Nous avons postulé que ces espèces voisines pourraient avoir le même profil de la sensibilité vis à vis des phytoecdystéroïdes. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée. Il existe des différences marquées qui ne sont pas liées au régime

alimentaire. Il serait nécessaire cependant de compléter l'approche en évaluant l'incidence des phytoecdystéroïdes sur le comportement alimentaire.

Concernant l'étude des effets de la 20E sur les sensilles gustatives, nous avons évalué si les ecdystéroïdes présentés de manière externe par rapport aux organes gustatifs avaient le même effet que lorsqu'ils étaient injectés dans l'animal. Nous voulions vérifier s'il existait un lien entre le pic hormonal interne de 20E et la sensibilité gustative :

- en exposant les chimiorécepteurs à une solution de 20E. Nous avons trouvé des résultats intéressants et assez curieux. L'activité des cellules gustatives exposées disparaissait et simultanément, l'activité des cellules gustatives non exposées (à la 20E ou l'inositol), étaient inhibées aussi, alors que l'exposition au KCl n'induisait pas un tel effet.
- en injectant de la 20E dans la larve. L'injection montre que le taux interne d'ecdystéroïdes n'a pas d'incidence sur la sensibilité des récepteurs mais module par contre l'alimentation. A une dose de 20E élevée (10^{-2}M), les larves arrivent à discriminer entre antiappétent et appétant mais s'alimentent peu, comme si elles étaient intoxiquées. Cette étude comportementale nous a apporté des connaissances supplémentaires tels les effets d'injection de phytoecdystéroïdes sur le comportement larvaire de la Pyrale du maïs. Cette étude préliminaire sur la modulation du comportement alimentaire par injection de 20E mérite d'être approfondie par la recherche d'autres mécanismes de modulation de la perception gustative en relation avec la physiologie de l'insecte.
- en mesurant la sensibilité gustative au cours du stade larvaire sur des insectes alimentés avec un milieu artificiel ou avec des feuilles et des tiges de maïs. Nous avons observé que la sensibilité évolue au cours du temps et qu'il est impossible techniquement d'enregistrer l'activité électrique des neurones gustatifs en fin de stade.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons tenté d'élucider par quelle cellule étaient perçus les ecdystéroïdes et nous avons postulé que cette cellule est celle qui détecte d'autres composés antiappétents comme l'azadirachtine. Nous avons pu mettre en évidence une adaptation de l'activité nerveuse des cellules excitées par les

phytoecdystéroïdes à la stimulation par d'autres antiappétents tels que l'azadirachtine. Ces résultats nous incitent à rechercher des similarités entre les effets de différents antiappétents et les phytoecdystéroïdes.

Des études supplémentaires en électrophysiologie sur les effets de la 20E lorsqu'elle est mélangée à d'autres molécules antiappétentes ainsi que des expériences sur l'adaptation à court et à moyen terme sont à prévoir. Il serait intéressant (1) de tester chez la Pyrale par des moyens électrophysiologiques et de comportementaux les effets des extraits de quelques plantes contenant de fortes concentrations d'ecdystéroïdes comme les épinards et *Ajuga reptans*, non dilués, (2) d'observer leurs effets à la suite d'un contact bref et (3) de les comparer à l'effet d'extraits de maïs dépourvus ou pourvus de phytoecdystéroïdes ainsi que des extraits de plantes non-hôte.

Il serait aussi intéressant d'étudier l'activité alimentaire des larves L5, déterminer la période ou les périodes pendant lesquelles les larves s'alimentent le plus et voir si cette activité corrélée avec une variabilité du taux de la 20E dans l'hémolymphe.

Notre travail était la première étude mettant en évidence :

1. la détection d'une large gamme de phytoecdystéroïdes par un récepteur spécifique gustatif au sein d'une espèce polyphage.

2. la détection des phytoecdystéroïdes chez différentes espèces du genre Ostrinia, ainsi que la détection de la 20E chez quelques-uns au niveau de leurs palpes maxillaires.

3. une inhibition des cellules neuronales gustatives après une exposition aux phytoecdystéroïdes d'une manière irréversible.

4. l'existence d'une cellule spécialisée dans la réponse aux phytoecdystéroïdes, codant l'arrêt de la prise alimentaire, qui semble être la deterrent cell.

L'ensemble de ces observations nous a mené à réfléchir sur la probabilité d'utiliser potentiellement les phytoecdystéroïdes comme pesticides.

Les phytoecdystéroïdes sont des antiappétents et simultanément des hormones de mue. Ils forment un moyen de lutte en agronomie très original qui nécessite encore beaucoup de travaux de laboratoire avant d'étudier leur efficacité sur le terrain. Comment pourrait-on envisager de les intégrer dans lutte biologique ou intégrée contre les ravageurs des cultures ? En fait, aucune étude n'a été faite sur l'efficacité des phytoecdystéroïdes dans les conditions extérieures de champ ou sous serre, aucune étude n'a traité l'acquisition de résistances vis à vis de ces molécules en cas où elles joueraient un rôle d'antiappétents insecticides. Ce genre d'études est prévu quand il est possible d'utiliser ces molécules en plein air ; on ne connaît pas actuellement leur faisabilité sur le terrain, ni leur photolabilité ni la résistance des ravageurs dans la nature vis à vis de ces molécules.

Une voie d'utilisation possible dans la protection des cultures serait de les associer avec d'autres produits antiappétents tels que l'azadirachtine. En combinant des modes d'action différents, l'on combinerait un antiappétent ayant un effet sur les récepteurs sensoriels et un autre ayant un effet toxique, ou un antiappétent inhibant les cellules réceptrices du sucre et responsables du comportement positif de choix alimentaire. Par cette combinaison, on pourrait éviter le phénomène d'habituation. Une autre voie est possible, en les combinant avec des agents de contrôle biologique par exemple une endotoxine. Des études récentes parlent de l'utilisation conjointe d'un limonoïde de citron et de la toxine de *Bacillus thuringiensis* (Messchendorp *et al.*, 1998). Par le biais de cette combinaison, le risque de rencontrer une résistance est faible ou nul.

Pour pouvoir intégrer les phytoecdystéroïdes dans la protection des cultures, beaucoup d'études restent à conduire. Pour obtenir un produit commercialisable, il va falloir cibler de grands ravageurs comme la Pyrale du maïs, et voir si l'extraction des phytoecdystéroïdes est assez facile et pas trop onéreuse ; comme pour l'azadirachtine, utilisée dans les pays en voie de développement et le marché américain. Il faudrait étudier ensuite, l'effet écologique d'une grande et large application de telles molécules sur les auxiliaires et l'environnement.

Un autre moyen de les introduire dans la lutte contre les ravageurs des cultures serait de les faire produire par les plantes elles-mêmes en manipulant le génome des plantes. C'est vrai que la manipulation du génome est possible, mais les voies de biosynthèses, de stockage et de transport sont encore mal connues.

Une autre stratégie consisterait à utiliser des agonistes et antagonistes des ecdystéroïdes qui ne sont pas facilement détoxiqués par les insectes herbivores. Une telle approche a déjà montré sa faisabilité chez les tiques, arthropodes hématophages qui détoxiquent les ecdystéroïdes ingérés en les conjuguant en position 22 avec des acides gras alors qu'ils sont très sensibles vis à vis des ecdystéroïdes ingérés lorsque la position 22 est modifiée (22-désoxy, 22-oxo ou 22-acétate) (Diehl *et al.*, 1985).

La 20E joue un rôle d'hormone antiappétente quand elle est synthétisée au niveau de la plante. Cette molécule appartient à une classe d'hormones qui ne suit aucune règle dans leur répartition au niveau de la plante ni au sein du règne végétal. De leur part, les insectes peuvent les éviter quand ils possèdent les récepteurs sensibles à ces hormones ou les détoxifier, une fois qu'ils les ont ingérées. La perception de cette molécule et de ces analogues, leurs effets sur les chimiorécepteurs et la modification de cette perception jouent un rôle fondamental chez les insectes. Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence pour la première fois une variabilité du profil de la perception sensorielle gustative avec l'âge, le milieu alimentaire, l'espèce et le régime alimentaire, ainsi que la modulation du comportement alimentaire par l'apport exogène de la molécule. L'étude de la perception gustative des phytoecdystéroïdes par les larves de la Pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* contredit l'hypothèse ravageur polyphage insensible aux antiappétents et participe à la recherche de l'antiappétent original mais pas nécessairement universel.



7 BIBLIOGRAPHIE

Adler, J. H., Grebenok, R. J. (1999) Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plants. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 34(4): 253-264.

Angioy, A. M., Liscia, A., Crnjar, R., Pietra, P. (1983) An endocrine control mechanism for chemosensillar activity in the blowfly. **Experientia** 39: 545-546.

Anton, S., Gadenne, C. (1999) Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 96(10): 5764-7.

Arnason, J. T*., et al.* (1985) Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis.* **Entomologia Experimentalis et Applicata** 38: 29-34.

Asaoka, K. (1996) Characteristics of gustatory impulse response to inositol in the maxillary styloconic sensilla of *Antheraea yamamai* larva. **International Journal of Wild Silkmoth & Silk** 2: 15-19.

Asaoka, K., Shibuya, T. (1995) Morphological and electrophysiological characteristics of the epipharyngeal sensilla of the silkworm, *Bombyx mori*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 77: 167-176.

Bandara, B. M. R., Jayasinghe, L., Karunaratne, V., Wannigama, G. P., Bokel, M., Kraus, W., Sotheeswaran, S. (1989) Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens*. **Phytochemistry** 28(4): 1073-1075.

Beckers, C., Maroy, P., Dennis, R., O'Connor, J. D., Emmerich, H. (1980) The uptake and release of ponasterone A by the Kc cell line of *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Endocrinology** 17(1): 51-9.

Bernays, E. A. (2001) Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. **Annual Review of Entomology** 46: 703-27.

Bernays, E. A., Chapman, R. F. (1994) **Host-plant selection by phytophagous insects**. New York, Chapman & Hall xiii, 312 pp.

Bernays, E. A., Chapman, R. F. (2000) A neurophysiological study of sensitivity to a feeding deterrent in two sister species of *Heliothis* with different diet breadths. **Journal of Insect Physiology** 46: 905-912.

Bernays, E. A., Glendinning, J. I., Chapman, R. F. (1998) Plant acids modulate chemosensory responses in *Manduca sexta* larvae. **Physiological Entomology** 23(3): 193-201.

Bernays, E. A., Oppenheim, S., Chapman, R. F., Kwon, H., Gould, F. (2000) Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: A behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars. **Journal of Chemical Ecology** 26(2): 547-563.

Bernays, E. A., Weiss, M. R. (1996) Induced food preferences in caterpillars: the need to identify mechanisms. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 78: 1-8.

Blackford, M. J. P. (1995) The significance of phytoecdysteroids in the diet of larval Lepidoptera. Biology. Exeter, University of Exeter**:** 272.

Blackford, M. J. P., Dinan, L. (1997) The effects of ingested 20-hydroxyecdysone on the larvae of *Aglais urticae*, *Inachis io*, *Cynthia cardui* (Lepidoptera, Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera, Arctiidae). **Journal of Insect Physiology** 43(4): 315-327.

Blaney, W. M., Schoonhoven, L. M., Simmonds, M. S. J. (1986) Sensitivity variation in insect chemoreceptors: a review. **Experientia** 42: 596-600.

Blaney, W. M., Simmonds, M. S. J., Ley, S. V., Katz, R. B. (1987) An electrophysiological and behavioural study of insect antifeedant properties of natural and synthetic drimane-related compounds. **Physiological Entomology** 12(281-291).

Bourguet, D., Bethenod, M. T., Pasteur, N., Viard, F. (2000) Gene flow in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: implications for the sustainability of transgenic insecticidal maize. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 267(1439): 117-22.

Bourguet, D., Bethenod, M. T., Trouve, C., Viard, F. (2000) Host-plant diversity of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: what value for sustainable transgenic insecticidal Bt maize? **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 267(1449): 1177-84.

Bowdan, E., Gordon, A. W. (1997) Removing antennae and maxillae has little effect on feeding on normal host plants by two species of caterpillar. **Journal of Insect Physiology** 43(11): 1053-1063.

Canney, P., Gardner, D. (1989) Effects of artificial and natural diets on success in tip recording and on galeal chemosensillum morphology of European corn borer larvae. **Physiological Entomology** 14: 13-19.

Caprio, J., Dudek, J., Robinson, J. J. (1989) II. Electro-olfactogram and multiunit olfactory receptor response to binary and trinary mixtures of amino acids in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of General Physiology** 93: 245-262.

Darazy, D. (1997) Perception des phytoecdystéroïdes par les larves de la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera, Pyralidae), Institut National Agronomique Paris-Grignon**:** 20.

de Boer, G. (1993) Plasticity in food preference and diet-induced differential weighting of chemosensory information in larval *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology** 39: 17-24.

de Boer, G., Dethier, V. G., Schoonhoven, L. M. (1977) Chemoreceptors in the preoral cavity of the tobacco hronworm *Manduca sexta* and their possible function in feeding behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 21: 287-298.

de Boer, G., Schmidtt, A., Zavod, R., Mitscher, L. A. (1992) Feeding stimulatory and inhibitory chemicals from an acceptable nonhost plant for *Manduca sexta:* Improved detection by larvae deprived of selected chemosensory organs. **Journal of Chemical Ecology** 18: 885-895.

del Campo, M. L., Miles, C. I., Schroeder, F. C., Mueller, C., Booker, R., Renwick, J. A. (2001) Host recognition by the tobacco hornworm is mediated by a host plant compound. **Nature** 411(6834): 186-9.

Descoins, C., Marion-Poll, F. (1999) Electrophysiological responses of gustatory sensilla of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera, Noctuidae) larvae to three ecdysteroids: ecdysone, 20-hydroxyecdysone and ponasterone A. **Journal of Insect Physiology** 45(10): 871-876.

Dethier, V. G. (1980) Evolution of receptor selectivity to secondary plant substances with special reference to deterrents. **American Naturalist** 115: 45-66.

Dethier, V. G., Crnjar, R. M. (1982) Candidate codes in the gustatory system of caterpillars. **Journal of General Physiology** 79(4): 549-69.

Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., Le, D. P. (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Review of Entomology** 43: 545-569.

Diehl, P. A., Connat, J.-L., Girault, J. P., Lafont, R. (1985) A new class of apolar ecdysteroid conjugates : esters of 20-hydroxyecdysone with long-chain fatty acids in ticks. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development** 8: 1-13.

Dinan, L. (1985) Ecdysteroid receptors in a tumorous blood cell line of *Drosophila melanogaster*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 2: 295-317.

Dinan, L. (1995) Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae. **European Journal of Entomology** 92(1): 295-300.

Dinan, L. (1998) A strategy towards the elucidation of the contribution made by phytoecdysteroids to the deterrence of invertebrate predators on plants. **Russian Journal of Plant Physiology** 45(3): 296-305.

Dinan, L., Savchenko, T., Whiting, P. (2001) On the distribution of phytoecdysteroids in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences** 58(8): 1121-32.

Dinan, L., Whiting, P., Alfonso, D., Kapetanidis, I. (1996) Certain withanolides from *Iochroma gesnerioides* antagonize ecdysteroid action in a *Drosophila melanogaster* cell line. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 80: 415-420.

Fiore, L., Corsini, G., Geppetti, L. (1996) Application of non-linear filters based on the median filter to experimental and simulated multiunit neural recordings. **Journal of Neuroscience Methods** 70(2): 177-184.

Frolov, A. N. (1994) Race formation in herbivorous insects: *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), a model. **Russian Journal of General Biology** 55(4-5): 464-476.

Gadenne, C., Anton, S. (2000) Central processing of sex pheromone stimuli is differentially regulated by juvenile hormone in a male moth. **Journal of Insect Physiology** 46(8): 1195-1206.

Gahukar, R. T., Chiang, H. C. (1976) Advances in European corn borer research. **Report on International Project on *Ostrinia nubilalis*, Phase III**, Martonsavar, Hungarian Academy of Sciences, 123-174 pp.

Glendinning, J. I. (1996) Is chemosensory input essential for the rapid rejection of toxic foods? **Journal of Experimental Biology** 199(Pt 7): 1523-34.

Glendinning, J. I., Brown, H., Capoor, M., Davis, A., Gbedemah, A., Long, E. (2001) A peripheral mechanism for behavioral adaptation to specific "bitter" taste stimuli in an insect. **Journal of Neuroscience** 21(10): 3688-96.

Glendinning, J. I., Domdom, S., Long, E. (2001) Selective adaptation to noxious foods by a herbivorous insect. **Journal of Experimental Biology** 204(Pt 19): 3355-67.

Glendinning, J. I., Ensslen, S., Eisenberg, M. E., Weiskopf, P. (1999) Diet-induced plasticity in the taste system of an insect: Localization to a single transduction pathway in an identified taste cell. **Journal of Experimental Biology** 202(15): 2091-2102.

Glendinning, J. I., Hills, T. T. (1997) Electrophysiological evidence for two transduction pathways within a bitter-sensitive taste receptor. **Journal of Neurophysiology** 78(2): 734-745.

Glendinning, J. I., Nelson, N. M., Bernays, E. A. (2000) How do inositol and glucose modulate feeding in *Manduca sexta* caterpillars? **Journal of Experimental Biology** 203 Pt 8: 1299-315.

Glendinning, J. I., Slansky, F. (1994) Interactions of allelochemicals with dietary constituents - effects on deterrency. **Physiological Entomology** 19(3): 173-186.

Glendinning, J. I., Tarre, M., Asaoka, K. (1999) Contribution of different bitter-sensitive taste cells to feeding inhibition in a caterpillar (*Manduca sexta*). **Behavioral Neuroscience** 113(4): 840-54.

Glendinning, J. I., Valcic, S., Timmermann, B. N. (1998) Maxillary palps can mediate taste rejection of plant allelochemicals by caterpillars. **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology** 183(1): 35-43.

Gothilf, S., Hanson, F. E. (1994) A technique for electrophysiologically recording from chemosensory organs in intact caterpillars. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 72: 304-310.

Grosmaitre, X. (2001) Modulation de la perception chimique par les amines biogènes chez *Mamestra brassicae* (Lepidoptera : Noctuidae) : étude

électrophysiologieque, moléculaire et comportementale. Spécialité: Sciences de la Vie, Physiologie des Invertébrés. Paris, Université de Paris 6**:** 124.

Hodgson, E. S. (1968) Taste receptors of arthropods. **Symposium of the Zoological Society of London** 23: 269-277.

Hodgson, E. S., Lettvin, J. Y., Roeder, K. D. (1955) Physiology of a primary chemoreceptor unit. **Science** 122: 417-418.

Huang, X. P., Renwick, J. A. (1997) Feeding deterrents and sensitivity suppressors for *Pieris rapae* larvae in wheat germ diet. **Journal of Chemical Ecology** 23(1): 51-70.

Huber, R., Hoppe, W. (1965) Zur Chemie des Ecdysons. VII . Die Kristall- und Molekülstruktur Analyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode. **Chemische Berichten** 98: 2403.

Hudon, M., LeRoux, E. J., Harcourt, D. G. (1986) Seventy years of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) research in North America. **Agricultural Zoology Reviews**. Russel, G. E. Dorset, UK, Intercept. 3: 53-96.

Ishikawa, S. (1966) Electrical response and function of a bitter substance receptor associated with the maxillary sensilla of the larva of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Cellular Physiology** 67(1): 1-11.

Ishikawa, Y., Takanashi, T., Kim, C., Hoshizaki, S., Tatsuki, S., Huang , Y. (1999) *Ostrinia* spp. in Japan: their host plants and sex pheromones. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 91: 237-244.

Isman, M. B. (1995) Lepidoptera: butterflies and moths. **The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants**. Schmutterer, H. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 299-318.

Jachmann, H., Zweypfenning, R. C. V. J., Van der Molen, J. N. (1982) Content of free cations in blowfly heamolymph affects taste receptor responses. **Journal of Insect Physiology** 28: 943-946.

Jermy, T. (1990) Prospects of antifeedant approach to pest control - a critical review. **Journal of Chemical Ecology** 16: 3151-3166.

Koolman, J. (1990) Ecdysteroids. **Zoological Science** 7: 563-580.

Kubo, I., Klocke, J. A., Asano, S. (1983) Effects of ingested phytoecdysteroids on the growth and development of two lepidopterous larvae. **Journal of Insect Physiology** 29(4): 307-316.

Kumar, G. L., Pophof, B., Kumar, S., Keil, T. A. (1998) Age-related changes in the dendrites of olfactory receptor neurons in the male silkmoth *Antheraea pernyi* (Insecta, Lepidoptera: Saturniidae). **Cell Biology International** 22(6): 445-55.

Lafont, R. (1997) Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 35(1-2): 3-20.

Lafont, R. (1998) Phytoecdysteroids in world flora - diversity, distribution, biosynthesis and evolution. **Russian Journal of Plant Physiology** 45(3): 276-295.

Lafont, R., Blais, C., Harmatha, J., Wilson, I. D. (2000) Ecdysteroids: Chromatography. **Encyclopaedia of Separation Science**, Academic Press: 2631-2640.

Lafont, R., Horn, D. H. S. (1989) Phytoecdysteroids : Structures and occurrence. **Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action**. Koolman, J. New York, Thieme Medical Publishers: 39-64.

Linn, C. E. J., Pool, K. R., Roelofs, W. L. (1994) Studies on biogenic amines and metabolites in nervous tissue and hemolymph of male cabbage looper moths - 3. Fate of injected octopamine, 5-hydroxyoctopamine and dopamine. **Comparative Biochemistry & Physiology. C, Comparative Pharmacology & Toxicology** 108(1): 99-106.

Lowery, D. T., Isman, M. B. (1996) Inhibition of aphid (Homoptera: Aphididae) reproduction by neem seed oil and azadirachtin. **Journal of Economic Entomology** 89: 602-607.

Ma, W.-C. (1969) Some properties of gustation in the larvae of *Pieris brassicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 12: 584-590.

Ma, W.-C. (1972) Dynamics of feeding responses in *Pieris brassicae* L. as a function of chemosensory input: a behavioural, ultrastructural and electrophysiological study. **Mededeelingen Landbouwhogeschool Wageningen** 72: 1-162.

Marion-Poll, F. (1995) Object-oriented approach to fast display of electrophysiological data under MS-Windows. **Journal of Neuroscience Methods** 63(1-2): 197-204.

Marion-Poll, F. (1996) Display and analysis of electrophysiological data under Windows(TM). **Entomologia Experimentalis et Applicata** 80(1): 116-119.

Marion-Poll, F., Descoins, C. (2002) Taste detection of phytoecdysteroids in larvae of *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis* and *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Insect Physiology** 48(4): 467-476.

Marion-Poll, F., Dinan, L., Lafont, R. (2002) La place des phytoecdystéroïdes dans la lutte contre les insectes phytophages. **Biopesticides d'origine végétale**. Regnault-Roger, C., Philogène, B. et Vincent, C. Paris, Editions Tech & Doc: 97-113.

Marion-Poll, F., Tobin, T. R. (1991) Software filter for detecting spikes superimposed on a fluctuating baseline. **Journal of Neuroscience Methods** 37(1): 1-6.

Marion-Poll, F., Van der Pers, J. N. C. (1996) Un-filtered recordings from insect taste sensilla. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 80(1): 113-115.

Messchendorp, L., Smid, H. M., van Loon, J. J. A. (1998) The role of an epipharyngeal sensillum in the perception of feeding deterrents by *Leptinotarsa decemlineata* larvae. **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology** 183(2): 255-264.

Mondy, N., Ustache, K., Darazy-Choubaya, D., Marion-Poll, F., Corio-Costet, M.-F. (1999) Effets de l'ingestion de *Serratula tinctoria* sur *Lobesia botrana* (Denis et Schiffer-Müller): développement et réponses gustatives. **Annales de la Société Entomologique de France** 35: 517-520.

Mordue, A. J. L., Blackwell, A. (1993) Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology** 39(11): 903-924.

Mullin, C. A., Chyb, S., Eichenseer, H., Hollister, B., Frazier, J. L. (1994) Neuroreceptor mechanisms in insect gustation: a pharmacological approach. **Journal of Insect Physiology** 11: 913-931.

Mutuura, A., Munroe, E. (1970) Taxonomy and distribution of the European corn borer and allied species: genus *Ostrinia* (Lepidoptera: Pyralidae). **Memoirs of the Entomological Society of Canada** 71: 1-112.

Nawrot, J., Harmatha, J. (1994) Natural products as antifeedant against stored product insects. **Post-Harvest News and Information** 5(2): 17-21.

Peterson, S. C., Hanson, F. E., Warthen, J. D. (1993) Deterrence coding by a larval *Manduca* chemosensory neurone mediating rejection of a non-host plant, *Canna generalis* L. **Physiological Entomology** 18(3): 285-295.

Phillips, C. E., Van de Berg, J. S. (1976) Directional flow of sensillum liquor in blowfly (*Phormia regina*) labellar chemorecptors. **Journal of Insect Physiology** 22: 425-429.

Pszczolkowski, M. A., Kuszczak, B. (1996) Effect of an ecdysone agonist, RH-5849, on wandering behaviour in *Spodoptera littoralis*. **Comparative Biochemistry & Physiology - C: Comparative Pharmacology & Toxicology** 113(3): 359-367.

Rees, C. J. C. (1970) Age-dependency of response in an insect chemoreceptor sensillum. **Nature** 227: 740-742.

Renwick, J. A. (2001) Variable diets and changing taste in plant-insect relationships. **Journal of Chemical Ecology** 27(6): 1063-76.

Renwick, J. A. A., Lopez, K. (1999) Experience-based food consumption by larvae of *Pieris rapae*: addiction to glucosinolates? **Entomologia Experimentalis et Applicata** 91(1): 51-58.

Reynolds, S. E., Yoemans, M. R., Timmins, W. A. (1986) The feeding behavior of caterpillars (*Manduca sexta*) on tobacco and artificial diet. **Physiological Entomology** 11: 39-51.

Roessingh, P., Hora , K. H., Fung, S. Y., Peltenburg, A., Menken, S. B. J. (2000) Host acceptance behaviour of the small ermine moth *Yponomeuta cagnagellus*: larvae and adults use different stimuli. **Chemoecology** 10(1): 41-47.

Roessingh, P., Hora , K. H., van Loon, J. J. A., Menken, S. B. J. (1999) Evolution of gustatory sensitivity in *Yponomeuta* caterpillars: sensitivity to the stereo-isomers dulcitol and sorbitol is localised in a single sensory cell. **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology** 184(1): 119-126.

Saxena, R. C. (1995) Homoptera: leaf and plant hoppers, aphids, psyllids, whiteflies and scale insects. **The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants**. Schmutterer, H. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 268-285.

Schmelz, E. A., Grebenok, R. J., Ohnmeiss, T. E., Bowers, W. S. (2000) Phytoecdysteroid turnover in spinach: Long-term stability supports a plant defense hypothesis. **Journal of Chemical Ecology** 26(12): 2883-2896.

Schmutterer, H. (1995) **The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants**. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft 366 pp.

Schoonhoven, L. M. (1967) Loss of plant specificity by *Manduca sexta* after rearing on an artificial diet. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 10: 270-272.

Schoonhoven, L. M. (1976) On the variability of chemosensory information. **Symposium Biologica Hungarica** 16: 261-266.

Schoonhoven, L. M. (1982) Biological aspects of antifeedants. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 10: 270-272.

Schoonhoven, L. M. (1987) What makes a caterpillar eat? the sensory code underlying feeding behavior. **Perspectives in chemoreception and behavior**. Chapman, R. F., Bernays, E. A. et Stoffolano, J. G. J. New York, Springer Verlarg: 69-97.

Schoonhoven, L. M., Blaney, W. M., Simmonds, M. S. J. (1992) Sensory coding of feeding deterrents in phytophagous insects. **Insect-Plant Interactions**. Bernays, E. A. Boca Raton, FL, CRC Press. 4: 59-79.

Schoonhoven, L. M., Fu-Shun, Y. (1989) Interference with normal chemoreceptor activity by some sequiterpenoid antifeedants in an herbivorous insect *Pieris brassicae*. **Journal of Insect Physiology** 35: 725-728.

Schoonhoven, L. M., Lin-er, L. (1994) Multiple mode of action of the feeding deterrent, toosendanin, on the sense of taste in *Pieris brassicae* larvae. **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology** 175(4): 519-524.

Schoonhoven, L. M., Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M. (1991) Changes in the responsiveness of the maxillary styloconic sensilla of *Spodoptera littoralis* to inositol and sinigrin correlate with feeding behaviour during the final larval stadium. **Journal of Insect Physiology** 31(4): 261-268.

Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A. (2002) An inventory of taste in caterpillars: each species has its own key. **Acta Zoologica Scientarium Hungaricae** 48: 215-263.

Shields, V. D. (1994) Ultrastructure of the uniporous sensilla on the galea of larval *Mamestra configurata* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Canadian Journal of Zoology** 72(11): 2016-2031.

Simmonds, M. S. J., Simpson, S. J., Blaney, W. M. (1992) Dietary selection behaviour in *Spodoptera littoralis*: the effects of conditioning diet and conditioning period on neural responsiveness and selection behaviour. **Journal of Experimental Biology** 162: 73-90.

Simpson, S. J., James, S., Simmonds, M. S., Blaney, W. M. (1991) Variation in chemosensitivity and the control of dietary selection behaviour in the locust. **Appetite** 17(2): 141-54.

Sláma, K. (1993) Ecdysteroids: insect hormones, plant defensive factors, or human medicine? **Phytoparasitica** 21: 3-8.

Smagghe, G., Bohm, G. A., Richter, K., Degheele, D. (1995) Effect of nonsteroidal ecdysteroid agonists on ecdysteroid titer in *Spodoptera exigua* and *Leptinotarsa decemlineata*. **Journal of Insect Physiology** 41(11): 971-974.

Smagghe, G., Gelman, D., Tirry, L. (1999) *In vivo* and *in vitro* effects of tebufenozide and 20-hydroxyecdysone on chitin synthesis. **Archives of Insect Biochemistry & Physiology** 41(1): 33-41.

Städler, E., Hanson, F. E. (1978) Food discrimination and induction of preference for artificial diet in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Physiological Entomology** 3: 121-133.

Städler, E., Schöni, R. (1991) High sensitivity to sodium in the sugar chemoreceptor of the cherry fruit fly after emergence. **Physiological Entomology** 16: 117-129.

Städler, E., Schöni, R., Kozlowski, M. W. (1987) Relative air humidity influences the function of the tarsal chemoreceptor cells of the cherry fruit fly (*Rhagoletis cerasi*). **Physiological Entomology** 12: 339-346.

Tanaka, Y. (1995) The different effects of ecdysone and 20-hydroxyecdysone on the induction of larval ecdysis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). **European Journal of Entomology** 92(1): 155-160.

Tanaka, Y., Asaoka, K., Takeda, S. (1994) Different feeding and gustatory responses to ecdysone and 20-hydroxyecdysone by larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Chemical Ecology** 20(1): 125-133.

Tanaka, Y., Naya, S. (1995) Dietary effect of ecdysone and 20-hydroxyecdysone on larval development of two lepidopteran species. **Applied Entomology and Zoology** 30(2): 285-294.

Tanaka, Y., Takeda, S. (1993) Ecdysone and 20-hydroxyecdysone supplements to the diet affect larval development in the silkworm, *Bombyx mori*, differently. **Journal of Insect Physiology** 39(10): 805-809.

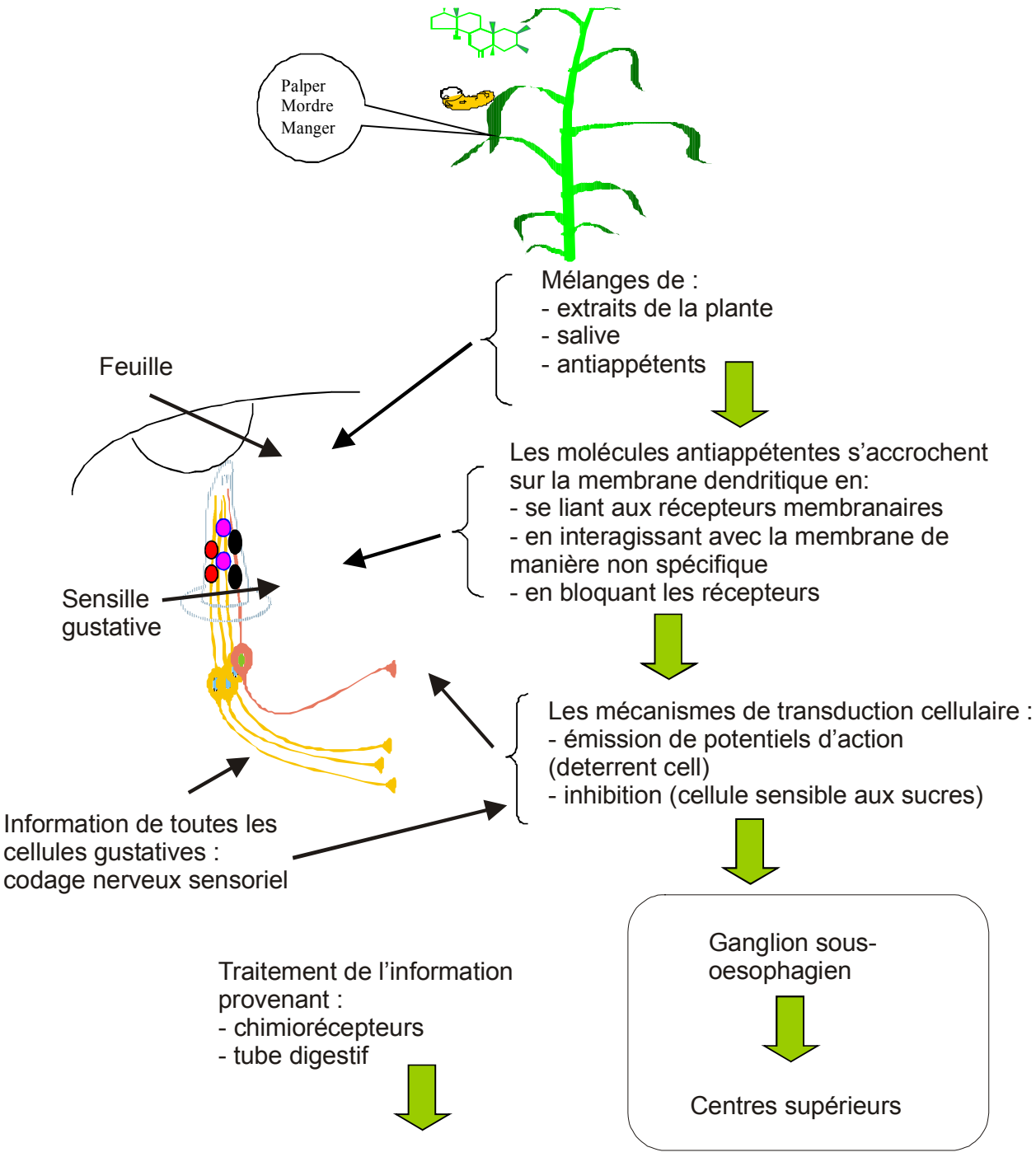
Tomaschko, K. H. (1999) Nongenomic effects of ecdysteroids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 41(2): 89-98.

van Drongelen, W. (1979) Contact chemoreception of host plant specific chemicals in larvae of various *Yponomeuta* species (Lepidoptera). **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology** 134: 265-279.

van Loon, J. J. A. (1990) Chemoreception of phenolic acids and flavonoids in larvae of two species of *Pieris*. **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology** 166: 889-899.

van Loon, J. J. A. (1996) Chemosensory basis of feeding and oviposition behaviour in herbivorous insects: a glance at the periphery. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 80: 7-13.

van Loon, J. J. A., Schoonhoven, L. M. (1999) Specialist deterrent chemoreceptors enable *Pieris* caterpillars to discriminate between chemically different deterrents. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 91(1): 29-35.


Palper
Mordre
Manger
Mélanges de :
- extraits de la plante
- salive
- antiappétents
Feuille
Les molécules antiappétentes s'accrochent sur la membrane dendritique en:
- se liant aux récepteurs membranaires
- en interagissant avec la membrane de manière non spécifique
- en bloquant les récepteurs
Sensille gustative
Les mécanismes de transduction cellulaire :
- émission de potentiels d'action (deterrent cell)
- inhibition (cellule sensible aux sucres)
Information de toutes les cellules gustatives : codage nerveux sensoriel
Ganglion sous-oesophagien
Centres supérieurs
Traitement de l'information provenant :
- chimiorécepteurs
- tube digestif
Comportement alimentaire!

8 ANNEXE I Photos d'*Ostrinia nubilalis*



Adulte de la Pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis).* Source INRA, centre de Versailles



Dégâts d'une chenille foreuse dans une tige de plante de maïs. Source INRA, Centre de Versailles.

9 ANNEXE II Composition du milieu alimentaire

Dans ce tableau figurent les quantités nécessaires pour la préparation d'un milieu alimentaire à couler dans une boîte d'élevage pour 40-50 chenilles.

Produit	**Quantité**
Eau	340 ml
Agar	8 g
Farine de maïs	56 g
Levure de bière	10 g
Germaline	14 g
Acide ascorbique	1 g
Acide benzoïque	0,3 g
Nipagine	0,25 g
Aldéhyde formique	0,3 ml
Caséïne	2,8 g
Fumidil B	0,55 g
Sel de Wesson	1 g
Vitamins Diet Fortifing Mixture (VDFM)	1,7 g
Acide sorbique	1 g

10 ANNEXE III: Analyse statistique

Les données analysées proviennent de la détection du nombre de potentiels d'action détectés durant la première seconde d'enregistrement. Ces données ont été regroupées dans un tableau comprenant toutes les observations. Elles ont été ensuite analysées sous SAS avec l'aide de Christine Durier, ingénieur à la station de Biométrie (INRA Versailles).

Chaque ligne contenait les informations suivantes :

INSECT	numéro d'identification de l'insecte (nos 1-81)
TYPE	type de sensille enregistrée (latérale ou médiale)
STIM	type de stimulation (noms abrégés des produits)
CONC	concentration (10^{-3}M à 10^{-7}M).
N1S	nombre de potentiels d'action mesurés.

Compte tenu de la conduite des expériences (3 standards, puis un produit testé à des concentrations croissantes), l'analyse a utilisé deux modèles différents.

1) Réponses aux standards

```
General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class Levels Values

INSECT 77 1 2 3 4 5 6 7 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44
45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63
```

64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81

STIM 3 20E inositol KCl

TYPE 2 Lat Med

Number of observations in data set = 844

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: N1S

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	81	1176947.9577	14530.2217	12.84	0.0001
Error	762	862529.4487	1131.9284		
Corrected Total	843	2039477.4064			

R-Square	C.V.	Root MSE N1S	Mean
0.577083	81.38390	33.644144	41.340047

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: N1S

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
INSECT	76	296265.14074	3898.22554	3.44	0.0001
STIM	2	131465.19766	65732.59883	58.07	0.0001
TYPE	1	476166.39364	476166.39364	420.67	0.0001
STIM*TYPE	2	273051.22561	136525.61281	120.61	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
INSECT	76	304185.52717	4002.44115	3.54	0.0001
STIM	2	140386.96951	70193.48475	62.01	0.0001
TYPE	1	481011.65203	481011.65203	424.95	0.0001
STIM*TYPE	2	273051.22561	136525.61281	120.61	0.0001

General Linear Models Procedure
Least Squares Means

STIM	TYPE	N1S Std Err	Pr > |T| LSMEAN

LSMEAN LSMEAN H0:LSMEAN = 0 Number

20E Lat 19.271385 2.758695 0.0001 1
20E Med 58.474590 2.892290 0.0001 2
inositol Lat 10.972970 2.883704 0.0002 3
inositol Med 107.913183 2.953576 0.0001 4
KCl Lat 23.450359 2.861402 0.0001 5
KCl Med 32.052430 2.952617 0.0001 6

General Linear Models Procedure
Least Squares Means

Least Squares Means for effect STIM*TYPE
Pr > |T| H0: LSMEAN (i)=LSMEAN (j)

Dependent Variable: N1S

i/j 1 2 3 4 5 6
1 . 0.0001 0.0366 0.0001 0.2897 0.0015
2 0.0001 . 0.0001 0.0001 0.0001 0.0001
3 0.0366 0.0001 . 0.0001 0.0020 0.0001
4 0.0001 0.0001 0.0001 . 0.0001 0.0001
5 0.2897 0.0001 0.0020 0.0001 . 0.0353
6 0.0015 0.0001 0.0001 0.0001 0.0353 .

2) Sensilles latérales

General Linear Models Procedure
Class Level Information
Class Levels Values

INSECT 73 1 2 3 4 5 6 7 14 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67
68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81

STIM 16 22EMeris 5-alpha- A B C Cannacen D E F G Inostero
Makister Pinotast Pteroste RH5849 RH5992

TYPE 1 Lat

CONC 5 -3 -4 -5 -6 -7

Number of observations in data set = 666

Dependent Variable: N1S
Sum of Mean

Source DF Squares Square F Value Pr > F

Model 144 411873.98117 2860.23598 4.68 0.0001

Error 521 318278.26508 610.89878

Corrected Total 665 730152.24625

R-Square C.V. Root MSE N1S Mean

0.564093 95.33824 24.716367 25.924925

Dependent Variable: N1S

Source DF Type I SS Mean Square F Value Pr > F

STIM 15 143645.16688 9576.34446 15.68 0.0001
INSECT*STIM 65 168968.63117 2599.51740 4.26 0.0001
CONC 4 5491.94846 1372.98711 2.25 0.0629
STIM*CONC 60 93768.23466 1562.80391 2.56 0.0001

Source DF Type III SS Mean Square F Value Pr > F

STIM 15 128019.58571 8534.63905 13.97 0.0001
INSECT*STIM 65 166809.16638 2566.29487 4.20 0.0001
CONC 4 3552.86453 888.21613 1.45 0.2150
STIM*CONC 60 93768.23466 1562.80391 2.56 0.0001

Dependent Variable: N1S

Tests of Hypotheses using the Type III MS for INSECT*STIM as an error term

Source DF Type III SS Mean Square F Value Pr > F

STIM 15 128019.58571 8534.63905 3.33 0.0004

Least Squares Means

Standard Errors and Probabilities calculated using the Type III MS for
INSECT*STIM as an Error term

STIM N1S Std Err Pr > |T|
LSMEAN LSMEAN H0:LSMEAN = 0

22EMeris 20.4874938 7.6313781 0.0092
5-alpha- 19.6827577 8.8594616 0.0298
A 38.5178996 8.0310739 0.0001
B 15.1925683 7.7472865 0.0542

C 6.2431882 10.5469337 0.5559
Cannacen 13.2193252 12.9063164 0.3095
D 11.2572568 9.0353116 0.2173
E 37.6614583 7.9090731 0.0001
F 52.4175573 7.4589346 0.0001
G 9.2828358 7.5291636 0.2220
Inostero 31.8153123 8.2009111 0.0002
Makister 46.4365139 7.2648741 0.0001
Pinotast 38.0406250 8.1340205 0.0001
Pteroste 30.2992754 15.9128928 0.0613
RH5849 2.7607762 9.8360236 0.7798
RH5992 16.9325318 7.5922206 0.0292

3) Sensilles médiales

SAS
General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class Levels Values

INSECT 75 1 2 3 4 5 6 7 12 14 15 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46
47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65
66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81

STIM 16 22EMeris 5-alpha- A B C Cannacen D E F G Inostero
Makister Pinotast Pteroste RH5849 RH5992

TYPE 1 Med

CONC 5 -3 -4 -5 -6 -7

Number of observations in data set = 657

Dependent Variable: N1S
Sum of Mean
Source DF Squares Square F Value Pr > F

Model 144 748500.72165 5197.92168 4.49 0.0001

Error 512 593334.66039 1158.85676

Corrected Total 656 1341835.38204

R-Square C.V. Root MSE N1S Mean

0.557819 85.42351 34.041985 39.850837

Dependent Variable: N1S

Source DF Type I SS Mean Square F Value Pr > F

STIM 15 315149.87230 21009.99149 18.13 0.0001
INSECT*STIM 65 248903.13298 3829.27897 3.30 0.0001
CONC 4 19520.06176 4880.01544 4.21 0.0023
STIM*CONC 60 164927.65462 2748.79424 2.37 0.0001

Source DF Type III SS Mean Square F Value Pr > F

STIM 15 266328.04152 17755.20277 15.32 0.0001
INSECT*STIM 65 227771.96703 3504.18411 3.02 0.0001
CONC 4 19319.19709 4829.79927 4.17 0.0025
STIM*CONC 60 164927.65462 2748.79424 2.37 0.0001

Dependent Variable: N1S

Tests of Hypotheses using the Type III MS for INSECT*STIM as an error term

Source DF Type III SS Mean Square F Value Pr > F

STIM 15 266328.04152 17755.20277 5.07 0.0001