



UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS

TOURS

Ecole Doctorale : Information Biologique

Environnement et Santé

Année Universitaire : 1998-1999



REGION
CENTRE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOURS

Discipline : Sciences de la vie

Par

FABRICE BÉNÉDET

Soutenance le 23 juillet 1999

Modalités de reconnaissance d'un ravageur, *Acrolepiopsis assectella*,
par son parasitoïde, *Diadromus pulchellus* :
identification et perception d'un signal polypeptidique

JURY :

R. BROSSUT	Directeur de Recherche - C.N.R.S. - Dijon	Rapporteur
Y. CARTON	Directeur de Recherche - C.N.R.S. - Gif sur Yvette	Rapporteur
J. F. FERVEUR	Chargé de Recherche - C.N.R.S. - Dijon	Examineur
J. HUIGNARD	Professeur - Université de Tours	Examineur
S. RENAULT	Maître de Conférences - Université de Tours	Examineur
E. THIBOUT	Directeur de Recherche - C.N.R.S. - Tours	Directeur de thèse

Avant-Propos

*Voilà, ma soutenance passée ! Il ne me reste plus qu'à écrire quelques lignes pour clôturer ce travail de quatre années pendant lesquelles bon nombre d'émotions se sont mêlées, des plus tristes aux plus joyeuses. Je suis très heureux d'avoir pu donner un peu plus de fierté à **mes parents**, leur soutien était des plus importants. Merci du fond du cœur. Mon seul regret sur ce parcours semé d'embûches ne peut s'exprimer par des mots « j'aurais tant aimé te faire partager ma joie, **Pépé** ».*

Enfin, tout ce travail n'aurait pu se faire sans l'appui de nombreuses personnes et je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail :

*Chaque **membre du jury** pour avoir accepté de juger ce long manuscrit.*

***Eric Thibout** pour son encadrement ainsi que pour ses conseils scientifiques au cours de ce travail de recherche.*

***Sylvaine Renault** et **Yves Bigot** pour m'avoir offert la possibilité de travailler au sein de l'équipe de génétique, pour leur encadrement scientifique de tout instant et leur soutien.*

***Sylvie Bigot** pour tous ses efforts dans le maintien de l'équilibre si fragile des élevages.*

***Martine Thiersault** pour m'avoir permis d'utiliser le si précieux lyophilisateur que j'ai eu l'occasion de malmener.*

***Christian Thibeau** pour tout le temps passé en microscopie électronique à balayage et **Jean-Claude Biémont** pour son aide ponctuelle en microscopie électronique.*

***Monique Lemesle** pour m'avoir formé aux techniques de préparation des échantillons pour la microscopie électronique ainsi que toute l'équipe du laboratoire de microscopie électronique de la faculté de Médecine de Tours, dirigé par B. Arbeille.*

***Sandra Ferrary** pour m'avoir formé et aidé en CLHP et CPG et **Nicole Mandon** pour sa disponibilité pour me faire les analyses de composition en acides aminés.*

***Francis Gauthier** pour avoir mis à ma disposition l'appareillage nécessaire à mes purifications ainsi que **Michèle Brillard** pour avoir réalisé les microséquençages et supporté mes échecs.*

***Bernard Castagna** de m'avoir donné la possibilité d'essayer de réaliser conjointement à ma thèse un projet de vulgarisation scientifique.*

***Nathalie** pour tes nombreuses corrections indispensables à la compréhension de ce manuscrit et pour toute une partie du travail réalisé (et à venir) qu'il m'était difficile de mener à terme sans ton investissement.*

***Thierry Leroy** pour m'avoir permis d'obtenir et d'enregistrer un résultat important (les si précieux PA).*

*Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour son accueil et sa gentillesse à mon égard, notamment : **Agnès, Carole, Christelle, Christine, Corinne, Elisabeth, Florence, George, Jean-Michel, Jean, Jérôme, Marie-Hélène, Marie-Véronique, Marylène...***

*Enfin, je veux remercier tous mes amis : **Ange, Antoine, Anne-Marie, Auguste, Bruno et Isabelle, Cass'role, Jean, Jemma et Graham, Kanou, Nathalie, Patricia et Philippe, Patricia et Jean-Fred, Rabbi, Sandra et Thierry, Sébastien, Séraphin, Sylvaine, Thalie d'amour, Thierry, Yann et Magalie, Zé** et tous ceux à qui je pense bien fort.*

Introduction Générale	11
Les parasitoïdes	12
Comportement de sélection de l'hôte chez les parasitoïdes	14
Les facteurs	15
Les récepteurs	16
Description du système hôte-parasitoïde étudié	17
L'hôte <i>Acrolepiopsis assectella</i> Zeller	17
Le parasitoïde <i>Diadromus pulchellus</i> Wesmael	17
La problématique	18
I Critères informatifs du comportement d'acceptation de l'hôte chez <i>D. Pulchellus</i>.	20
A) Introduction	21
L'acceptation de l'hôte dans le cycle du parasitoïde	21
Les facteurs impliqués	22
Connaissances sur le modèle	23
Test comportemental	24
B) Matériels et Méthodes	25
1 - Insectes	25
1-1 Elevage de l'hôte et du parasitoïde	25
1-2 Parasitoïdes utilisés pour les expériences	26
2 - Mise en place du test comportemental	27
3 - Comportement d'acceptation de l'hôte	27
4 - Extraction de substances actives	28
5 - Choix des tests statistiques	28
C) Résultats - Interprétations	29
1 - Description du comportement d'acceptation	29
1-1 Définition des étapes comportementales	29
1-2 Activité des organes impliqués	31
2 - Critères comportementaux utilisés dans les tests biologiques	32
3 - Importance du cocon	33
3-1 Durée de contact	33
3-2 Nombre moyen de contacts	34
3-3 Contacts mandibulaires et abdominaux	35
4 - Extraction de substances actives	35
4-1 Durée de contact	36
4-2 Nombre de contacts	37
4-3 Contacts mandibulaires et abdominaux	38
D) Discussion	39
Importance du contact de l'extrémité abdominale avec l'hôte	39
Importance du cocon comme source suffisante du signal kairomonal	40
Procédure expérimentale	41
Critères informatifs	42
Informations apportées par les extractions	43
Conclusion : Le test comportemental	44
II - Signal chimique issu du cocon déclenchant le comportement d'acceptation de l'hôte chez la femelle <i>D. pulchellus</i>	45
A) Introduction	46
Les kairomones	46
Principe de l'identification des kairomones de contact	47
B) Matériels et Méthodes	49
1 - Insectes, tests et critères comportementaux	49
2 - Caractérisation des kairomones du cocon	50

2-1 Sources potentielles de kairomones	50
2-2 Polarité	50
3 - Analyse qualitative en chromatographie en phase gazeuse	50
4 - Essai d'isolement de composés hydrophiles par fractionnement CLHP	51
5 - Isolement des polypeptides du cocon et élimination des petites molécules	52
5-1 Extrait à la guanidine – Dialyse et précipitation	52
5-2 Extrait à l'eau - Filtration	53
5-3 Tests comportementaux	53
6 - Dénaturation du cocon et des polypeptides isolés	53
6-1 Par l'acide périodique	53
6-2 Par l'action de N- et O-glycosidases	54
6-3 Par la pronase	54
6-4 Tests comportementaux	54
7 - Gels d'électrophorèse et coloration des polypeptides du cocon	55
8 - Composition en acides aminés des polypeptides du cocon	55
8-1 Polypeptides totaux natifs du cocon	55
8-2 Polypeptides isolés, natifs et dénaturés du cocon	56
8-3 Chromatographie Liquide Haute Performance	58
C) Résultats - Interprétations	58
1 - Activité des différentes sources potentielles de kairomones sur le comportement d'acceptation de l'hôte par <i>D. pulchellus</i>	58
2 - Polarité et nature des kairomones du cocon	59
3 - Analyse qualitative en chromatographie en phase gazeuse	60
4 - Essai d'isolement de composés hydrophiles par fractionnement CLHP	60
4-1 Le chromatogramme	61
4-2 Tests comportementaux	61
5 - Activité des extraits de cocon après élimination des petites molécules	62
6 - Caractérisation des polypeptides du cocon	63
6-1 Composition en polypeptides du cocon	63
6-2 Analyse des polypeptides du cocon solubles dans l'eau	63
6-3 Activité comportementale des chaînes polypeptidiques seules	65
7 - La spécificité des polypeptides du cocon	66
7-1 Polypeptides majeurs du cocon isolés par électroélution	66
7-2 Composition en acides aminés des différents polypeptides du cocon	66
D) Discussion	68
III Recherche des gènes codant pour les deux polypeptides intervenant comme signal kairomonal	72
A) Introduction	73
B) Homologie avec des séquences connues de séricine	76
1 - Hybridation avec une sonde du gène <i>Ser 1</i> de <i>B. mori</i>	76
1-1 Hybridation sur ADN génomique	76
1-2 Hybridation sur ARN	76
2 - Hybridation avec une sonde déduite d'une région conservée dans les séricines de <i>B. mori</i> et <i>G. mellonella</i>	78
2-1 Procédure	78
2-1 Résultats - Interprétation	79
C) Microséquençage des polypeptides du signal kairomonal	79
1 - Microséquençage en acides aminés de la partie NH ₂ terminale des deux polypeptides B1 et B2	80
1-1 Purification des polypeptides	80
1-2 Séquence des polypeptides	83
2 - Microséquençage en acides aminés d'un fragment peptidique interne aux polypeptides	84
2-1 Préparation des polypeptides et trypsinolyse	84
2-2 Purification des peptides par CLPH	85
2-3 Séquence	86
D) Recherche des gènes codant pour les polypeptides B1 et B2	87

1 - Oligonucléotides correspondant aux séquences NH ₂ terminales et internes des polypeptides B1 et B2	87
2 - Utilisation des oligonucléotides pour des amplifications PCR à partir d'ARNm	87
2-1 Procédure (Fig. 41)	87
2-2 Résultats	88
3 - Criblages des Banques « polyA » et « au hasard » afin d'obtenir les clones correspondant à la bande B1	89
3-1 Criblage des banques par une sonde radioactive	89
3-2 Criblage de la banque « au hasard » par amplification PCR	92
4 - Criblage de la Banque « polyA » afin d'obtenir les clones correspondant à la bande B2 par amplification PCR	93
E) Conclusion-Perspectives	94
<i>IV Organes sensoriels intervenant dans la perception des kairomones du cocon d'<i>A. assectella</i> par les femelles <i>D. pulchellus</i></i>	98
A) Introduction	99
Types de perception	99
Equipement sensoriel des insectes	101
Organes sensoriels impliqués dans la phase d'acceptation de l'hôte chez <i>D. pulchellus</i>	103
B) Matériels et Méthodes	104
1 - Préparation des organes sensoriels pour la microscopie électronique à balayage	104
2 - Préparation des organes sensoriels pour la microscopie électronique à transmission	105
3 - Tests électrophysiologiques : enregistrements « tip-recording » (une sensille)	106
4 - Tests comportementaux	107
4-1 Insectes, tests et critères comportementaux	107
4-2 Choix des tests statistiques	108
C) Résultats - Interprétations	108
1 - Etude morphologique : observations en microscopie électronique à balayage	108
1-1 L'antenne	108
1-2 Le proctigère	112
2 - Etude ultrastructurale : observations en microscopie électronique à transmission	113
3 - Premiers tests électrophysiologiques	115
4-1 Préambule aux tests électrophysiologiques	116
4-2 Tests électrophysiologiques	116
D) Discussion	117
Morphologie, ultrastructure et fonction des sensilles de l'antenne	117
Rôle probable des sensilles de types 1, 2 et 3 dans le comportement d'acceptation	119
Le proctigère	120
Perception de signaux chimiques	121
<i>Bibliographie</i>	127
<i>ANNEXES</i>	151

- Résumé -

Le principal signal chimique utilisé par l'endoparasitoïde solitaire *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera : Ichneumonidae) pour reconnaître et accepter son hôte, se situe au niveau du cocon de soie contenant la chrysalide d'*Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera : Acrolepiidae). Ce signal est perçu par la femelle parasitoïde lors des contacts antennaires avec le cocon.

Notre étude a tout d'abord consisté à confirmer la nature du signal intervenant lors de la phase comportementale d'acceptation de l'hôte et agissant comme stimulus d'identification. Pour ce faire, un **test biologique** a été mis au point afin de quantifier les critères comportementaux caractéristiques de la phase d'acceptation de l'hôte naturel.

La suite de l'étude s'est focalisée sur les composés chimiques du cocon d'*Acrolepiopsis assectella* qui déclenchent le comportement d'acceptation de la femelle parasitoïde, *D. pulchellus*. Des composés chimiques variés extraits du cocon, en plus des cocons eux-mêmes, ont été testés en comportement en utilisant un leurre en coton comme support inerte du stimulus tactile nécessaire. Les composés du cocon essentiels au déclenchement des séquences précoces du comportement d'acceptation de l'hôte ont été analysés par différentes méthodes de chimie analytique (chromatographies en phase liquide ou gazeuse) et de biochimie (électrophorèse, traitements enzymatiques). Finalement, l'analyse biochimique d'extraits aqueux de cocons associée à des tests comportementaux indiquent qu'un extrait contenant **4 glycopolypeptides purifiés** (90, 86, 78, 70 kDa) agit comme signal d'acceptation. L'information semble uniquement portée par la ou les chaînes polypeptidiques. La composition en acides aminés de ces 4 glycopolypeptides (correspondant à 2 polypeptides B1 et B2) et celle de 5 autres polypeptides majoritaires des extraits de lavages de cocons ont été obtenues par chromatographie liquide en phase inverse (couplée à la méthode Pico-Tag de Waters). Elle a permis de montrer la **spécificité** de composition de chacun des polypeptides.

La recherche des gènes codant pour chacun des 2 polypeptides (B1 et B2) du signal kairomonal a été entreprise. Cette recherche a consisté, soit en l'exploitation des connaissances acquises sur les protéines des cocons de soie d'autres Lépidoptères (*Bombyx mori* et *Galleria mellonella*), soit en l'utilisation de **microséquences en acides aminés** obtenues à partir de la partie NH₂-terminale des 2 polypeptides purifiés. Les microséquences ont été ensuite utilisées pour fabriquer des amorces oligonucléotidiques dégénérées servant à cribler des banques d'ADN complémentaires d'*A. assectella* ou à amplifier par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) les fragments d'ADN correspondant aux gènes codant pour ces deux polypeptides. Ces expériences n'ont pas encore permis d'obtenir les séquences nucléotidiques des gènes.

D'autre part, une étude morphologique et ultrastructurale utilisant la microscopie électronique, complétée par une étude électrophysiologique ont été réalisées afin de caractériser d'un point de vue fonctionnel les organes sensoriels impliqués dans la perception des kairomones du cocon. Sur les antennes des femelles *D. pulchellus*, 2 types de **sensilles chimioréceptrices de contact** susceptibles d'intervenir dans la perception de ce signal kairomonal de nature protéique ont été identifiés.

« Si vous voulez savoir comment fonctionnent les scientifiques, avait coutume de dire Einstein, n'écoutez pas ce qu'ils disent. Regardez ce qu'ils font. La plupart des gens voient dans la recherche scientifique un processus purement logique. Ils la considèrent comme une activité froide et rigoureuse. Aussi froide et rigoureuse qu'elle apparaît dans les manuels de science ou dans les livres d'histoire et d'épistémologie. D'un côté, les philosophes décrivent à l'infini la méthode hypothético-déductive. Ils analysent en détail le processus de découverte. Ils discutent de preuve et de réfutation. Ils parlent de vérité et de « vérisimilitude ». De l'autre côté, les scientifiques décrivent leur propre activité sous forme d'une suite bien ordonnée de concepts et d'expériences qui s'enchaînent dans un ordre strictement logique. Dans les articles scientifiques, la raison avance le long d'une voie royale menant de l'obscurité à la lumière. Pas la moindre erreur. Pas le moindre faux jugement. Pas de confusion. Rien qu'un raisonnement parfait, sans la moindre faille.

Et pourtant, quand on examine de plus près « ce que font les scientifiques », on constate avec étonnement que la recherche comporte en fait deux aspects qu'un bon auteur a appelés science de jour et science de nuit. La science de jour met en jeu des raisonnements qui s'articulent comme des engrenages, des résultats qui font la force de la certitude. On en admire la majestueuse ordonnance comme celle d'un tableau de Vinci ou d'une fugue de Bach. On s'y promène comme dans un jardin à la Française. Consciente de sa démarche, fière de son passé, sûre de son avenir, la science de jour avance dans la lumière et la gloire.

La science de nuit, au contraire, erre à l'aveugle. Elle hésite, trébuche, recule, transpire, se réveille en sursaut. Doutant de tout, elle se cherche, s'interroge, se reprend sans cesse. C'est une sorte d'atelier du possible où s'élabore ce qui deviendra le matériau de la science. Où les hypothèses restent sous forme de pressentiments vagues, de sensations brumeuses. Où les phénomènes ne sont encore qu'événements solitaires sans lien entre eux. Où les projets d'expérience ont à peine pris corps. Où la pensée chemine à travers des voies sinueuses, des ruelles tortueuses, le plus souvent sans issue. À la merci du hasard, l'esprit s'égare dans un labyrinthe sous un déluge

de messages en quête d'un signe, d'un clin d'œil, d'un rapprochement imprévu. Comme un prisonnier dans sa cellule, il tourne en rond, cherche une issue, une lueur. Sans s'arrêter, il passe de l'espoir à la déconvenue, de l'exaltation à la mélancolie. Rien ne permet de dire que la science de nuit passera jamais au stade de jour. Que le prisonnier sortira de l'ombre. Si cela survient, c'est de manière fortuite, comme un caprice. À l'improviste, comme une génération spontanée. N'importe où, n'importe quand, comme la foudre. Ce qui guide l'esprit alors ce n'est pas la logique. C'est l'instinct, l'intuition. C'est le besoin d'y voir clair. C'est l'acharnement à vivre. Dans l'interminable dialogue intérieur, parmi les innombrables suppositions rapprochements combinaisons associations qui sans cesse traversent l'esprit, un trait de feu parfois déchire l'obscurité. Eclaire soudain le paysage d'une lumière aveuglante, terrifiante, plus forte que mille soleils. Après le premier choc commence un dur combat avec les habitudes de pensée. Un conflit avec l'univers de concepts qui règle nos raisonnements. Rien encore n'autorise à dire si l'hypothèse nouvelle dépassera sa forme première d'ébauche grossière pour s'affiner, se perfectionner. Si elle soutiendra l'épreuve de la logique. Si elle sera admise dans la science de jour.

Lorsqu'il en vient à écrire un article pour publier le résultat de son travail, le scientifique, consciemment ou non, oublie la science de nuit pour ne plus parler que de science de jour. Il s'agit de mettre en ordre une masse de données récoltées au fil des mois et des années. De leur donner une forme dont on peut tirer une histoire raisonnable qui deviendra alors le compte rendu officiel de la recherche. Une histoire possédant assez de force et de persuasion pour convaincre les collègues. Pour les pousser à adopter votre point de vue et même pour éclairer leur propre recherche.

Etrange exercice en vérité. La science, c'est avant tout un monde d'idées en mouvement. Écrire pour rendre compte d'une recherche, c'est immobiliser ces idées ; les figer ; comme si l'on dépeignait une course de chevaux par un instantané. C'est aussi transformer la nature même de cette recherche ; la formaliser. Remplacer par un défilé bien ordonné de concepts et d'expériences un feuillet d'efforts désordonnés.

De tentatives nées d'un acharnement à voir plus clair. Mais aussi de visions de rêves de rapprochements imprévus de simplifications souvent enfantines de coups de sonde au petit bonheur, dans toutes les directions sans bien savoir où l'on va déboucher. Bref, le désordre et l'agitation qui animent la vie d'un laboratoire. Pourtant à mesure que la partie s'avance, comment ne pas chercher à s'avouer quelles ont été la part de hasard et celle de l'inspiration? Mais pour que soit accepté un travail, admise une nouvelle façon de penser, il faut épurer la recherche de toute scorie affective ou irritationnelle. La débarrasser de tout relent personnel, de toute odeur humaine. Parcourir la voie royale qui mène d'une jeunesse balbutiante à une maturité épanouie. Remplacer l'ordre réel des événements des découvertes par ce qui apparaît comme l'ordre logique, celui qui aurait dû être suivi si, au début, la conclusion avait été connue. Il y a un rite dans la manière de présenter les résultats scientifiques, un peu comme si l'on écrivait l'histoire d'une guerre d'après les seuls communiqués d'état-major ». (F. Jacob, 1987)

« Certaines substances vivantes ou mortes d'origine végétale ou animale déterminent chez les insectes des attractions qui déclenchent certains actes indispensables à la vie des individus ou de leur descendance. Elles revêtent de ce fait une importance considérable dans le comportement des espèces aussi nous les désignerons sous le terme d'attractions vitales pour les distinguer de celles qui s'exercent de la même manière, mais ne sont pas absolument indispensables à la vie de ces espèces.

L'attraction nutritive, d'oviposition ou de ponte, sexuelle, le repérage des matériaux indispensables à la confection de l'habitat ou des nids (insectes sociaux) sont des tropismes vitaux qui amènent la disparition des espèces s'ils ne s'exercent plus » (A. S. Balachowsky, 1951).



Introduction
Générale

Tout au long de leur vie, les animaux interagissent de façon constante avec d'autres formes de vie, soit animales appartenant à la même espèce ou à une espèce différente, soit végétales. Par ailleurs, chaque espèce étant adaptée à des conditions d'existence souvent très étroites, **percevoir** et **identifier** les informations émises par l'environnement est vital. Il n'est pas vraiment utile de recourir à de nombreux exemples pour souligner cette évidente nécessité. Pour exemple, pour se reproduire, l'animal doit percevoir et reconnaître les signaux émis par le partenaire sexuel spécifique ou le site de ponte adéquat de façon à favoriser le développement de sa descendance. Au niveau alimentaire, les phytophages doivent par exemple reconnaître les plantes toxiques ou peu nutritives de façon à les éviter. Au niveau social, de façon à éviter les interférences directes ou indirectes avec d'autres individus de la même espèce (territorialité, hiérarchie, ...) ou d'autres espèces (compétition interspécifique, rencontre proie/prédateur, ...), l'animal doit percevoir et reconnaître les signaux caractérisant l'individu ou l'espèce à éviter. La capacité à reconnaître des stimuli informatifs issus de son environnement, est constamment sollicitée chez l'animal.

Les insectes, de part leur nombre d'espèces important et leur diversité biologique regroupent un large panel des aspects associés à cette perception et à cette reconnaissance de signaux. Ils présentent des équipements sensoriels complexes et diversifiés, leur permettant de percevoir des informations de nature et d'origine variées. Confrontés à leur environnement, ils présentent une grande diversité de comportements dont finalement leur survie et leur reproduction dépendent.

L'importance de la **perception** et de la **reconnaissance** des **signaux** perçus est particulièrement présente dans le contexte des **interactions insecte hôte / parasitoïde**.

Les parasitoïdes

Le terme "parasitoïde" a été introduit par Reuter en 1913 pour distinguer les parasites *sensu-stricto* de certaines espèces qui parasitent uniquement pendant leur stade immature. Depuis, d'autres définitions plus précises ont été formulées pour décrire leur mode de vie intermédiaire entre les prédateurs et les parasites vrais. Doult (1959) leur attribue les caractéristiques suivantes :

- l'individu parasitoïde en se développant, tue son hôte,
- seul le stade immature est parasite tandis que l'adulte mène une vie libre,
- il ne change pas d'hôte au cours de son développement,
- il est relativement grand en taille en comparaison de son hôte,
- son hôte est en général de la même classe taxonomique,

- son action ressemble plus à celle de prédateurs qu'à celle de parasites vrais.

Price (1984) décrit le parasitoïde comme “ *a species of **insect** that requires and eats only one animal in its life span by living parasitically as larva on a host; but the adult is free-living and may ultimately kill many hosts by leaving eggs or larvae near or on the host, that eventually consume the host*”, et Gauld et Bolton (1988) comme “ ***an insect** whose larvae develop by feeding on or within an arthropod host, and this host individual is almost always killed by the developing parasitoid larva*”.

Une composante taxonomique s'est ensuite ajoutée à la composante fonctionnelle qui semble se référer uniquement aux espèces Hyménoptères (Eggleton & Gaston, 1990). Pourtant, si les Hyménoptères parasitoïdes sont les plus représentés, certains Diptères, Coléoptères, et Neuroptères peuvent également être parasitoïdes. Une définition récente, uniquement basée sur un aspect fonctionnel : “ *an organism which develops on or in another single (“host”) organism, extracts nourishment from it, and kills it as a direct or indirect result of that development*”, pourrait concerner un plus grand nombre encore d'espèces, tels que des nématodes ou des champignons (Eggleton & Gaston, 1990). Des organismes provoquant une mort reproductive de leurs hôtes comme certains crustacés pourraient également répondre à cette définition (Kuris, 1974). Le sens le plus restrictif reste néanmoins le plus utilisé par les biologistes. Il permet de garder une certaine cohésion dans la description des différents modes de vie des **insectes parasitoïdes**.

Ces insectes font face à une multitude de problèmes biologiques similaires, qu'ils doivent résoudre pour survivre et la diversité des comportements rencontrés chez ces parasitoïdes provient en particulier de leur association étroite avec leur(s) hôte(s) (Godfray, 1994).

Les études menées sur les parasitoïdes ont tout d'abord été suscitées par la prise de conscience de leur rôle potentiel dans le contrôle des effectifs d'insectes nuisibles à l'homme, essentiellement au niveau agronomique (Doutt *et al.*, 1976 ; Waage & Hassell, 1982 ; Van Lenteren, 1986 ; Greathead, 1986 ; Hassell, 1986 ; Lawson, 1986 ; Jervis & Kidd, 1996). La constatation de leur utilité en lutte biologique a focalisé et focalise toujours les recherches sur des aspects de leur biologie et de leur écologie. Les champs d'intérêt sont vastes et incluent, parmi tant d'autres, le nombre d'oeufs, la sexe ratio, la dynamique des populations, la physiologie, les stratégies d'exploitation de l'hôte selon les théories de l'“Optimal foraging” (Doutt, 1959 ; Hamilton, 1967 ; Charnov, 1976 ; Vinson, 1975b, 1976 ; Vinson & Iwantsch, 1980 ; Waage, 1986 ; Strand, 1986 ; Mangel, 1987, 1989 ; King, 1992 ; Godfray, 1994 ; Kidd & Jervis, 1996 ; Quicke, 1997).

Plus récemment, les communautés parasitaires ont été étudiées comme d'importants systèmes écologiques en eux-mêmes (Askew & Shaw, 1986 ; Eggleton & Belshaw, 1992). Les systèmes hôtes / parasitoïdes offrent des opportunités sans pareil pour examiner des questions fondamentales de comportement et d'écologie évolutive (Godfray, 1994 ; Feener & Brown, 1997) conduites majoritairement au niveau du processus de sélection de l'hôte.

Comportement de sélection de l'hôte chez les parasitoïdes

L'étude des comportements présentés au cours du processus de sélection de l'hôte a vu naître deux approches différentes.

La première, dans les années 30, s'est attachée à comprendre les mécanismes comportementaux mis en jeu par le parasitoïde pour localiser son hôte et à ne plus donner un rôle exclusif au hasard (De Bach, 1964 ; Rogers, 1972) ou à l'instinct (Fabre, 1879 - 1907 ; Thompson & Parker, 1927). Les différentes études ont révélé les assemblages complexes des pistes utilisées par les parasitoïdes, la plasticité des réponses et l'importance de l'apprentissage.

La deuxième, dans les années 70, s'est basée sur la théorie de l'"Optimal Foraging" qui vise à prédire les comportements en prenant comme hypothèse qu'ils doivent être optimisés par la sélection naturelle (Charnov, 1976 ; Van Alphen & Vet, 1986 ; Mangel, 1989, 1992 ; Godfray, 1994). Compte tenu de notre problématique, cette deuxième approche ne sera pas développée.

La conceptualisation des comportements de localisation de l'hôte par les parasitoïdes s'appuie sur une vision hiérarchique et statique de leur comportement. Salt (1935) et Laing (1937) font intervenir une composante écologique, l'habitat de l'hôte, et une composante "psychologique", l'hôte. Il n'y a ensuite qu'un pas vers la division du parasitisme "avec succès" en processus hiérarchique plus précis (**Fig. 1**) : ❶ localisation de l'habitat de l'hôte, ❷ localisation de l'hôte, ❸ acceptation de l'hôte, ❹ convenance de l'hôte et même ❺ régulation de l'hôte (Doutt, 1964 ; Vinson, 1976, 1985 ; Vinson & Iwantsch, 1980 ; Nordlund *et al.*, 1981 ; Van Lenteren, 1981 ; Weseloh, 1981 ; Van Alphen & Vet, 1986 ; Wellings, 1991). Ces étapes ne sont que des subdivisions du processus de sélection de l'hôte (Pour revue Vinson, 1984, 1985). Chacune de ces étapes peut à son tour être subdivisée en phases comportementales plus précises dépendant généralement du type d'hôte attaqué (Vinson, 1985). L'étape d'acceptation d'un hôte immobile par un Hyménoptère parasitoïde peut ainsi être subdivisée en 4 phases successives caractérisées par des comportements précis : ❶ examen

antennaire, ② examen par l'ovipositeur, ③ piqûre et ④ ponte (Schmidt, 1974 ; Arthur, 1981 ; Vinson, 1985).

Les facteurs

Les différentes étapes du processus de sélection de l'hôte sont successivement franchies suite à la perception d'une cascade de nombreux facteurs tant physiques que chimiques. Ces facteurs peuvent agir séparément ou en synergie et induire certains des comportements présentés par la plupart des espèces parasitoïdes (Vinson, 1976, 1985 ; Arthur, 1981 ; Weseloh, 1981 ; Quicke, 1997).

Les facteurs physiques de l'hôte, commencent à jouer un rôle important à courte distance ou lorsque débute par contact l'examen de l'hôte. Un nombre important de facteurs physiques ont déjà été étudiés. Ils incluent le son, le mouvement, les vibrations, la taille, la forme, la texture et les rayonnements lumineux dans le visible ou l'infra-rouge. Certains de ces facteurs apparaissent beaucoup plus importants lors de certaines étapes du processus de sélection de l'hôte (Vinson, 1985 ; Schmidt, 1991).

Les composés chimiques, quant à eux, interviennent à chacune des étapes préovipositionnelles et apparaissent les stimuli majeurs impliqués (Vinson, 1985, 1991). Ils sont définis sur les bases de leur origine et des réponses comportementales qu'ils déclenchent (Brown *et al.*, 1970). Ainsi, les termes sémiouchimiques (Nordlung & Lewis, 1976) ou infochimiques (Dicke & Sabelis, 1992) ont été utilisés pour désigner les composés chimiques qui conduisent à des interactions entre les organismes. Ils regroupent les phéromones (Law & Regnier, 1971 ; Ali & Morgan, 1990) intervenant dans les interactions intraspécifiques et les allélochimiques intervenant dans les relations interspécifiques (Ritter, 1979). Les allélochimiques sont subdivisées en trois autres catégories : les allomones¹, les kairomones², les synamones³ (Nordlung & Lewis, 1976 ; Nordlund, 1981 ; Dicke & Sabelis, 1988, 1992 ; Lewis & Martin, 1990). L'utilisation d'une telle terminologie concerne néanmoins un contexte de transfert d'informations chimiques qu'il convient de préciser lors de l'étude. En effet, un même composé peut à la fois servir de phéromone pour le rapprochement des sexes chez une espèce et de kairomone qui attire des prédateurs ou des parasitoïdes de l'espèce émettrice.

Ces composés chimiques peuvent également être divisés sur des bases chimiques (volatils ou non) ou selon la nature du signal chimique agissant (odorant ou de contact). Les

¹ Composés donnant un avantage adaptatif à l'organisme émetteur.

² Composés donnant un avantage adaptatif à l'organisme receveur.

³ Composés donnant un avantage adaptatif aux deux organismes, émetteur et receveur.

composés volatils ou signal “odorant” peuvent être classés soit dans ceux perceptibles à distance (sous 1 mètre et plus), soit dans ceux perceptibles à courte distance (dans les quelques centimètres de la source) (Kennedy, 1977) tandis que ceux de contact sont perçus uniquement lorsque l’insecte touche la source du composé (Vinson, 1977).

Sur l’ensemble de ces composés, ceux associés à l’hôte lui même (**kairomones**) ont fait l’objet de nombreuses études, qu’il s’agisse de l’identification de la source ou de leur caractérisation (Vinson, 1991).

Les récepteurs

Les organes récepteurs impliqués dans la perception des différents facteurs ont été largement étudiés mais le plus souvent d’un point de vue intuitif, suite à des observations comportementales ou dans quelques rares cas, suite aux ablations des organes suspectés (Labeyrie, 1960 ; Weseloh, 1972 ; Norton & Vinson, 1974). Ceci a conduit à un grand nombre de spéculations concernant la position des récepteurs sensoriels impliqués dans l’étape de localisation ou d’acceptation de l’hôte. Les antennes, l’ovipositeur, les tarse ou les yeux sont très souvent identifiés comme jouant un rôle important dans la perception de l’hôte et dans son acceptation (Revue de Quicke, 1997).

L’antenne est l’organe qui a fait l’objet du plus d’attention, sans doute à cause du changement de mouvements qu’elles effectuent lorsque la femelle parasitoïde se retrouve en présence de stimuli issus de l’hôte (Bogenschütz, 1978 dans Vinson, 1985).

L’ovipositeur des parasitoïdes, reconnu comme important dans le processus de sélection de l’hôte et notamment dans l’étape de discrimination de la qualité de l’hôte, a fait l’objet de nombreuses observations morphologiques (Van Lenteren, 1981 ; Nelson & Roitberg, 1993 ; Quicke, 1997).

Les tarse quant à eux, semblent jouer un rôle plus important chez les parasitoïdes appartenant à l’ordre des Diptères (Askew, 1971 ; Feener & Brown, 1997) que chez les Hyménoptères.

Depuis Slifer (1969), différents types de récepteurs décrits essentiellement sur la base de critères morphologiques ont été mis en évidence chez les parasitoïdes. Par contre, les études démontrant la relation entre un morphotype de récepteur particulier et la perception d’un stimulus responsable de l’induction d’un comportement sont plus rares. Souvent, c’est la présence de récepteurs dans des régions spécifiques de l’antenne ou de manière dimorphique entre les sexes qui a permis de les associer à un comportement particulier de sélection de l’hôte (Norton & Vinson, 1974 ; Dmoch & Rutkowska-Ostrowska, 1978 ; Barlin *et al.*, 1981 ; Isidoro

et al., 1996).

Description du système hôte-parasitoïde étudié

L'hôte Acrolepiopsis assectella Zeller

La teigne du poireau, *A. assectella* (Lepidoptera, Yponomeutoïdea, **Fig. 2a** et **2b**), est un microlépidoptère inféodé aux plantes du genre *Allium* (Alrouz & Thibout, 1988). Sa morphologie a été bien décrite par Frediani (1954). Il s'agit d'une espèce à large aire de répartition géographique, puisqu'elle couvre une aire allant de l'Algérie au Sud, jusqu'en Norvège au nord et la Russie à l'est. Cependant, son aire de répartition semble essentiellement européenne (Noyes, 1974 ; Thibout, 1978). Sa biologie a été résumée par Labeyrie (1966) : l'espèce polyvoltine effectue 3 à 4 générations par an en France (Labeyrie, 1956) et présente une diapause reproductrice hivernale (Thibout, 1981). Attirée à distance par la plante-hôte (Thibout *et al.*, 1982 ; Lecomte & Thibout, 1984a), les femelles accouplées pondent sur les limbes des feuilles. Les larves se développent dans les parenchymes foliaires essentiellement dans les parties aériennes de la plante. La nymphose s'effectue sur la plante-hôte et fait intervenir un phototropisme et un géotropisme négatifs (Thibout & Nowbahari, 1987). Pour sa nymphose, elle tisse un **cocon** fusiforme à larges mailles, ouvert aux extrémités permettant ainsi l'émergence du futur imago.

Le parasitoïde Diadromus pulchellus Wesmael

L'Hyménoptère parasitoïde *D. pulchellus* (**Fig. 2c**) est un Ichneumonidae endoparasitoïde solitaire des chrysalides d'*A. assectella*, présentant une reproduction sexuée et une parthénogénèse arrhénotoque. D'après la littérature, cet insecte serait spécialiste de la teigne (Labeyrie, 1960 ; Rojas-Rouse, 1980 ; Kalmès, 1984) même si en condition de laboratoire il peut parasiter les chrysalides de la teigne du chou (*Plutella xylostella* (= *maculipennis*) L.) (Thibout, 1988). Cette espèce semble avoir une aire de répartition limitée aux régions tempérées, avec une localisation plutôt atlantique (Kalmès, 1984). Sa biologie et sa physiologie ont été étudiées par ces mêmes auteurs : attirée à distance par la plante-hôte et par les fèces larvaires d'*A. assectella* (Lecomte & Thibout, 1984b, 1986), la femelle de *D. pulchellus* se pose ensuite sur un pied de poireau jusqu'à la découverte d'une chrysalide-hôte dans son cocon. Un seul œuf est pondu dans la chrysalide. Les différentes étapes entre la rencontre et la ponte seront détaillées au chapitre I. Tout le développement préimaginal

s'effectue à l'intérieur de l'hôte jusqu'à l'émergence de l'imago.

La problématique

Le but de ce travail est **de caractériser les signaux** émis par l'hôte, *Acrolepiopsis assectella*, impliqués durant la phase d'acceptation de l'hôte, dans sa reconnaissance par le parasitoïde *Diadromus pulchellus* et **d'identifier l'équipement sensoriel** impliqué dans la perception de tels signaux.

L'intérêt d'étudier cette problématique chez un système hôte / parasitoïde tel que *A. assectella* / *D. pulchellus* se situe à différents niveaux.

Premièrement, *D. pulchellus* étant une espèce spécialiste, aucune autre espèce que *A. assectella* ne semble pouvoir être utilisé comme hôte de substitution dans la nature. La nécessité pour le parasitoïde de trouver et reconnaître l'hôte spécifique est de ce fait très forte. Par ailleurs, l'étroitesse des relations est également reflétée au niveau tritrophique puisque la teigne du poireau est elle-même inféodée aux *Alliums*, aspect laissant supposer que la plante pourrait interagir avec le parasitoïde.

Deuxièmement, l'hôte est à l'état naturel entouré d'un cocon de soie qui constitue une "barrière" non seulement physique mais aussi chimique pour le parasitoïde. *D. pulchellus* doit entrer en contact avec le cocon avant de pouvoir atteindre et pondre à l'intérieur de l'hôte. Avec ce système hôte, se pose la question exacte du rôle du cocon dans la phase d'acceptation de l'hôte par *D. pulchellus*.

Troisièmement, du fait de la présence de l'hôte dans une structure relativement hermétique, le comportement de la femelle parasitoïde mise en présence d'une chrysalide dans son cocon d'*A. assectella* devrait être extrêmement développé. En effet, d'après les exemples décrits dans la littérature, ce comportement s'accompagne d'une succession de séquences comportementales sollicitant plusieurs organes sensoriels et des examens prolongés et complexes du système hôte.

Enfin, compte tenu de la taille respective des deux espèces concernées, il s'avère possible d'observer au microscope optique voire même *de visu*, les différents comportements de la femelle *D. pulchellus* traduisant la phase de reconnaissance de l'hôte et éventuellement son acceptation pour la ponte.

Pour répondre à cette problématique, la procédure suivie s'est voulue pluridisciplinaire, c'est à dire s'attachant à différents niveaux de l'écologie et de la biologie de *D. pulchellus* en présence de son hôte : cocon - chrysalide d'*A. assectella*.

Dans un premier temps, je me suis attaché à décrire le **comportement** d'acceptation de

l'hôte par le parasitoïde afin de confirmer la **nature du signal kairomonal** et d'en vérifier la **source** (chapitre I). Un test comportemental permettant d'observer une série de critères comportementaux quantifiables et caractéristiques de la phase d'acceptation a pu être établi.

Dans un deuxième temps, le signal kairomonal impliqué dans l'acceptation de l'hôte a été analysé. Pour cela, différentes méthodes faisant appel à des techniques chromatographiques et biochimiques associées à des tests comportementaux ont été utilisées pour caractériser et mieux **cerner la spécificité de ce signal** (chapitre II).

Dans un troisième temps, une étude au **niveau moléculaire** a été entreprise, afin d'identifier les gènes codant pour le signal kairomonal (chapitre III).

Finalement, le **niveau sensoriel** a été étudié en utilisant les techniques de microscopie électronique et d'électrophysiologie afin d'identifier les récepteurs impliqués dans la perception du signal kairomonal (chapitre IV).

**I Critères informatifs
du comportement
d'acceptation de l'hôte
chez *D. Pulchellus*.**

A) Introduction

L'acceptation de l'hôte dans le cycle du parasitoïde

Le processus de sélection de l'hôte par un insecte parasitoïde passe par un certain nombre d'étapes ou phases. La **phase d'acceptation** de l'hôte est l'une d'entre elle. Dans le cycle du parasitoïde, elle fait suite à l'étape de localisation de l'hôte et se termine par la ponte ou le rejet de l'hôte (Doutt, 1959,1964 ; Vinson, 1975a, 1976, 1984 ; Arthur, 1981). Elle est l'expression de l'intégration nerveuse d'au moins deux paramètres distincts. Le premier s'inscrit dans l'aptitude à **identifier l'hôte** c'est à dire essentiellement l'espèce-hôte. Elle s'exprime à la suite de la perception de facteurs directement ou indirectement issus de l'hôte (*frass*⁴, fèces...). Le second s'inscrit dans la **capacité à évaluer la "qualité" relative de l'hôte** pour le développement de sa descendance. Cette capacité s'exprime suite à la perception de facteurs indiquant par exemple l'état de parasitisme ou encore la qualité nutritive de l'hôte (Vinson, 1976 ; Van Lenteren, 1981). Toute une succession de facteurs, intervenant parfois dans plusieurs étapes à la fois, amène le parasitoïde à proximité de l'hôte ou l'en éloigne (De Bach, 1944 ; Price, 1970).

Cette phase d'acceptation de l'hôte a été subdivisée en étapes comportementales et selon les auteurs peut couvrir un plus ou moins grand nombre d'événements.

Schmidt (1974) subdivise la phase d'acceptation en 4 principaux comportements entre le moment où le parasitoïde est au contact de l'hôte et l'oviposition : examen de l'hôte au moyen des antennes, examen de l'hôte au moyen de l'ovipositeur, insertion de l'ovipositeur ou piqûre de l'hôte et ponte. Le degré de développement de chacun de ces comportements varie avec les stratégies d'exploitation de l'hôte adoptées par les insectes parasitoïdes (Vinson, 1975b). L'exploitation d'hôtes actifs tels que des larves semble réduire ces comportements alors qu'une exploitation d'hôtes sessiles (œufs, nymphes) et/ou présents à l'intérieur d'une enveloppe (galle, feuille enroulée, graine) exacerbe leur expression. Par exemple, les examens antennaires sont plus intenses (Vinson, 1985).

Cette période comprise entre le moment où il y a contact avec l'hôte et la ponte ou le rejet de l'hôte est aussi appelée "**phase de reconnaissance de l'hôte**" (Weseloh, 1974). En

⁴ Traces d'insectes constituées d'un ensemble d'éléments laissés au cours de leur vie. Elles comprennent aussi bien les fèces, que les exuvies, fils de soie pour certaines larves, débris alimentaires...

1991, Schmidt définit cette “phase de reconnaissance” plus largement, comme étant le processus durant lequel un parasitoïde identifie et caractérise un hôte potentiel ou un site d’oviposition. Cette dernière définition moins restrictive permet d’associer plus étroitement facteurs de reconnaissance et comportement de reconnaissance. En effet, ce processus de reconnaissance se déroule pour l’essentiel durant l’étape d’acceptation mais aussi durant une partie de la phase de localisation de l’hôte. Dès l’instant, où un facteur de l’hôte (“*frass*”, fèces...) est rencontré par le parasitoïde, il peut y avoir reconnaissance (Alborn *et al.*, 1995). Par exemple, une espèce de Diptère larvipare n’a pas besoin de rencontrer l’hôte pour expulser sa larve, mais uniquement des “*frass*” (Clément *et al.*, 1986).

La définition de Weseloh (1974), “**période comprise entre le moment où il y a contact avec l’hôte et la ponte ou le rejet de l’hôte**”, laquelle définit clairement les étapes comportementales de proximité, est généralement retenue dans la littérature et sera conservée pour notre étude. Ses étapes se déroulent à l’intérieur de la phase d’acceptation de l’hôte et correspondent à la période comportementale à laquelle je me suis réellement intéressé. Celle-ci sera étudiée et décrite plus loin dans le chapitre. Lorsque l’hôte est remplacé par un leurre, le comportement d’acceptation est assimilé à l’étape d’identification de l’hôte puisqu’il n’y a jamais ponte sur le leurre.

Les facteurs impliqués

Les facteurs impliqués dans le **processus de sélection** de l’hôte peuvent avoir deux origines : **l’hôte ou son environnement immédiat**.

Une première synthèse des travaux réalisés, combinant la source des kairomones et le comportement induit suite à leur perception a été faite par Waage (1978) (**Tableau 1**). Ces premières études nous indiquent que la perception de ces kairomones semble déclencher une séquence comportementale spécifique.

Ainsi, un certain nombre de kairomones dites “d’arrêt” interviennent lors de la phase de prospection, et entraînent une réduction de la distance parasitoïde - hôte ou de l’aire couverte par unité de temps par les parasitoïdes cherchant un hôte (Dethier *et al.*, 1960 ; Takabayashi *et al.*, 1985 ; Takabayashi & Takahashi, 1986a, b).

L’acceptation de l’hôte et plus précisément le processus d’identification de l’hôte a été attribué à la perception de facteurs physiques et/ou chimiques généralement directement associés à l’hôte, son enveloppe ou à des éléments dérivés (Arthur, 1981).

Les **facteurs physiques** peuvent être perçus et identifiés par mécanoréception. Il existe

trois catégories de facteurs physiques : les stimuli vibratoires incluant le son, les stimuli visuels et les stimuli tactiles tels que la taille, la forme, la dureté et la texture (Schmidt, 1991). Ainsi, les femelles parasitoïdes de *Coeloides brunneri* localisent leur hôte, *Dendroctonus pseudotsugae*, grâce à la perception des vibrations issues du mouvement de l'hôte plutôt qu'à des signaux d'ordre olfactif (Ryan & Rudinsky, 1962). La courbure et la longueur du cocon de l'hôte sont importantes pour l'Ichneumonidae, *Pleolophus indistinctus* (Price, 1970). Le parasitoïde *Pimpla instigator* est attiré dans l'aire contenant ses hôtes potentiels par des stimuli olfactifs mais c'est la forme cylindrique avec un certain degré de relief qui détermine l'acceptation ou le rejet de l'hôte (Carton, 1974).

Les **facteurs chimiques** peuvent être perçus et identifiés selon deux modes de détection chimiosensorielle : olfactive ou gustative. Ces stimuli chimiques restent les plus étudiés sans doute parce qu'ils sont la piste privilégiée des Hyménoptères parasitoïdes dans la phase d'acceptation. Ces stimuli les plus fréquents sont pas ou peu volatils. Dans la majorité des cas, leur perception est donc réalisée par contact direct avec l'hôte, l'enveloppe de l'hôte ou des éléments associés. Les modes de perception et de détection les plus utilisés dans cette phase d'acceptation semblent donc être la "gustation".

Ainsi, Hendry *et al.* (1973) mettent en évidence un stimulus chimique de contact dans les fèces de *Phthorimaea operculella* qui induit l'examen avec l'ovipositeur d'*Orgilus lepidus* (Hym. : Braconidae). Des stimuli contenus dans les *frass* et la cuticule d'*Heliothis virescens* influencent son acceptation par le parasitoïde *Campoletis sonorensis* (Wilson *et al.*, 1974). D'autres recherches ont permis d'extraire de la cuticule des hôtes, des composés chimiques qui déclenchent des comportements d'examen avec les antennes ou l'ovipositeur (Weseloh, 1974 ; Leonard *et al.*, 1975 ; Vinson, 1975a ; pour revue Arthur, 1981 ; Kainoh *et al.*, 1982).

Jusqu'à présent, aucune règle stricte ne semble pouvoir être établie entre la nature des stimuli (physique ou chimique) et le stade hôte (œuf, larve, nymphe...) ou la famille de l'Hyménoptère parasitoïde.

Connaissances sur le modèle

L'espèce *D. pulchellus* est étudiée depuis longtemps au laboratoire. Des études plus spécifiquement consacrées au problème de reconnaissance ont montré que différents éléments semblaient favoriser l'acceptation de l'hôte : les fèces larvaires (Auger *et al.*, 1989), le cocon ou la cuticule de l'hôte (Thibout, 1988 ; Bekkaoui & Thibout, 1992). Une fois arrivé au contact du complexe hôte, défini comme l'association chrysalide-cocon, le parasitoïde utilise des stimuli de contact provenant du cocon et de la cuticule (Bekkaoui, 1992). Le cocon aurait le

rôle déterminant dans l'acceptation finale de l'hôte (Thibout, 1988). Il contiendrait des kairomones fortement liées à la soie et directement fabriquées dans les glandes labiales des larves d'*A. assectella*. Par ailleurs, la composition chimique du cocon est plus importante que les facteurs physiques tels que la texture et le maillage, car même broyé, le cocon est encore accepté par quelques femelles parasitoïdes (Bekkaoui & Thibout, 1993).

Ces précédents résultats ont été obtenus à l'aide d'un test biologique source d'une très grande variabilité de comportements. L'influence de certains paramètres environnementaux sur celui-ci a été omise. Par exemple, les femelles étaient testées simultanément sur le même stimulus et les aspects interactions physiques et chimiques interindividuels n'ont pas été pris en compte. Les leurres consistaient en un papier-filtre, négligeant ainsi l'aspect physique du cocon.

Certains des critères comportementaux, pas assez pertinents, sont difficilement exploitables. Ainsi, en est-il du critère « nombre moyen de touchers de l'ovipositeur avec le substrat ». La proportion de femelles ayant réalisé cette posture, dans un groupe expérimental donné, n'était pas traduit par ce critère.

Dans cette étude plus approfondie, dont le but est l'identification du stimulus, un nouveau test comportemental a du être élaboré.

Test comportemental

La mise en évidence chez un insecte parasitoïde des types de facteurs intervenant lors de la phase d'acceptation d'un hôte, implique :

- une délimitation de la période comportementale étudiée,
- la description précise de la séquence comportementale,
- l'établissement de certains critères comportementaux.

Ensuite seulement, l'utilisation de leurres et/ou d'extraits peut être conduite afin de déterminer quels sont les facteurs informatifs pour le parasitoïde.

Les tests biologiques réalisés avec les composés chimiques de contact suivent souvent 2 voies majeures : d'une part, celle testant les kairomones en dépôt ponctuel "spot" (Weseloh & Bartlett, 1971 ; Henson *et al.*, 1977), d'autre part, celle utilisant des éléments imprégnés de kairomones et mimant l'hôte (Strand & Vinson, 1982 ; Vinson & Piper, 1986).

Les tests biologiques peuvent donc présenter une grande diversité tant dans la nature du support devant recevoir l'extrait kairomonal que dans les critères comportementaux choisis, pour exemple :

- Ambritz *et al.* (1996) utilisent des **leurres en papier Whatman n°1** et les critères

comportementaux choisis sont l'examen antennaire, l'examen par l'ovipositeur et la perforation par l'ovipositeur,

- Tilden et Ferkovich (1988) utilisent **une goutte d'agar** qu'ils trempent dans l'extrait à tester ; le critère est le nombre d'œufs déposés,

- Vinson et Piper (1986) utilisent deux mimes d'oothèque, soit un **scotch entourant une graine**, soit **une bille de verre transparente**, déposés dans une boîte de Pétri ; la durée de contact, les tapotements antennaires, les tapotements de l'ovipositeur sur le substrat et l'insertion de l'ovipositeur sont utilisés comme critères comportementaux,

- Mattiacci *et al.* (1993) utilisent des **billes** de verre ; les critères comportementaux sont la rencontre, l'examen antennaire, l'examen par l'ovipositeur.

Notre étude a donc tout d'abord consisté à confirmer la nature du signal intervenant lors de la phase comportementale d'acceptation de l'hôte et agissant comme stimulus d'oviposition. Les premières observations comportementales sont réalisées dans le but de vérifier que le cocon ou des composés du cocon ont une activité stimulante sur le comportement d'acceptation de l'hôte et y jouent un rôle essentiel.

Ensuite, il nous a fallu établir un test mettant en évidence un comportement sur leurre qui ait la même signification que sur l'hôte naturel. Ce test, dorénavant désigné sous le terme de **test comportemental**, se doit de permettre l'observation d'une série de critères comportementaux quantifiables et caractéristiques de la phase d'acceptation de l'hôte naturel.

B) Matériels et Méthodes

1 - Insectes

1-1 Elevage de l'hôte et du parasitoïde

Deux souches d'*A. assectella* sont élevées en masse au laboratoire sur **poireau** (*Allium porum L.*) ou sur **milieu artificiel**.

- La souche d'*A. assectella* maintenue sur poireaux est élevée dans une pièce climatisée. Les conditions de photopériode sont de 16h à la lumière (L) et de 8h à l'obscurité (D) sous thermopériode synchrone 26°C-18°C LD. L'humidité relative est de 70 ± 10 %. Cette souche est complètement renouvelée chaque année, courant juillet, à l'aide de chenilles et de chrysalides prélevées dans les champs de poireaux de la région. La ponte des imagos et tout le développement larvaire s'effectuent sur poireaux récoltés dans des cultures non traitées.

- La souche d'*A. assectella* maintenue sur milieu artificiel gélosé supplémenté en poudre de poireaux (Pralavorio *et al.*, 1973 ; Arnault, 1982) est élevée dans une étuve climatisée sous photopériode 14h L : 10h D et sous température constante de 25°C. L'humidité relative est de 60 ± 10 %. Cette souche n'a pas été renouvelée depuis au moins 10 ans.

La souche de *D. pulchellus* élevée au laboratoire a été renouvelée en 1990, par des adultes provenant de la région d'Antibes (sud de la France) et est renouvelée en partie chaque année avec des adultes récoltés début septembre. La souche est maintenue en cage dans une pièce climatisée et élevée sur les chrysalides-hôtes de la souche d'*A. assectella* maintenue sur milieu artificiel (Bekkaoui, 1992). Les conditions de thermopériode, de photopériode et d'humidité relative (HR) sont de 25°C, 60 ± 10 % HR durant les 16h de lumière et 15°C, 70 ± 10 % HR durant les 8h d'obscurité. Des chrysalides âgées de 24h d'*A. assectella* présentes dans leur cocon sont proposées chaque jour aux femelles de *D. pulchellus* pour la ponte.

1-2 Parasitoïdes utilisés pour les expériences

L'importance de l'expérience chez les Hyménoptères parasitoïdes a été étudiée par plusieurs auteurs (Dmoch *et al.*, 1985 ; Lewis & Tumlinson, 1988 ; Lewis *et al.*, 1991 ; Vet & Dicke, 1992 par exemple). Chez l'espèce *Brachymeria intermedia*, l'expérience de la femelle influence ses décisions de ponte (Drost & Cardé, 1990). Les modifications comportementales se situent aussi bien au niveau qualitatif que quantitatif (Kerguelen & Cardé, 1996).

L'apprentissage olfactif semble exister chez *D. pulchellus* (Lecomte & Thibout, 1991, 1993). Ce facteur étant source de modifications comportementales chez les parasitoïdes, les femelles *D. pulchellus* testées seront **non expérimentées**, c'est à dire ne seront jamais placées en présence de chrysalides dans leur cocon, donc sans expérience de ponte préalable.

Les femelles de *D. pulchellus* sont prélevées dès leur émergence. Elles sont **accouplées** individuellement, puis isolées en boîtes cylindriques pendant **5-6 jours**, âges où la fécondité moyenne est élevée et les réponses à l'hôte positives. En effet, la présence d'ovocytes mûrs dans les ovarioles semble favorable à l'expression du comportement d'acceptation ; les femelles immatures ne réagissent pas aux chrysalides (Rojas-Rousse, 1980). A partir du 2^{ème} ou 3^{ème} jour, qu'une femelle soit ou non accouplée, le " comportement de ponte " est déjà stabilisé. Par la suite, dans les conditions d'élevage, il ne présentera plus de modifications significatives (Labeyrie, 1960).

Les femelles sont nourries avec 10% (w/v) de sucrose (Bekkaoui & Thibout, 1992).

Les deux souches d'*A. assectella* élevées au laboratoire sur poireau ou sur milieu artificiel ont été utilisées. La seconde produit une plus grande quantité d'hôtes. Si la nature du milieu nutritif de la souche n'influence pas le comportement du parasitoïde (valeurs des critères comportementaux, test biologique), cette seconde souche plus productive sera utilisée pour toutes les expériences ultérieures. Dans le cas contraire, la souche hôte élevée sur poireau sera conservée.

2 - Mise en place du test comportemental

Pour éviter les interactions interindividuelles, les femelles sont **testées individuellement**. Dans le but d'augmenter la probabilité de rencontre entre l'Hyménoptère et son hôte, les expériences se déroulent en boîte de Pétri de petite taille (5,5 de diamètre).

Les femelles sont **en situation de choix** entre un leurre témoin et soit un cocon (avec ou sans chrysalide), soit une chrysalide sans cocon, soit un leurre expérimental. Les différents éléments sont fixés sur le fond de la boîte de Pétri par un adhésif double face, afin que les femelles ne puissent les déplacer. Les leures expérimentaux sont constitués de coton hydrophile, ont une forme légèrement ovoïde et une taille analogue à celles des cocons réels. Les cocons (avec ou sans chrysalide) utilisés sont soigneusement débarrassés de leur exuvie. Vingt microlitres de l'extrait à tester sont déposés sur le leurre expérimental puis laissés à sécher.

Une femelle est placée dans la boîte de Pétri et observée pendant 5, 10 ou 20 min selon les expériences. L'expérience débute dès lors que la femelle entre en contact avec l'hôte, le cocon ou le leurre (**Fig. 3**).

3 - Comportement d'acceptation de l'hôte

L'activité comportementale des femelles est tout d'abord observée sur des chrysalides dans leur cocon (système hôte "naturel"), puis sur des chrysalides seules ou sur des cocons seuls. Les observations sur hôte ou élément de l'hôte (chrysalide ou cocon) sont utilisées pour établir une description précise du comportement d'acceptation de l'hôte par le parasitoïde ainsi que pour vérifier l'origine des stimuli. Certaines des observations, effectuées sous loupe binoculaire ont permis d'observer précisément certains actes stéréotypés du comportement d'acceptation.

La plupart des cocons testés conservent des débris provenant du milieu nutritif artificiel. Un extrait de milieu est donc réalisé pour contrôler une éventuelle influence de ces débris sur le

comportement d'acceptation des femelles. Pour ce faire, 0,1 g de milieu avant infestation par les larves, est suspendu dans 0,5 ml d'hexane non déshydraté. Après centrifugation à 10000 g pendant quelques minutes, le surnageant est filtré (0,45 μm Millipore) et stocké à 4°C.

La description de ce comportement a servi de base pour définir différents critères comportementaux dont seuls certains s'avèreront informatifs. Ceux-ci vont permettre de quantifier le comportement d'acceptation dans des conditions expérimentales variées, dans le but de :

- confirmer l'importance du cocon comme support de stimuli,
- confirmer la possibilité d'extraction des stimuli,
- envisager le choix d'un solvant d'extraction,
- et finalement prouver que la façon dont le test comportemental a été conçu est appropriée à l'étude.

4 - Extraction de substances actives

Tous les cocons utilisés sont soigneusement débarrassés de leur nymphe et de leur exuvie. Les extraits de cocons sont obtenus en lavant 500 ou 1000 cocons, respectivement dans 5 ml ou 10 ml de solvant (10 μl / cocon). Ainsi, les cocons d'*A. assectella* élevés sur feuilles de poireaux ou sur milieu artificiel plus poudre de poireaux sont lavés dans du dichlorométhane, de l'eau ultrapure (millipore, 19 M Ω ; pH 5,5) ou de l'hexane pendant 5 min à température ambiante et sous faible agitation. Les solvants ne sont pas déshydratés avant lavage des cocons. Les particules entraînées lors du lavage sont supprimées par filtration (0,45 μm Millipore, Millex HN résistant au solvant) et les extraits sont stockés à 4°C.

Les différents extraits sont testés à la quantité de 2 équivalents-lavage de cocons (défini comme le nombre de cocons lavés par le solvant) pour leur capacité à déclencher le comportement d'acceptation.

Un aliquote d'un extrait de lavage de cocons à l'eau a été utilisé pour obtenir deux extraits dilués 5 fois ou 10 fois. Ces deux extraits ont donc été testés à la quantité respective de 0,4 et 0,2 équivalents-lavage de cocons.

5 - Choix des tests statistiques

Le test non-paramétrique d'analyse de variance de rang de **Kruskal-Wallis** (Siegel, 1956) a été utilisé pour comparer les résultats des différents échantillons indépendants.

Les fréquences observées sont comparées au moyen du test χ^2 .

Le seuil de signification est de 5 % ($P=0,05$) pour des situations bilatérales (Sokal & Rohlf, 1981 ; logiciels utilisés : Minitab, Statview).

C) Résultats - Interprétations

1 - Description du comportement d'acceptation

1-1 Définition des étapes comportementales

D'un point de vue qualitatif, le comportement d'acceptation de l'hôte reste conforme à "l'acte de ponte" défini et décrit par Labeyrie (1960). Il comporte un certain nombre de séquences se succédant selon un ordre déterminé. L'observation du comportement des femelles *D. pulchellus* permet de distinguer deux niveaux d'acceptation directement liés à la structure du complexe-hôte. En effet, l'hôte naturel est une chrysalide dans son cocon de soie tissé par le dernier stade larvaire (L5) d'*A. assectella*, juste avant la prémétamorphose en prénymphe (**Fig. 4a**). Le premier contact du parasitoïde avec son complexe-hôte s'effectue sur ce cocon. Ce contact est immédiatement suivi d'une phase de prospection antennaire, puis en cas d'acceptation à proprement parler, de la posture de ponte. Celle-ci conduit le parasitoïde au deuxième contact : la chrysalide-hôte. A l'intérieur de ces deux niveaux, la structuration du comportement peut être dégagée en décrivant la posture et les mouvements du parasitoïde. Quatre grandes étapes ont pu être dégagées.

* Le contact avec le cocon indique la fin de la phase de localisation. La femelle se déplace toujours les antennes dirigées vers l'avant. Dans un premier temps, seule l'extrémité des antennes va donc entrer en contact avec le cocon. La femelle s'immobilise et le mouvement des antennes se modifie. La femelle parasitoïde tambourine vigoureusement le cocon (**Fig. 5, étape 1 ; Fig. 4b**).

* Elle monte sur le cocon (**Fig. 4c**), puis effectue une série de déplacements longitudinaux tout en le prospectant de l'extrémité de ses antennes (exclusivement avec le tiers apical). A chaque extrémité du cocon, la femelle effectue un demi-tour brusque tout en restant en contact avec le cocon, et reprend sa marche. Ses antennes balayent le cocon selon 2 types de mouvement : le tapotement et le frottement (**Fig. 5, étape 2**). Cette étape se termine par des arrêts de locomotion plus ou moins brefs, pendant lesquels la femelle mordille les mailles du

cocon avec ses mandibules (**Fig. 4d**).

* Ce comportement est immédiatement suivi d'une posture caractérisée par le repliement de l'abdomen entre les pattes postérieures amenant ainsi l'extrémité abdominale au contact du cocon. Les pièces buccales viennent constamment toucher les fibres du cocon (**Fig. 5, étape 3 ; Fig. 6a**). Il peut y avoir reprise du comportement locomoteur avant que l'abdomen ne soit totalement revenu en position horizontale. Afin d'insérer son abdomen dans le cocon, la femelle se rapproche de l'une de ses extrémités en présentant la même courbure abdominale (**Fig. 6b**). Ceci marque la fin de la troisième étape.

* Les introductions de l'abdomen dans le cocon se réalisent toujours aux extrémités, seul endroit où les fils de soie sont libres pour permettre à la teigne de sortir. Aucune femelle parasitoïde n'a été observée réussissant à couper les mailles du cocon, ceci malgré une préhension parfois soutenue au moyen des mandibules. L'insertion de l'abdomen à l'intérieur du cocon, indique le début d'une série de contacts avec la chrysalide-hôte elle-même et définit la posture de ponte proprement dite.

L'Hyménoptère est solidement fixé sur le cocon par ses deux paires de pattes antérieures. Les pièces buccales de la femelle parasitoïde mordillent encore les fibres du cocon. Les antennes, positionnées à l'horizontale sur le cocon, présentent de petits mouvements verticaux. Dans un premier temps, la femelle semble rechercher le contact avec la chrysalide de son extrémité abdominale. L'abdomen est recourbé vers l'avant. L'angle formé par l'abdomen et le reste du corps est de plus en plus aigu et le nombre de segments pénétrant à l'intérieur du cocon augmente. A ce moment, la face dorsale de l'abdomen, parallèle à l'hôte, entre en contact avec la chrysalide, la face ventrale restant en contact avec l'intérieur de la face supérieure du cocon (**Fig. 5, étape 4 ; Fig. 6c**). Les valves palpiformes, situées à l'extrémité abdominale et dans lesquelles est protégé l'ovipositeur au repos, entrent en contact avec la cuticule de la chrysalide, annonçant souvent la phase de perforation. Durant cette phase, l'extrémité abdominale en contact avec la cuticule est animée de mouvements de contraction et de torsion (**Fig. 7a**). Par ailleurs, un organe translucide présent en position dorsale de l'extrémité abdominale se dévagine et se trouve alors en contact avec la chrysalide. Cet organe correspond au proctigère. Il comprend l'anus à son extrémité et de chaque côté un appendice, le socius, selon la terminologie empruntée à Bitsch (1979). Aucun rôle dans la reconnaissance n'a pu lui être imparti (**Fig. 7b**). Cette phase d'examen et de perforation, se termine lorsque la

femelle ramène vers l'arrière son proctigère et ses valves palpiformes pour permettre à son ovipositeur de pénétrer dans la chrysalide (**Fig. 7c**).

La ponte, dépendant en partie de certaines caractéristiques de la chrysalide (qualité nutritive, parasitisme, ...), peut donc ne pas avoir lieu. Si ponte il y a, un seul oeuf est émis par insertion d'ovipositeur. L'hôte parasité est ensuite abandonné (Labeyrie, 1960).

1-2 Activité des organes impliqués

Cette vision en étapes a été complétée par une description précise des mouvements des trois organes intervenant de façon importante dans le comportement d'acceptation, à savoir les antennes, les mandibules et l'extrémité abdominale.

*** Activité antennaire**

Elle est caractérisée par différents mouvements sur le cocon, tels que l'enserrement, le frottement, la pénétration à travers les mailles de soie ou le tapotement. L'activité développée varie également dans l'amplitude et la fréquence des battements. Ainsi, lorsque la femelle est en posture de ponte, les antennes tapotent la surface du cocon plus rapidement et avec une amplitude plus faible. Malgré l'observation de ces différences, ces mouvements antennaires restent pour le moment non quantifiables, principalement pour des raisons de trop forte activité.

*** Activité mandibulaire**

Elle est très importante et précède toujours la posture de ponte sur le complexe-hôte. La préhension des fibres du cocon par les mandibules a été qualifiée "d'arnachement" de l'insecte sur son hôte par Labeyrie (1960). Il correspondrait, selon mon interprétation, plutôt à des tentatives demeurées infructueuses de coupure des mailles.

Les mandibules ne sont pas les seules pièces buccales à entrer en contact avec le cocon mais il est pratiquement impossible de déterminer la part de chacune d'entre elles. Après insertion de l'abdomen dans le cocon, les mandibules toujours en contact avec le cocon sont constamment en mouvement.

*** Activité de l'extrémité abdominale**

Elle se déroule à deux niveaux :

- au niveau **externe**, à la surface du cocon. Elle est caractérisée par des contacts brefs (durée inférieure à la seconde) et nombreux principalement des valves palpiformes et parfois des derniers tergites abdominaux.

- au niveau **interne**, dans le cocon et à la surface de la chrysalide. Elle est caractérisée par la dévagination du proctigère qui entre en contact de la chrysalide avant et pendant la perforation. Les contacts du proctigère et des valves palpiformes sont longs (durée de plusieurs minutes), d'autant plus si la perforation de la cuticule de la chrysalide est engagée.

Cette activité abdominale facilement identifiable pourrait être qualifiée “ d'auscultatrice ” ou “ d'examinatrice ”. Cette posture est importante puisqu'elle conduit au contact ovipositeur-chrysalide et donc à la piqûre.

Ces différentes périodes d'activité peuvent être entrecoupées de périodes d'inactivité. Elles peuvent apparaître à n'importe quel moment de la séquence. La femelle se positionne le plus souvent longitudinalement sur le cocon, les antennes parallèles au cocon et pratiquement collées entre elles, sans un mouvement. Cette inactivité ne semble pas obligatoire puisque seules quelques femelles la développent. De plus, la durée d'inactivité varie de l'ordre de quelques secondes à plusieurs minutes.

2 - Critères comportementaux utilisés dans les tests biologiques

Suite à la description du comportement d'acceptation de l'hôte par la femelle parasitoïde, différents critères ont été définis.

Le premier critère, est la **durée de contact sur un élément hôte** (chrysalide dans son cocon, chrysalide, cocon, leurres). Il est défini comme la somme des durées de tous les contacts (antennes, tarse, abdomen) de chaque femelle avec l'un des éléments proposés. Les périodes durant lesquelles des femelles restent immobiles sur l'un des éléments, sans aucun mouvement antennaire, sont retranchées des durées de contact avec cet élément. L'observation montre qu'il ne pouvait y avoir un véritable déclenchement du comportement d'acceptation qu'après un contact supérieur à 3 s. Tout contact inférieur à 3 s ne sera donc pas pris en compte.

Le second critère, également sélectionné par Bekkaoui et Thibout (1993), est le **nombre de contacts**, défini comme étant la somme des contacts de chaque femelle avec l'un des éléments proposés.

Les valeurs moyennes de ces paramètres pour un groupe expérimental donné de femelles ont été calculées sur le nombre total d'observations puis ramenées à l'unité de temps (divisées par 5, 10 ou 20 selon le temps d'observation total). Il en résulte une durée moyenne de contact / (femelle × min) exprimée en seconde et un nombre moyen de contacts / (femelle × min).

Deux critères supplémentaires, le **contact mandibulaire** et le **contact ou examen abdominal** sur le cocon ont été sélectionnés. Ces deux critères ont été enregistrés en termes de présence ou absence.

Le premier apparaît lorsqu'une femelle parasitoïde met en contact ses pièces buccales et notamment ses mandibules avec l'un des éléments. Le deuxième apparaît lorsqu'une femelle positionne son extrémité abdominale par retournement au contact d'un des éléments testés. Le pourcentage de femelles ayant présenté ces critères comportementaux a été calculé.

Le comportement d'acceptation de l'hôte a été analysé dans plusieurs situations et quantifié en utilisant les critères sélectionnés, afin de confirmer le rôle prépondérant du cocon.

3 - Importance du cocon

3-1 Durée de contact

La durée moyenne de contact des femelles en présence soit :

- de l'hôte naturel c'est à dire la chrysalide dans son cocon,
- de la chrysalide ou le cocon seuls,
- du leurre imprégné de 20 µl d'extrait à l'hexane de milieu avant infestation par des larves,

a été calculée et figure dans le **tableau 2**.

Les témoins consistent en un leurre en coton dans les deux premières situations expérimentales et en un leurre imprégné de 20 µl d'hexane dans la dernière situation.

Dans toutes les situations expérimentales, excepté sur l'extrait de milieu avant infestation, les femelles parasitoïdes passent significativement plus de temps sur l'hôte naturel ou élément de l'hôte (cocon ou chrysalide) que sur le témoin. Les femelles ne s'intéressent pas au leurre en fibres de coton hydrophile, pourtant de forme et de taille proches du vrai cocon. **Les caractéristiques physiques du leurre ne fourniraient donc pas les stimuli déclenchant le comportement d'acceptation de l'hôte.** Bien que la valeur observée avec les leures témoins de l'extrait de milieu avant infestation soit plus forte que pour les autres témoins, elle est significativement très inférieure à celles des autres situations expérimentales. Par ailleurs, les examens antennaires restent rapides et les femelles parasitoïdes ne montent que très rarement sur le coton.

Dans les expériences menées par Fauria (1994), les durées de contact avec la chrysalide nue ou le cocon seul ne sont pas significativement différentes. Elles sont par contre significativement inférieures à la durée de contact avec l'hôte naturel (chrysalide dans son cocon). Chacune de ces observations a été réalisée pendant un temps d'observation de 20 min. Pour ma part, l'utilisation d'un temps d'observation restreint, 5 ou 10 min sur cocon seul, a conduit à faire disparaître cette différence avec l'hôte naturel. Ceci nous indique que :

- la période de contact avec le cocon se poursuit souvent pendant 5 à 10 min mais rarement 20 min. Un temps d'observation trop long conduit à la réunion des séquences comportementales qui s'effectuent aux deux niveaux de l'acceptation, à savoir au contact du cocon puis de la chrysalide. Les durées de contact plus faibles pourraient donc s'expliquer par la forte diminution des séquences comportementales du premier niveau lorsque le cocon est retiré (chrysalide seule), ou par la disparition de celles du deuxième lorsque la chrysalide est retirée (cocon seul).

- le **cocon est à lui seul une source importante de stimuli** puisqu'il déclenche chez les femelles de *D. pulchellus* une durée de contact équivalente à celle observée avec l'hôte naturel.

3-2 Nombre moyen de contacts

Sur les 4 types d'hôte utilisés précédemment, l'hôte naturel, la chrysalide ou le cocon seuls, ou le leurre imprégné de 20 µl d'extrait à l'hexane de milieu avant infestation par des larves, le nombre moyen de contacts réalisé par les femelles a été analysé (**tableau 3**).

Les témoins consistent en un leurre en coton dans les deux premières situations expérimentales et en un leurre imprégné de 20 µl d'hexane dans la dernière situation.

La femelle *D. pulchellus* présente significativement plus de contacts avec l'hôte naturel ou l'un de ses éléments (cocon ou chrysalide) qu'avec le témoin, excepté sur l'extrait de milieu avant infestation. Ainsi, comme pour le critère "durée moyenne de contact", **l'élément-hôte (cocon et/ou chrysalide) possède un pouvoir stimulant plus important que le témoin**. L'absence d'intérêt, voire même une certaine répulsion exercée par le leurre expérimental avec l'extrait de milieu, s'exprime le plus souvent par des contacts inférieurs à 3s et une locomotion rapide. La conséquence pourrait en être des contacts relativement plus nombreux sur le leurre témoin.

Si l'on compare les différentes situations expérimentales (cocon + chrysalide, cocon ou chrysalide) réalisées par Fauria (1994), le nombre de contacts ne varie pas de manière significative quel que soit le type d'hôte présenté.

Une différence significative existe entre les cocons observés pendant 10 min et 5 min.

Cette différence peut s'expliquer par un nombre plus important de contacts dans les 5 premières minutes de l'enregistrement du comportement (nombre moyen N de contacts : N_0 à $5_{\text{min}} = 2,1$ et N_5 à $10_{\text{min}} = 0,9$). Lors des premiers contacts antennaires, l'insecte peut se retirer du cocon plusieurs fois, comme par hésitation, avant de monter et de demeurer sur le cocon.

3-3 Contacts mandibulaires et abdominaux

Les pourcentages de femelles ayant présenté des contacts mandibulaires ou abdominaux avec l'hôte naturel, la chrysalide ou le cocon seuls, ou le leurre imprégné de 20 μl d'extrait à l'hexane de milieu avant infestation par des larves, figurent dans le **tableau 4**.

Les témoins consistent en un leurre en coton dans les deux premières situations expérimentales et en un leurre imprégné de 20 μl d'hexane dans la dernière situation.

Lorsque des contacts mandibulaires et abdominaux se produisent, ils sont toujours concomittants. Un premier contact mandibulaire précède toujours un contact abdominal par retournement. Les résultats de Fauria (1994) donnent des informations qualitatives mais pas quantitatives. La majorité des femelles, si ce n'est toutes, ont dû présenter des contacts abdominaux sur l'hôte.

Pour les cocons seuls, il n'existe aucune différence significative quel que soit le temps d'observation (5 ou 10 min). La présence d'un stimulus suffisant induit une réponse comportementale rapide et forte, conduisant au retournement abdominal en moins de 5 min. Ces résultats confirment le fort pouvoir stimulant des cocons.

Aucune femelle ne présente de contacts abdominaux et mandibulaires sur le leurre imprégné de 20 μl d'extrait de milieu avant infestation. Il n'existe pas de différences significatives avec le témoin. Le milieu ne semble donc pas affecter le comportement des femelles.

4 - Extraction de substances actives

Afin d'obtenir le ou les composés stimulants, une série d'extractions avec divers solvants sur cocon a donc été réalisée.

L'analyse du comportement d'acceptation de l'hôte est menée sur les différents extraits en utilisant les mêmes critères comportementaux précédents.

4-1 Durée de contact

La durée moyenne de contact des femelles réalisée avec un leurre imprégné de 20 µl d'un des extraits à la quantité de 2 équivalents-lavage cocons, sauf dans le cas des deux extraits à l'eau dilués (0,4 et 0,2 équivalents-lavage cocons selon la dilution de 5 ou 10 fois), figure dans le **tableau 5**. Tous les extraits sont effectués par lavages de cocons tissés par des larves d'*A. assectella* élevées sur poireau, excepté dans la situation expérimentale réalisée par Fauria (1994).

Les témoins consistent en un leurre en coton imprégné de 20 µl du solvant d'extraction correspondant à la situation expérimentale.

Dans toutes les situations expérimentales, les femelles parasitoïdes passent significativement plus de temps sur le leurre avec extrait que sur le témoin. Les valeurs relatives aux extraits à l'hexane non déshydraté et à l'eau, réalisés sur des cocons de la souche d'*A. assectella* élevée sur milieu supplémenté en poudre de poireau, ne présentent pas de différences significatives et sont comparables à celles relatives aux cocons seuls pour des observations de même durée (**Tableau 2**) (Kruskall-Wallis, **P= 0,553**). Il est donc possible d'obtenir des durées moyennes de contact similaires à celles obtenues sur des hôtes ou sur des cocons en utilisant des extraits de cocons. **Des substances stimulatrices induisant des contacts longs sont donc solubles dans les solvants utilisés.** Les femelles effectuent de longs contacts avec des déplacements prolongés sur le coton imprégné d'un extrait contrairement à ceux observés avec les témoins (**Fig. 8a**).

Fauria (1994) a réalisé une extraction au dichlorométhane selon la même procédure que la nôtre : 500 cocons lavés 5 min par 5 ml de solvant à la température de la pièce. Cependant, les cocons étaient issus de la souche d'*A. assectella* élevée sur poireau. La durée de contact observée dans les deux cas est proche et est plus faible que celle obtenue avec des extraits à l'eau ou à l'hexane non déshydraté. Elle est non significativement différente de celles obtenues avec les chrysalides ou les cocons observés pendant 20 min (**Tableau 2**).

Quatre hypothèses pourraient expliquer les résultats observés :

- un effet du végétal sur le parasitoïde, effet peu important semble-t-il.
- **le temps d'observation** (20 min) pour l'extrait au dichlorométhane (Fauria, 1994) **serait trop long** compte tenu de la durée réelle du comportement de la femelle sur le cocon. Le leurre expérimental est généralement abandonné après 10 min alors qu'une chrysalide dans son cocon incite la femelle parasitoïde à engager sa prospection et sa piqure.
- la valeur observée pour l'extrait au dichlorométhane (Fauria, 1994) peut être comparée

à celle obtenue avec le deuxième extrait au dichlorométhane, extrait effectué sur des cocons issus de la souche d'*A. assectella* élevée sur milieu supplémenté en poudre de poireau. Cette valeur est significativement inférieure aux extraits à l'eau et à l'hexane non déshydraté, ceci pour des périodes d'observation identiques. Cette diminution de la durée de contact pour les extraits au dichlorométhane pourrait être due à **une affinité différente des substances actives pour ce solvant**. Une telle hypothèse paraît contestable si l'on compare les deux premiers extraits dont la polarité est opposée. Cependant, une série de tests effectuée sur un extrait à l'hexane **préalablement déshydraté** à l'acétate d'ammonium semble la soutenir. En effet, dans ce cas, la durée moyenne de contact par femelle \times min (échantillon de 67 femelles) tombe à 0,7 s. Il existe une différence hautement significative entre l'extrait à l'eau et l'extrait à l'hexane déshydraté. Il semble donc que pour l'hexane au moins, **les molécules d'eau contenues dans le solvant soient la source d'extraction des substances stimulantes**.

- la faible valeur observée avec l'extrait au dichlorométhane pourrait être, indépendamment du problème des molécules d'eau présentes dans les solvants, liée à un **effet de dilution**. Les tests effectués avec des leurres imprégnés par des extraits de cocons lavés à l'eau et dilués 5 ou 10 fois montrent des durées de contact significativement plus faibles. Cette forte diminution est à rapprocher d'une forte diminution du nombre de femelles présentant des contacts (observation), comme s'il existait une **variation de sensibilité interindividuelle**, un effet seuil pour la détection des stimuli.

4-2 Nombre de contacts

Le nombre moyen de contacts réalisé par les femelles avec un leurre imprégné de 20 μ l d'extraits variés à la quantité de 2 équivalents-lavage cocons, sauf dans le cas des extraits à l'eau dilués, est présenté dans le **tableau 6**.

Les témoins consistent en un leurre en coton imprégné de 20 μ l du solvant d'extraction correspondant à la situation expérimentale.

Les femelles *D. pulchellus* présentent significativement plus de contacts avec des leurres imprégnés d'extrait de cocons qu'avec le témoin, excepté pour l'extrait au dichlorométhane de cocons d'*A. assectella* élevé sur poireau (Fauria, 1994).

Quelles que soient les situations expérimentales, le nombre de contacts relevés ne varie pas de manière significative avec le type d'extrait présenté. Le nombre de contacts réalisé avec des leurres imprégnés d'extrait de cocons de la souche d'*A. assectella* élevée sur milieu supplémenté en poudre de poireau, ne diffère significativement pas du nombre observé avec des cocons seuls, ceci pour des observations de même durée (Kruskall-Wallis, **p=0.611**,

tableaux 3 et 6).

Ainsi, pour ce critère comportemental, **les extraits ont un pouvoir stimulant plus important que le témoin et comparable aux cocons seuls.**

4-3 Contacts mandibulaires et abdominaux

Les pourcentages de femelles ayant présenté des contacts mandibulaires et abdominaux avec un leurre imprégné de 20 µl d'extrait à des quantités variées figurent dans le **tableau 7**.

Quelle que soit la situation expérimentale, les pourcentages de femelles ayant présenté des contacts mandibulaires et abdominaux avec un leurre témoin sont de 0. Ils ne sont donc pas présentés dans le tableau.

Pour une même situation expérimentale, il n'existe pas de différences entre le nombre de femelles présentant des contacts mandibulaires et celles présentant des contacts abdominaux par retournement. De tels contacts n'apparaissent jamais sur les témoins. La proportion de femelles qui présente des contacts sur les leurre imprégnés d'extraits à l'eau, à l'hexane ou au dichlorométhane n'est pas significativement différente de celle obtenue sur de vrais cocons (d.d.l. = 3, $\chi^2 = 5,061$, **p = 0,168**, **tableaux 4 et 7**). Pour ces comportements, des **extraits de cocons présentent une activité similaire à celle des cocons** eux-mêmes puisqu'il y a observation de postures de ponte (**Fig. 8b**). Cette posture sur leurre expérimental est le plus souvent répétée et effectuée avec insistance. Les fibres de coton sont tirées par les mandibules et après de courts contacts à la surface du leurre, l'abdomen est généralement introduit entre les fibres.

La série de tests effectuée sur un extrait à l'hexane **préalablement déshydraté** confirme l'**importance des molécules d'eau pour l'extraction des substances stimulantes**. En effet, dans cette situation, aucune des 67 femelles testées n'a présenté de contacts abdominaux avec le leurre imprégné d'extrait à l'hexane déshydraté.

La dilution d'un extrait à l'eau, à l'origine actif en comportement, se traduit par une diminution significative de la proportion de femelles présentant des contacts mandibulaires et abdominaux. Ceci confirme l'une des hypothèse émise précédemment (paragraphe 4-1) : chaque femelle possède un seuil de détection et a besoin **d'une quantité de signal suffisante pour déclencher le comportement d'acceptation de l'hôte**, ici la posture de ponte. Certaines femelles semblent 10 fois plus sensibles aux stimuli que leurs conspécifiques. Ces observations sur l'effet des dilutions nous indiquent également que l'**absence** d'un comportement tel que celui du contact abdominal, **n'est pas synonyme d'absence de stimuli**.

D) Discussion

Importance du contact de l'extrémité abdominale avec l'hôte

Le comportement d'acceptation de la chrysalide d'*A. assectella* par *D. pulchellus* se résume donc à une succession d'étapes comportementales. Il a pu être défini et caractérisé par différentes postures et mouvements. Les antennes, les mandibules et l'extrémité abdominale interviennent semble-t-il dans la perception de stimuli chimiques et peut-être physiques, permettant l'identification de l'hôte. Lorsque l'élément hôte consiste en un leurre, le comportement d'acceptation s'arrête à ce niveau puisqu'il n'y a jamais ponte. Les phases comportementales successives décrites chez cette espèce sont typiques des hyménoptères parasitoïdes : tapotement antennaire ("drumming"), examen ovipositeur ("probing") puis piqûre de l'hôte ("drilling") (Edwards, 1955 ; Labeyrie, 1960 ; Quednau, 1967).

Ces comportements particuliers apparaissent quel que soit l'**ordre de l'espèce-hôte parasitée** : Diptères (Edwards, 1955), Coléoptères (Vinson *et al.*, 1976 ; Ambritz *et al.*, 1996), Lépidoptères (Quednau, 1967 ; Hendry *et al.*, 1973 ; Schmidt, 1974 ; Weseloh, 1974, 1988 ; Tucker & Leonard, 1977 ; Strand & Vinson, 1983b ; Nordlund *et al.*, 1987 ; Tilden & Ferkovich, 1988 ; Kainoh *et al.*, 1989), Dictyoptères (Vinson & Pippert, 1986), Héteroïptères (Mattiacci & Dicke, 1995), Hémiptères (Noda *et al.*, 1982 ; Takabayashi & Takahashi, 1985), Homoptères (Millar & Hare, 1993 ; Takahashi *et al.*, 1990 ; Grasswitz & Paine, 1992 ; Battaglia *et al.*, 1993). Leur intensité semble dépendre du stade hôte sur lequel se développe le parasitoïde (Vinson, 1975b). La séquence comportementale semble réduite à une phase d'examen antennaire suivie de la piqûre lorsque le stade hôte attaqué est une larve ou un juvénile mobile. La phase d'acceptation de la larve libre d'*Heliothis zea* par *Campoletis sonorensis*, allant de l'examen antennaire à la ponte est effectivement très courte, 1,8 s en moyenne (Schmidt, 1974).

La plupart du temps les auteurs ne tiennent compte que du critère piqûre avec l'ovipositeur, considéré comme étant la phase terminale du comportement d'acceptation. Une phase d'examen externe avec l'extrémité abdominale et non pas l'ovipositeur est ainsi rarement décrite ou peu étudiée car également très rapide. Néanmoins, un examen par tapotements avec l'extrémité abdominale d'une zone réduite de la surface de l'hôte a été rapporté chez quelques rares espèces parasitoïdes, *Mormoniella vitripennis* (Edwards, 1955) et *Tetrastichus hagenowii* (Vinson & Pippert, 1986). Chez *D. pulchellus*, la phase d'examen du cocon ou de la chrysalide

avec l'extrémité abdominale est longue (plusieurs minutes) et très différente de celle observée chez ces deux autres espèces. Elle ne se résume pas à de simples tapotements mais à un contact et/ou examen prolongé avec l'extrémité de l'abdomen recourbé. Dans les trois cas, l'hôte est sessile : respectivement une pupa, une oothèque et une chrysalide. Cette phase n'existe cependant pas chez *Brachymeria intermedia*, parasitoïde de chrysalide, hôte également sessile (Tucker & Leonard, 1977).

Compte tenu de l'importance apparente de l'extrémité abdominale dans le comportement d'acceptation de l'hôte chez *D. pulchellus*, elle a fait l'objet d'une étude morphologique approfondie (Chapitre IV).

Importance du cocon comme source suffisante du signal kairomonal

Le stade chrysalide des espèces de Lépidoptères à chenilles mineuses est le plus vulnérable et le cocon de soie peut être regardé avant tout comme une structure de protection (Ono, 1983). Pourtant, quelques études rapportent l'importance du cocon ou de la soie de l'hôte comme source de kairomones pour sa localisation par les parasitoïdes. Les Hyménoptères impliqués sont généralement des parasitoïdes de nymphes ou d'œufs d'araignées (Quicke, 1997). Weseloh (1977, 1988) montre que le braconidé, *Cotesia* (= *Apanteles*) *melanoscela* ainsi que son hyperparasitoïde, *Eurytoma appendigaster* répondent à la soie du cocon de *Lymantria dispar*. Sandlan (1980) obtient des réponses similaires avec *Pimpla* (= *Coccygominus*) *turionellae* qui examine alors le cocon de son hôte avec sa tarière. Des substances extraites des cocons de *Lasioderma serricornis* (Coléoptère) sont stimulantes pour *Lariophagus distinguendus* (Pteromalidae) (Ambritz *et al.*, 1996). Pour *D. pulchellus*, les expériences ont montré que le cocon avec ou sans chrysalide est le signal déclenchant la phase d'acceptation allant jusque la posture de ponte (Labeyrie, 1960 ; Bekkaoui & Thibout, 1993). Les extraits réalisés à partir de lavages de cocons confirment son importance en tant que source de stimulations chimiques pouvant être extraites.

Cependant, cette extraction des kairomones à partir du cocon, ne nous indique pas la source de formation de celles-ci. Rostas *et al.* (1998) font ainsi remarquer que l'origine des kairomones de *Dahlbominus fuscipennis* proviendrait uniquement de la nymphe de *Gilpinia hercyniae* et diffuserait sur son cocon. Le cocon pourrait donc n'être que le support du signal et

non l'origine.

Procédure expérimentale

Les différentes expériences ont permis d'établir une **procédure expérimentale standardisée**.

De façon à avoir des **femelles** présentant un état physiologique et un comportement comparables pour les expériences, elles sont : **non expérimentées, accouplées, testées à l'âge de 5-6 jours et toutes préalablement nourries**.

Les interférences avec des femelles conspécifiques peuvent affecter le comportement "standard" que nous voulons déterminer. Contrairement aux expériences menées par Bekkaoui et Thibout (1993), les **femelles sont donc testées isolément**.

Des expériences préliminaires avaient été réalisées sur une souche isofemelle de *D. pulchellus*. La **variabilité comportementale** de ces femelles ne s'est pas avérée plus faible qu'avec la **souche du laboratoire** qui a donc été **conservée**.

Pour minimiser l'effet de l'environnement (température, humidité relative, luminosité) sur les tests biologiques, la majorité des **expériences** comportementales ont été **conduites dans l'étuve d'élevage**.

A la différence des résultats obtenus par Bekkaoui et Thibout (1993) sur leurre en papier filtre, nous avons pu rendre un **leurre en coton aussi stimulant qu'un cocon véritable**. La posture de ponte définie comme "contact ovipositeur" par Bekkaoui et Thibout est observée pour la majorité des femelles testées et pas seulement chez les plus sensibles. Malgré l'absence d'intérêt marqué pour le leurre en coton seul, il est possible que la forme tridimensionnelle de ce modèle et sa structure en fibres entrelassées agissent comme renforcement physique pour l'Hyménoptère, une fois les composés chimiques reconnus. L'insecte peut aussi s'agripper plus aisément, comme il le ferait sur un véritable cocon. Ainsi, chez le parasitoïde *Cotesia kariya*, le dépôt de la kairomone sur un disque de papier filtre induit les contacts antennaires alors que le même dépôt sur des billes de verre induit les examens ovipositeurs (Ohara *et al.*, 1996). Pour les femelles *Cotesia kariya*, la forme cylindrique du support semble être cruciale et agit en synergie avec la kairomone (2-acylcyclohexane-1,3-diones) dans l'induction de l'oviposition. Un phénomène comparable semblerait se produire

chez l'espèce *D. pulchellus*.

Critères informatifs

Les comportements sont quantifiés par l'étude de certains **critères** qui doivent le plus possible rendre compte de la phase d'acceptation de l'hôte. Ces critères nous permettent de savoir si le parasitoïde identifie effectivement l'élément-hôte présenté (éléments naturels, leurres imprégnés) lors des tests comportementaux et de pouvoir caractériser plus finement le signal kairomonal.

Généralement, les deux critères comportementaux utilisés sont l'examen antennaire et la piquûre. Notre étude comparative du comportement d'acceptation des femelles *D. pulchellus* mises en présence des chrysalides dans leur cocon ou des cocons seuls et des leurres expérimentaux avec extraits de lavage de cocons, a permis de dégager un test expérimental sur leurre adapté et représentatif. En effet, le comportement des femelles *D. pulchellus* sur leurre en coton imprégné d'extrait actif est en tout point conforme à celui observé sur cocon seul. Les examens abdominaux sont obtenus pour la majorité des femelles et il n'existe pas de différence significative pour les quatre critères choisis : durée moyenne de contact, nombre moyen de contacts, présence ou absence de contacts mandibulaires et abdominaux. Au vue des résultats, le critère "nombre moyen de contacts" semble toutefois moins informatif. Il peut, dans certains cas (leurre imprégné d'extrait de milieu avant infestation), être comparable dans les 2 situations expérimentale et témoin. Le **critère "nombre moyen de contacts" ne sera donc pas conservé dans les études qui suivront.**

Le **contact mandibulaire** ne pouvant être dissocié du contact abdominal, il **ne sera plus utilisé.**

D'autres paramètres comportementaux tels que la fréquence ou l'amplitude des battements antennaires lors des contacts n'ont pu être retenus pour des raisons pratiques, ceci malgré l'existence évidente de variations lors des diverses étapes du comportement d'acceptation.

Les deux **critères informatifs, durée moyenne de contact et présence / absence de contact abdominal**, apportent de réelles informations et seront conservés dans les expériences ultérieures.

De nombreuses différences de méthodologie existent entre les travaux précédents de

Bekkaoui & Thibout (1992, 1993) et les nôtres, au niveau du test utilisé et des critères comportementaux retenus. Par exemple, les tests comportementaux étaient réalisés avec plusieurs femelles en même temps et un morceau de papier filtre servait de support aux différents extraits. Au niveau critères comportementaux, le paramètre “durée moyenne de contact” est différent du critère “durée de contact moyen” utilisé par Bekkaoui et Thibout (1993). Ce dernier était issu du rapport entre la somme des durées de contact et le nombre total de contacts cumulé et moyenné. Le critère “nombre moyen de touchers de l’ovipositeur” utilisé par Bekkaoui et Thibout (1993) était défini comme “ le rapport entre le nombre total de fois où l’extrémité de l’abdomen et l’ovipositeur entrent en contact avec le substrat et le nombre total d’observations effectuées ”. Il est quantifié d’une façon différente de celle de notre critère “contact abdominal”. Néanmoins, la comparaison avec ces études, nous indique une amélioration des critères choisis pour la quantification du comportement d’acceptation, ainsi qu’une diminution des variabilités interindividuelles. Le nombre de femelles présentant des contacts abdominaux sur leurre apparaît maintenant beaucoup plus informatif.

Informations apportées par les extractions

Les résultats des tests comportementaux obtenus lorsque les femelles sont mises en présence de leurres imprégnés d’extrait de cocons lavés par un solvant apportent les informations suivantes :

- l’eau semble suffisante pour extraire ces substances. Le cas de l’hexane déshydraté semble montrer que l’extraction n’est rendue possible avec ce solvant que par la présence de molécules d’eau. L’hypothèse de l’hydrophilie des stimuli reste à vérifier en étudiant leur polarité. Bekkaoui et Thibout (1992, 1993) obtenaient également de meilleurs résultats avec une extraction de cocons à l’eau.

- les substances actives sont extractibles par simple lavage de 5 min.

Les différentes études d’extraction menées sur des stimuli de cocons ont généralement conduit à privilégier des solvants aqueux. Ainsi, Weseloh (1977, 1988) rapporte l’activité d’une kairomone de cocon soluble dans l’eau sur l’espèce *C. melanoscela*.

Dans la littérature, les techniques d’extraction citées restent souvent anarchiques et la plupart des auteurs testent plusieurs solvants avant de sélectionner le plus spécifique de la kairomone recherchée. Les solvants les plus utilisés sont l’eau, l’acétone, l’ether, l’éthanol, le méthanol, le chloroforme ou l’hexane (Schmidt, 1974 ; Vinson *et al.*, 1976 ; Vinson et Phipper, 1986 ; Nordlung *et al.*, 1987 ; Mattiacci *et al.*, 1993).

Conclusion : Le test comportemental

Le test comportemental mis au point à travers cette étude est mené en **conditions expérimentales standardisées** (temps d'observation, boîte de Pétri, leurre) et sera utilisé dans les expériences ultérieures. Chaque test consistera en l'enregistrement de deux critères comportementaux informatifs, **durée moyenne de contacts** (antennes, pattes) et **présence / absence de l'examen abdominal**. Ces paramètres seront enregistrés sur des groupes de femelles dont l'origine et l'état physiologique seront contrôlés.

Les contacts de durée inférieure à 3 s ne seront pas pris en compte. Ces courtes périodes de contact sont surtout présentes juste après l'introduction des femelles dans la boîte. Certaines semblent présenter des périodes de “ stress ”, pendant lesquelles elles peuvent rester immobiles ou se déplacer très rapidement. Les éléments placés dans la boîte (cocon, leurre expérimental) ne déclenchent alors aucun comportement d'arrêt ou autre comportement stéréotypé du processus d'acceptation de l'hôte. La rencontre des femelles avec ces éléments lors de leurs déplacements semblent plutôt relever du hasard.

Les périodes durant lesquelles des femelles restent immobiles, sans même aucun mouvement antennaire sur un des éléments placés dans la boîte, seront retranchées des durées moyennes de contact. Comme pour *Cotesia glomerata*, ces périodes ne semblent pas avoir une réelle signification comportementale (Mattiaci & Dicke, 1995). La durée totale de contact, sans les périodes d'inactivité, sera enregistrée pour chaque femelle et divisée par le temps total d'**observation qui n'excèdera pas 10 min**. Une **durée moyenne de contact par femelle x min exprimée en seconde est finalement obtenue**.

Le rôle prépondérant du cocon dans le processus d'acceptation de l'hôte et celui de composés chimiques impliqués à ce premier niveau de reconnaissance a été confirmé. De façon à identifier la nature du signal, une étude biochimique a alors été menée tout en utilisant ce test comportementale comme contrôle.

**II - Signal chimique issu
du cocon déclenchant le
comportement
d'acceptation de l'hôte
chez la femelle *D.*
*pulchellus***

A) Introduction

Les kairomones

Chez les femelles de l'espèce *D. pulchellus*, les premières séquences du comportement d'acceptation de l'hôte sont induites par la perception de **substances chimiques** issues du cocon de soie d'*A. assectella* (Chap. I). Leur perception donnant un avantage adaptatif à l'organisme receveur, à savoir trouver l'hôte susceptible d'assurer le développement de la descendance, ces composés chimiques agissent comme un **signal kairomonal** (Whittaker & Feeny, 1971 ; Vet & Dicke, 1992).

De nombreuses kairomones utilisées par les parasitoïdes et issues de l'hôte, de substances associées ou de sa nourriture, ont été isolées et identifiées chez différentes espèces (Arthur, 1981 ; Vinson, 1985).

Une classification des kairomones est envisageable. Elle peut tenir compte non seulement de la source d'émission mais aussi du moment dans la phase de sélection où elles interviennent, et du comportement qu'elles provoquent (Vinson, 1991). Ainsi, les kairomones d'acceptation de l'hôte peuvent encore être différenciées en 2 catégories : chez les endoparasitoïdes tel que *D. pulchellus*, il peut y avoir celles perçues avant la piqûre de l'hôte (avec ou sans contact) et celles perçues une fois la piqûre réalisée.

Les kairomones perçues lors de l'insertion de l'ovipositeur qui stimulent la ponte sont **internes** et **solubles** dans l'eau. Généralement, il s'agit d'un complexe d'acides aminés essentiels (Arthur *et al.*, 1969, 1972 ; Rajendram & Hagen, 1974 ; Ding *et al.*, 1980 ; Wu & Qin, 1982 ; Kainoh ; 1989) ou non essentiels (Xie *et al.*, 1991). D'autres composés tels que le tréhalose (Hegdekar & Arthur, 1973) ou des sels (Nettles *et al.*, 1982) peuvent également induire cette ponte. Ces composés semblent d'ailleurs davantage intervenir dans les processus d'évaluation de la qualité ou « état sanitaire » de l'hôte que dans le processus d'identification de l'hôte.

L'identification de l'hôte se fait donc avant la piqûre. Il est réalisée par l'intermédiaire de **kairomones externes** perçues soit à courte **distance**, soit lors **du contact** même avec l'hôte. Seules celles impliquées lors du contact avec l'hôte ont été étudiées ici.

Il est difficile de savoir si ces **kairomones perçues à courte distance ou au contact** servent dans la phase ultime de localisation de l'hôte et/ou dans sa reconnaissance par les parasitoïdes (Schmidt, 1991 ; Alborn *et al.*, 1995).

Un certain nombre de kairomones indirectement issues de l'hôte et agissant à courte distance sur le comportement de reconnaissance de l'hôte par une espèce parasitoïde, a été identifié. Pour exemple, Takabayashi & Takahashi (1986a) ont déterminé que le 2,5-dialkyltetrahydrofuran présent dans les traces ("frass"), fèces, exuvies ou cires de *Pseudaletia separata* (Lep. : Noctuidae) stimulait la ponte de son parasitoïde *Cotesia kariyai* (Hym. : Braconidae). Des molécules comme le 2-acylcyclohexane-1,3-dione isolées des fèces de *Cadra cautella* (Lep. : Pyralidae) et de *Plodia interpunctella* (Lep. : Pyralidae) agiraient sur *Venturia canescens* (Hym. : Ichneumonidae) (Nemoto *et al.*, 1987). Ce type de composés isolés des glandes mandibulaires d'*Ephestia kuehniella* (= *Anagasta* ; Lep. : Pyralidae) provoquerait également un comportement d'examen de l'hôte par l'ovipositeur chez *Nemeritis canescens* (= *Venturia* ; Hym. : Braconidae) (Corbet, 1971 ; Mudd, 1981, 1985 ; Mudd & Corbet, 1982 ; Mudd *et al.*, 1984) et une modification de la réponse comportementale de *Bracon hebetor* (Hym. : Braconidae) (Strand *et al.*, 1989).

Toutefois, dans la plupart des cas, un **contact avec l'hôte** reste nécessaire. Il met en jeu des **facteurs chimiques** et/ou physiques **spécifiques** (Noda *et al.*, 1982 ; Noldus & Van Lenteren, 1985) présents à la surface de l'hôte ou au niveau de la structure qui l'enveloppe (galles sécrétées par la plante, oothèque ou cocon produits par l'hôte, ...).

La plupart des kairomones identifiées correspondent à de **petites molécules** (quelques exemples **tableau 8**).

D'autres études semblent indiquer, que les kairomones de contact peuvent également être **des macromolécules** telles que des protéines (quelques exemples **tableau 9**).

Principe de l'identification des kairomones de contact

Dans ce chapitre, notre étude s'est focalisée sur les composés chimiques du cocon d'*Acrolepiopsis assectella* qui déclenchent le comportement d'acceptation de la femelle parasitoïde, *D. pulchellus*.

Les seules données précises connues sur les composants des cocons de Lépidoptères, concernent *Bombyx mori*. Quatre types de composants du cocon de *Bombyx* ont ainsi été répertoriés (Fournier, 1979). Le majoritaire est de nature protéique, il représente 96% de la structure du cocon, avec trois types de protéines majeures (la fibroïne, la P25 et la séricine). Les autres composants sont des hydrates de carbone (1,5%), des pigments (1,5%) et des lipides (1%). Chez *B. mori*, la composition en acides aminés de fractions protéiques solubles dans l'eau (séricines) a été établie (Komatsu, 1979). Ce genre d'étude a également été mené sur des

fractions globales de protéines de soie d'autres arthropodes, mais la réelle composition de chacune des protéines constitutives n'a jamais été déterminée (Lucas *et al.*, 1957, 1960 ; pour revue Lucas & Rudall, 1968).

Dans notre étude, des composés chimiques variés extraits du cocon, en plus des cocons eux-mêmes, ont été testés en utilisant le leurre en coton comme support inerte du stimulus tactile nécessaire (**Chap. I**). Les composés du cocon qui paraissent être essentiels pour déclencher les séquences précoces du comportement d'acceptation de l'hôte ont été analysés par différentes méthodes (**Fig. 9**) :

❶ L'extraction d'un extrait de lavage de cocons à l'eau par différents solvants non miscibles a été utilisée pour étudier la **polarité des molécules actives**.

❷ Trois extraits de lavages de cocons (à l'hexane, au dichlorométhane, au méthanol) actifs en comportement sont analysés en Chromatographie en phase Gazeuse (CG) de façon à observer d'éventuelles différences **qualitatives** dans les composants volatilisés.

❸ Un extrait à l'eau a subi une série de **fractionnements** par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), dans le but d'isoler les composés actifs de type hydrates de carbone.

❹ Les **polypeptides du cocon** ont été **solubilisés** en utilisant un cocktail d'agents dénaturants, contenant principalement de la guanidine thiocyanate. Les polypeptides ont été purifiés par précipitation et dialysés (**a**). Les **polypeptides de l'extrait à l'eau actif**, purifiés par filtration, ont été **déglycosylés** par deux glycosylases et **digérés** par des protéases dans le but de spécifier leur nature et leur rôle potentiel dans le comportement des femelles de *D. pulchellus* (**b**). **L'hydrolyse des cocons** à l'acide périodique a complété les résultats (**c**).

A chaque étape de l'analyse, les polypeptides sont contrôlés par électrophorèse et leur activité sur le comportement de *D. pulchellus* a été vérifiée.

❺ La spécificité des polypeptides majoritaires du cocon a ensuite été appréhendée en déterminant par CLHP leur composition en acides aminés puis en comparant leur profil électrophorétique avec celui de protéines de cocons de soie d'autres Lépidoptères.

B) Matériels et Méthodes

1 - Insectes, tests et critères comportementaux

Les femelles *D. pulchellus* utilisées pour les expériences sont préparées de la même façon que dans le chapitre I.

Pour mémoire : pour chaque test comportemental, la femelle est placée en **situation de choix** entre un leurre témoin **et** un cocon (sans chrysalide, ni exuvie) ou un leurre expérimental. Ceux-ci sont fixés sur le fond d'une boîte de Pétri (5 cm de diamètre) pour éviter qu'ils ne soient déplacés par la femelle. Les leures retenus sont ceux formés d'une boule de coton hydrophile légèrement ovoïde et de taille équivalente à celle des cocons réels. Vingt microlitres d'extrait sont déposés sur un leurre expérimental ensuite séché. La quantité de " signal " déposé sera estimée pour chaque expérience. Les leures contrôles sont simplement imprégnés avec 20 μ l de solvant puis sont séchés.

Les deux critères, retenus au chapitre I, ont permis de quantifier le comportement d'acceptation de l'hôte. Il s'agit :

- de la **durée moyenne de contact** avec le leurre ou le témoin. Les résultats correspondent à la durée moyenne de contact / (femelle \times min d'observation) exprimée ensuite en secondes. Le test non-paramétrique d'analyse de variance de rang de **Kruskal-Wallis** a été utilisé pour comparer les diverses séries de données obtenues sur les échantillons indépendants.

- du **pourcentage de femelles** d'un groupe expérimental donné, présentant des contacts ou examens de l'extrémité abdominale avec le substrat. Les pourcentages obtenus sur les échantillons indépendants sont comparés à l'aide du test χ^2 .

Pour ces deux tests statistiques, nous considérons que pour un degré de liberté donné (**d.d.l.**), les différences sont significatives lorsque **P < 0,05**. Les valeurs de P sont données pour des situations bilatérales.

2 - Caractérisation des kairomones du cocon

2-1 Sources potentielles de kairomones

Tous les cocons utilisés ont été soigneusement débarrassés de leur chrysalide, exuvie et restes de milieu d'élevage. L'activité comportementale des femelles a été observée et analysée en présence des différentes sources possibles de kairomones :

- des **cocons âgés** stockés depuis 10 ans à la température ambiante et à l'obscurité dans une boîte de Pétri.

- des **jeunes cocons** datant de moins d'une semaine.

- des réservoirs des **glandes à soie** (glandes labiales salivaires modifiées chez les chenilles ou sericterium) des derniers stades larvaires d'*A. assectella*, disséqués et rincés à l'eau ultrapure (Millipore ; 19 MΩ ; pH 5,5). Pour le test comportemental, les deux réservoirs d'une larve sont écrasés sur un leurre en coton.

- des **extraits de cocons** lavés par deux solvants. Mille cocons de la souche élevée sur milieu artificiel avec poudre de poireaux sont lavés dans 10 ml de méthanol ou 10 ml d'eau ultrapure désionisée (**EE**), pendant 5 min à température ambiante et avec faible agitation. Les débris ou particules sont éliminés par filtration (0,45 μm Millipore, Millex HN résistant aux solvants). Les extraits obtenus sont ensuite stockés à 4°C.

2-2 Polarité

Les meilleurs résultats d'extraction ont été obtenus avec l'eau (**Chap. I**). Cet extrait à l'eau (**EE**) a donc été utilisé pour étudier la polarité des composés chimiques actifs.

Cette polarité est établie par partage de phases en utilisant des solvants organiques non miscibles à l'eau de polarité croissante (hexane, éther éthylique, acétate d'éthyle et butanol-1). Un même extrait de cocons aqueux (10 ml) a été extrait successivement par 2 × 5 ml de chaque solvant. Chacune des phases de solvant organique obtenue après extraction est déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre et filtrée (0,45 μm Millipore, Millex HN) (**Fig. 10**). Les fractions obtenues et l'eau résiduelle ont été déposées sur leurre et testées comportementalement à la quantité de 2 équivalents-lavage de cocons. Leur capacité à déclencher le comportement d'acceptation est déterminée.

3 - Analyse qualitative en chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CG) a la propriété de séparer des **composés**

rendus volatils par chauffage. Trois extraits de cocons ont été réalisés au moyen de trois solvants. Chacun d'entre eux a été analysé par chromatographie afin d'observer d'éventuelles différences qualitatives dans les chromatogrammes obtenus.

Les trois types d'extraits ont été obtenus comme précédemment, par lavage de 500 cocons de la souche élevée sur milieu plus poudre de poireaux, dans 5 ml d'**hexane**, de **dichlorométhane** ou de **méthanol** pendant 5 min à la température de la pièce et sous faible agitation. Les solvants ne sont pas préalablement déshydratés. Les débris ou particules sont éliminés par filtration (0.45 µm Millipore, Millex HN résistant aux solvants), et les extraits sont stockés à 4°C (Les extraits à l'eau n'ont pu être utilisés sur notre type de colonne standard de CG).

La séparation chromatographique a été réalisée sur un CG Varian 3400 (Walnut Creek, CA), équipé d'un injecteur « split-splitless » universel et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) permettant l'analyse de tous les composés organiques combustibles, chauffé à 300°C. La colonne capillaire HP1 possède une longueur de 20 m et un diamètre interne de 0,22 mm avec une épaisseur de film méthylsilicone de 0,33 µm. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : le gaz vecteur est l'hélium à une pression de 10 à 30 psi (débit moyen de 1ml/min), le programme de température est de 150 à 250°C avec un accroissement de 20°C/min pour l'injecteur et de 120 à 250°C avec un accroissement de 5°C/min pour la colonne. Le volume d'injection est de 1 µl. L'enregistrement des données se fait au moyen d'un simple enregistreur à aiguille à 5 mm/min.

4 - Essai d'isolement de composés hydrophiles par fractionnement CLHP

Pour des mélanges organiques complexes, la CG s'avère parfois peu informative car certains des composés sont trop polaires ou ne se volatilisent pas par chauffage du fait de leur masse moléculaire importante. La chromatographie liquide haute performance (CLHP) permet, quant à elle, d'isoler la plupart des composés. Elle a donc été choisie pour tenter d'isoler les composés solubles dans l'eau et en particulier les **hydrates de carbone libres**.

Les échantillons sont obtenus par lavages de 500 cocons dans 5 ml d'eau ultrapure désionisée. Ils sont concentrés jusqu'à obtention d'un volume de 100 µl en utilisant un système rotavapor, puis sont filtrés 0,22 µm (Millipore, Millex). Le volume de l'injection est de 20 µl.

Le système CLHP non thermostaté est constitué d'une pompe Bio-Rad utilisée en système isochratique et d'un détecteur à barrette de diodes Hewlett Packard (HP) 1040 M.

Cette barrette permet de détecter tous les composés qui absorbent dans l'UV, ceci en une seule injection puisque ce détecteur balaie toute la gamme de longueurs d'onde. Il faut savoir que la plupart des composés organiques absorbent à des longueurs d'onde inférieures à 200 nm. Une longueur d'onde faible se traduirait par une faible spécificité donc la longueur d'onde d'observation choisie a été de 220 nm. La colonne est une NH₂ LiChrosorb® (250 mm × 3 mm, taille de particules de 5 µm) utilisée généralement pour la séparation d'hydrates de carbone. L'éluant est un mélange acétonitrile/eau (70/30). Le débit est de 0,5 ml/min.

L'enregistrement chromatographique est suivi sur ordinateur et des fractions sont récupérées à des intervalles de temps variables. Chacune des fractions est de nouveau concentrée sous vide par évaporation en rotavapor jusqu'à obtention d'un volume d'environ 50 µl. Vingt microlitres de celles-ci sont alors déposés sur un leurre et testés en comportement pour déterminer leur capacité à déclencher un comportement d'acceptation de l'hôte chez les femelles de *D. pulchellus*.

5 - Isolement des polypeptides du cocon et élimination des petites molécules

5-1 Extrait à la guanidine – Dialyse et précipitation

La plupart des polypeptides du cocon polymérisent et précipitent dans des solvants aqueux non-dénaturants. Une solution de guanidine thiocyanate 4 M, solvant très dénaturant, a donc été utilisée pour solubiliser les polypeptides.

Pour solubiliser et isoler tous les polypeptides, 1000 cocons ont été dissouts par incubation durant toute la nuit à 65°C, dans 50 ml de la solution suivante : 4 M guanidine thiocyanate / 2% N-lauroyl sarcosine / 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 50 mM acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA) / 0.1% 2-mercaptoéthanol (Chirgwin *et al.*, 1979).

De façon à éliminer les fibres de cocons pouvant rester, l'extrait résultant est filtré sur fibres de verre en seringue de 50 ml. Des résultats préliminaires ayant montré que la guanidine thiocyanate était répulsive pour *D. pulchellus*, celle-ci est enlevée par dialyse contre 5 litres d'une solution de Tris-HCl (10 mM pH 7,4, répétée 4 fois) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CompleteTM, Boehringer Mannheim). Des membranes de cellulose de porosité 12 à 14 kDa (produit Spectra / Por) ont été utilisées pour la dialyse.

Dans le but de reprendre en solution les polypeptides du cocon d'*A. assectella*, l'extrait est ensuite resuspendu en 4 M urée (extrait **ED**), puisqu'ils tendent à se polymériser sous une

faible force ionique (par exemple 1 à 10% SDS).

Pour s'assurer de l'élimination de toutes les petites molécules libres (hydrates de carbone libres, acides aminés, sels organiques ou inorganiques, etc.) et isoler **les polypeptides du cocon**, cet extrait en 4 M urée est précipité avec du sulfate d'ammonium (90% w/v). Le culot de polypeptides résultant est dissout et dialysé de nouveau.

5-2 Extrait à l'eau - Filtration

L'extrait de cocons à l'eau (**EE**) est concentré par lyophilisation⁵, puis fractionné par filtration sur gel (chromatographie de séparation) de Sephadex G 75 (séparation entre 3000-8000 Da pour des protéines globulaires, Pharmacia) en colonne (10 cm × 0,5 cm de Ø) (extrait **EF**). L'eau désionisée est utilisée comme éluant. Les fractions contenant **des polypeptides natifs** sont ensuite identifiées par électrophorèse suivie d'une coloration à l'argent (procédure décrite au paragraphe B 7) et rassemblées. Ce traitement est répété pour assurer l'élimination des petites molécules et la purification de l'extrait.

5-3 Tests comportementaux

L'extrait de polypeptides dialysé redissout dans l'urée 4 M (**ED**) et l'extrait polypeptidique filtré sur Sephadex (**EF**) sont alors testés en comportement à la quantité de 10 équivalents-lavage cocons par leurre. Les femelles de *D. pulchellus* sont alors placées en situation de choix entre un leurre témoin et un leurre sur lequel 20 µl d'extrait ont été déposés.

6 - Dénaturation du cocon et des polypeptides isolés

Différents traitements de dénaturation sont réalisés afin de cibler la nature exacte du signal kairomonal.

6-1 Par l'acide périodique

L'acide périodique hydrolyse toutes les chaînes d'hydrates de carbone (pas de spécificité de ce réactif puissant pour des liaisons de type N-glyco- ou O-galactosamine).

Des cocons frais sont dégradés par hydrolyse avec 10% (w/v) d'acide périodique, à

⁵ Déshydratation par congélation suivie de sublimation.

température ambiante, durant toute une nuit. Les cocons résultants, de couleur rose, sont alors rincés à l'eau plusieurs fois et séchés.

6-2 Par l'action de N- et O-glycosidases

Un aliquote de l'extrait de polypeptides filtré (**EF**) est laissé à incuber en présence de la O-glycosidase (EC 3.2.1.97) ou de la N-glycosidase F (EC 3.2.2.18 et EC 3.5.1.52) à 37°C, pendant 4 h. Ces expériences de déglycosylation sont réalisées avec un kit de déglycosylation contenant les tampons, les protéines contrôles glycosylées et non-glycosylées (N° 1836552) et en suivant les instructions du fabricant (Boehringer Mannheim). Ces endoglycosidases hydrolysent les chaînes polypeptidiques-hydrates de carbone au niveau des liaisons sérine-O- ou thréonine-O-(acétyl galactosamine), ou asparagine-N-(acétyl- β -glucosamine). Ainsi, les chaînes de carbohydrates sont séparées des chaînes polypeptidiques (**Fig. 11**). Un aliquote n'ayant pas subi de traitement aux endoglycosidases est utilisé comme contrôle. Après déglycosylation, les chaînes de carbohydrates libérées sont éliminées comme précédemment, par filtration en colonne sur gel de Sephadex G 75 et en utilisant l'eau comme éluant. Les fractions de polypeptides déglycosylées sont repérées et révélées par électrophorèse et coloration (méthode section suivante).

6-3 Par la pronase

Un aliquote de l'extrait de polypeptides filtré (**EF**) a été digéré par incubation avec 100 μ g / ml de pronase (endo- et exo-protéases aspécifiques de *Streptomyces griseus*, Boehringer Mannheim ; **Fig. 12**) ajoutés à une solution de Tris-HCl (10 mM pH 7,4), à 37°C pendant 4 h. Le résultat de la digestion a été analysé par électrophorèse. Un aliquote non traité par la pronase a été utilisé comme contrôle. Pour le test comportemental, la pronase est additionnée au contrôle juste avant l'expérience.

6-4 Tests comportementaux

L'extrait de polypeptides filtré (**EF**) sans chaînes de carbohydrates et son contrôle correspondant, l'extrait de polypeptides digérés et son contrôle correspondant, et les cocons traités à l'acide périodique ont été testés en comportement. Les extraits ont été testés à la concentration de 10 équivalents- lavage cocons.

7 - Gels d'électrophorèse et coloration des polypeptides du cocon

Les polypeptides des divers extraits, l'extrait polypeptidique dialysé en urée 4M (**ED**), l'extrait polypeptidique filtré (**EF**), l'extrait polypeptidique déglycosylé et l'extrait polypeptidique protéolysé et leur contrôle sont séparés sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide en sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), sous conditions dénaturantes en utilisant du 2-mercaptoéthanol. Les mêmes volumes d'échantillon contenant la même quantité de polypeptides totaux (10 µg) sont déposés sur gel (16 × 14 cm, épaisseur 1 mm) contenant de 7 à 10% de polyacrylamide (Laemmli, 1970 ; Ausubel *et al.*, 1990). Les électrophorèses sont réalisées pendant 12 h à 30 V ou pendant 3 h à 130 V. Les divers polypeptides se séparent en fonction de leur poids moléculaire. Ces derniers sont déterminés en utilisant des marqueurs de poids moléculaires standards (7,5 à 330 kDa, BioRad).

Après migration, deux techniques de coloration de protéines ont été utilisées :

❶ Coloration au **bleu de Coomassie® colloïdal** (Neuhoff *et al.*, 1988, 1990)

Les gels sont passés dans des bains successifs, selon la procédure décrite dans le **tableau 10**.

❷ Coloration à l'**argent** (Blum *et al.*, 1987)

Les gels sont passés dans des bains successifs, selon la procédure décrite dans le **tableau 11**.

8 - Composition en acides aminés des polypeptides du cocon

La composition en acides aminés des polypeptides du cocon a été déterminée à partir de différents échantillons : cocons, polypeptides du cocon solubles et insolubles dans l'eau, polypeptides natifs isolés de l'extrait (**EF**), chacun des polypeptides dénaturés purifiés.

8-1 *Polypeptides totaux natifs du cocon*

❶ Cinq milligrammes de **cocons** (environ 5 cocons) âgés de moins d'une semaine ont été isolés pour déterminer la composition globale en acides aminés de leurs protéines.

❷ Les **polypeptides du cocon solubles dans l'eau** ont été extraits en eau bouillante sans addition de détergent (Lucas *et al.*, 1960 ; Lucas & Rudall, 1968). Trois cent milligrammes de cocons âgés de moins d'une semaine sont placés dans 10 ml d'eau ultrapure

désionisée pendant 1 h à 100°C et avec faible agitation. L'extrait résultant est filtré sur fibres de verre en seringue de 50 ml, de façon à isoler les cocons restants (cf ③). Les débris ou particules du surnageant sont éliminés par filtration (0,45 µm Millipore, Millex HN résistant aux solvants). Pour s'assurer de l'élimination des acides aminés libres et isoler les polypeptides du cocon solubles dans l'eau, cet extrait a été dialysé contre 5 litres d'eau ultrapure (3 changements), pendant 24 h. Pour ce faire, des tubes de dialyse de porosité 12 à 14 kDa (produit Spectra / Por) sont utilisés. **L'extrait contenant les polypeptides solubles dans l'eau (ES)** a ensuite été lyophilisé puis conservé à 4°C.

③ Cinq milligrammes de cocons résultants de la filtration sur fibres de verre sont rincés à l'eau ultrapure puis desséchés par lyophilisation. Ils sont conservés pour l'étude des **polypeptides insolubles dans l'eau (EI)**.

Les trois expériences ont été répétées une fois afin d'obtenir deux déterminations de la composition en acides aminés de chaque extrait.

8-2 Polypeptides isolés, natifs et dénaturés du cocon

L'isolement de tous les polypeptides majoritaires du cocon a nécessité l'utilisation de deux techniques :

- une filtration sur colonne qui ne dénature pas les polypeptides mais ne permet pas une purification suffisante,
- des électrophorèses qui certes dénaturent les polypeptides mais permettent une meilleure séparation de chacun d'eux.

a) Les polypeptides natifs

Les polypeptides du cocon d'un extrait à l'eau (**EE**) ont été isolés par filtration sur colonne de Sephadex selon la procédure décrite au paragraphe 5-2 (extrait **EF**). L'échantillon obtenu a été conservé pour déterminer la composition en acides aminés globale de ces **polypeptides natifs**.

La procédure expérimentale est répétée 2 fois afin d'effectuer 3 injections différentes en CLHP. Ainsi, 3 déterminations différentes de la composition en acides aminés de ces polypeptides réunis ont pu être obtenues.

b) Les polypeptides dénaturés

Pour obtenir les polypeptides majoritaires du cocon, un extrait à la guanidine a été

préparé (paragraphe 5-1) : 1000 cocons sont dissouts par incubation durant toute la nuit à 65°C, dans 50 ml de la solution de guanidine thiocyanate 4 M.

Les fibres de cocons pouvant rester, les débris ou les particules de l'extrait résultant sont éliminés par filtration sur fibres de verre en seringue de 50 ml puis sur filtre Millipore (0,45 µm de porosité, Millex). Les "détergents" de la solution de guanidine thiocyanate sont ensuite enlevés par dialyse contre 5 litres d'eau (3 changements) pendant 24 h en utilisant les tubes de dialyse de porosité 12 à 14 kDa (produit Spectra / Por). L'extrait résultant est lyophilisé.

Les polypeptides de l'extrait résultant (**EG**) ont été séparés sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide (SDS-PAGE), sous conditions dénaturantes selon la procédure utilisée au paragraphe B-7. Les mêmes volumes d'échantillon contenant la même quantité de polypeptides totaux (10 à 15 µg) ont été déposés sur gel. Le choix du pourcentage de polyacrylamide contenu dans le gel (7 à 10 %) est fonction de la taille des polypeptides à électroéluer et de la séparation désirée entre les polypeptides.

Après migration, chaque gel a été fixé et coloré au bleu de Coomassie® en utilisant une solution contenant : 20 % (v/v) de méthanol, 1 % (v/v) d'acide acétique et 0,1 % (w/v) de bleu de Coomassie® G250 et R250, ceci pendant 5 à 7 min. Les quantités d'acide acétique et de méthanol ont été délibérément réduites afin d'augmenter l'électroélution des polypeptides du gel. Les gels ont été ensuite décolorés à l'aide d'une solution de méthanol 30 % (v/v), jusqu'à apparition des bandes polypeptidiques majoritaires. Chaque bande, correspondant à un polypeptide (ou plusieurs de même taille), a été découpée puis isolée.

L'électroélution des bandes a été réalisée selon une procédure mise au point pour l'expérience (**Fig. 13**). Chaque bande est placée à l'intérieur de deux tubes Eppendorf joints tête-bêche. Chacune des extrémités est fermée à l'aide d'une membrane de dialyse de porosité 12 à 14 kDa (Spectra / Por). Les tubes, contenant chacun les bandes d'un même polypeptide isolé, sont alors placés dans une cuve d'électrophorèse contenant une solution de Tris-HCl (10 mM pH 9) / SDS à 0,5 %, pendant 1 h 30 (100 volts). Pour chaque polypeptide, l'opération est réalisée 2 fois de suite. Il peut ainsi s'extraire du gel de polyacrylamide. Le surnageant résultant a été récolté puis dialysé contre 5 litres d'eau (3 changements). Des tubes de dialyse de porosité 12 à 14 kDa sont utilisés de façon à éliminer les sels. Chaque surnageant est ensuite lyophilisé.

La procédure a été répétée jusqu'à l'obtention d'une quantité de matériel suffisante pour déterminer la composition en acides aminés de **chaque polypeptide isolé et purifié**. Selon la quantité récupérée, la détermination de la composition en acides aminés de certains polypeptides a pu être réalisée plusieurs fois.

8-3 Chromatographie Liquide Haute Performance

Les divers échantillons contenant les **cocons**, les **polypeptides du cocon solubles et insolubles dans l'eau**, les **polypeptides natifs isolés de l'extrait (EF)**, ou **chacun des polypeptides dénaturés purifiés** sont hydrolysés en HCl 6 N pendant 24 h à 110°C dans des tubes scellés. La composition est déterminée sur chacun des hydrolysats par dérivation couplée à la CLHP en phase inverse. La méthode Pico-Tag® commercialisée par Waters (Bidlingmeyer *et al.*, 1984) utilisant le phénylisothiocyanate comme réactif de dérivation a été utilisée (Heinrickson & Meredith, 1984 ; Auger *et al.*, 1993).

Le système CLHP est constitué d'un chromatographe Waters à deux solvants. La colonne utilisée pour les analyses est une C18 Novopak (3,9 mm de Ø × 300 mm de long, Waters) thermostatée à 46 °C. La détection est effectuée par un détecteur UV Waters dont la longueur d'onde est fixée à 254 nm. La séparation est faite en gradient d'éluion à partir de deux solvants : **A**, réf. Waters 10960 et **B**, méthanol-eau-acétonitrile (15 %, 40 %, 45 %). Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min. Les temps de rétention des acides aminés ont été déterminés en injectant préalablement un standard de 17 acides aminés (détails **Annexe I**).

C) Résultats - Interprétations

1 - **Activité des différentes sources potentielles de kairomones sur le comportement d'acceptation de l'hôte par *D. pulchellus***

Des cocons frais (**CF**), des cocons âgés de 10 ans (**CA**), des leurres sur lesquels sont déposés les glandes séricigènes (**GS**), et des leurres imprégnés par des extraits de cocons préparés à l'eau désionisée (**EE**) ou au méthanol (**EM**) sont testés en comportement. Pour chaque cas, la durée moyenne de contact / (femelle × min) et le pourcentage de femelles ayant présenté un examen du cocon ou du leurre expérimental au moyen de l'extrémité abdominale sont relevés (**Fig. 14a**).

Les leurres témoins ont été choisis en fonction des sources testées, ils sont répertoriés ci-après :

Source	Cocon frais	Cocon âgé	Glande séricigène	Extrait à l'eau	Extrait au méthanol
Témoin	Coton	Coton	Coton	Coton + eau	Coton + méthanol

Les valeurs obtenues pour les leurres témoins ne sont pas présentées sur le graphique

car les durées moyennes / (femelle × min) sont trop faibles (inférieures à 0,8 sec) et qu'aucun examen abdominal n'a été observé.

Dans les 4 cas, **CF**, **CA**, **GS** et **EE**, les durées moyennes de contact réalisées par femelle ne présentent pas de différences significatives (approximativement 40 sec) ($p=0,479$, Kruskal - Wallis). Par contre, cette durée est significativement inférieure lorsque le leurre est imprégné d'un extrait de cocons lavés au méthanol (**EM** = 23,5 s). La même tendance s'observe pour le second critère : les proportions de femelles présentant des examens abdominaux sont proches de 100 % et non significativement différentes entre elles, excepté dans la situation **EM** pour laquelle seulement 55 % des femelles ont présenté ce comportement.

Ces **résultats** indiquent que :

- les composés déclenchant le comportement d'acceptation de l'hôte chez *D. pulchellus* sont toujours présents dans des cocons conservés 10 années durant à température ambiante,
- les kairomones et / ou leurs précurseurs actifs sont présents dans les glandes séricigènes,
- les réponses comportementales obtenues avec l'extrait à l'eau sont significativement supérieures à celles observées avec l'extrait au méthanol. ce résultat suggère que les kairomones sont très polaires.

2 - Polarité et nature des kairomones du cocon

Les leurres témoins traités avec les solvants seuls (hexane, éther éthylique, acétate d'éthyle, butanol-1, eau) ne déclenchent pas d'activité comportementale. Les données correspondantes n'ont donc pas été représentées sur le graphique.

Les fractions à l'hexane, à l'éther éthylique, à l'acétate d'éthyle et au butanol-1 issues de l'extrait à l'eau (**EE**) stimulent peu ou pas l'activité d'acceptation de l'hôte par les femelles de *D. pulchellus* (**Fig. 14b**). La fraction d'eau résiduelle donne la meilleure réponse comportementale : longue durée de contact et fort pourcentage de femelles avec examen abdominal. Ceci confirme que les **composés actifs sont fortement polaires**. Ces composés actifs présents dans l'extrait à l'eau pourraient être des sucres ou des polypeptides, molécules parmi les plus polaires de la soie de cocon (Fournier, 1979). Les faibles scores comportementaux obtenus avec l'extrait au méthanol (**Fig. 14a, EM**), qui est un solvant connu pour précipiter les protéines, supportent cette hypothèse.

3 - Analyse qualitative en chromatographie en phase gazeuse

Les trois extraits de lavage (hexane, dichlorométhane et méthanol) obtenus, utilisés pour extraire le ou les composés actifs du cocon, ont été analysés en CG afin d'observer d'éventuelles différences qualitatives et de sélectionner le(s) pic(s) correspondants pour une identification ultérieure en CG couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM).

Les trois chromatogrammes (**Fig. 15, 16 et 17**) présentés indiquent le nombre de composés "volatilisables" présents dans chacun des extraits. Le nombre moyen est de 22 pics. Ce nombre élevé et la faible quantité de chacun des composés rendent l'analyse de chacun d'eux difficilement réalisable. La majorité des pics sont communs aux trois extraits. Ils se situent essentiellement en milieu et fin de chromatogramme : groupes de pics entre 19,7 - 21 min et 23 - 25 min, deux pics entre 30 - 32 min et 37 - 39 min ainsi que les deux derniers pics.

Les profils chromatographiques obtenus en CG des extraits à l'hexane (**Fig. 15**), au méthanol (**Fig. 16**) et au dichlorométhane (**Fig. 17**), solvants non préalablement déshydratés, ne présentent pas de différences majeures. L'extraction des composés du cocon par ces 3 solvants, pourtant de polarité différente, reste donc peu spécifique alors qu'il a été vu précédemment que les solvants polaires étaient plus efficaces.

Les faibles différences de profil pourraient s'expliquer par :

- la présence en plus ou moins grande quantité de molécules d'eau au sein des solvants et donc une extraction non spécifique,
- le fait que les composés du signal sont en faible quantité, il faudrait alors un autre type de colonne pour injecter l'extrait aqueux (**EE**) qui paraît plus concentré,
- le fait que les composés recherchés sont des macromolécules que cette technique ne permet pas d'étudier et donc de séparer.

L'absence de différence entre les différents extraits (peu spécifique) et la complexité des profils chromatographiques observés nous a conduit à entreprendre une autre approche.

4 - Essai d'isolement de composés hydrophiles par fractionnement CLHP

Suite aux résultats ci-dessus, l'autre approche a consisté à s'intéresser aux composés hydrophiles de la fraction aqueuse, en particulier, aux hydrates de carbone libres que pouvait contenir un tel extrait. Des séparations des composés de l'extrait à l'eau (**EE**) en Chromatographie Liquide Haute Performance ont donc été réalisées.

4-1 Le chromatogramme

Le chromatogramme obtenu (**Fig. 18**) à la longueur d'onde de 220 nm après injection d'un échantillon d'extrait à l'eau (**EE**), présente environ 25 pics dont 5 majoritaires. Bien que ces 5 pics présentent des variations d'intensité d'un extrait à l'autre, ils demeurent majoritaires.

De façon à déterminer ultérieurement dans quel(s) pic(s) se trouvent les composés actifs en comportement, les échantillons injectés sont recueillis par fractions puis testés. Ainsi, un échantillon rassemblant toutes les fractions de l'extrait injecté en CLHP, et trois fractions au maximum correspondant aux différents groupes de pics ont pu être réalisées. Les fractions sont déposées sur un leurre et proposées aux femelles.

4-2 Tests comportementaux

La durée moyenne de contact et le pourcentage de femelles ayant présenté des contacts abdominaux avec un leurre imprégné de 20 µl d'extrait ou de fractions d'extraits variés à la quantité de 40 équivalents-lavage-cocons figurent respectivement dans les **tableaux 12** et **13**.

Les témoins consistent en un leurre en coton imprégné de 20 µl d'eau.

Dans toutes les situations expérimentales, excepté sur la fraction 5 - 10 min de la quatrième séparation chromatographique, les femelles parasitoïdes passent significativement plus de temps sur le leurre imprégné d'une fraction d'extrait que sur le témoin (leurre en coton + eau). Que l'extrait à l'eau de cocons ait été passé ou non en CLHP ne modifie significativement pas le temps que les femelles passent sur le leurre imprégné. Cette technique semble donc pouvoir être utilisée sans crainte de détruire l'activité des extraits à l'eau en comportement.

Il faut toutefois noter la grande variabilité des réponses observées (SEM supérieure à 7 pour la fraction recueillie après la première chromatographie).

Sur les trois premières fractions de la deuxième séparation (5 - 20 min, 20 - 35 min et 35 - 50 min) seules les deux dernières fractions semblent présenter une activité.

La fraction 5 - 20 min se caractérise par une durée moyenne de contact avec le leurre très significativement inférieure à celle de l'extrait total à l'eau, avant ou après CLHP, et aucun examen abdominal. Cependant, des fractionnements supplémentaires réalisés sur les 15 premières minutes d'une nouvelle séparation (injection 3), donne une fraction (5 - 15 min) provoquant une forte réponse chez les femelles, tant au niveau de la durée moyenne de contact qu'au niveau de l'apparition des contacts abdominaux.

D'autres essais de séparation (injection 4 par exemple) ont montré la variabilité et l'incohérence des résultats sur des fractions similaires. De plus, les profils chromatographiques de fractions recueillies, concentrées puis réinjectées s'avèrent présenter des différences quantitatives (**Fig. 19**). Ainsi, les fractions 5 - 10 min et 10-15 min réinjectées présentent des absorbances de pics (reflet quantitatif) fortement diminuées. Les différences d'activité comportementale obtenues pour des échantillons a priori identiques sont difficiles à expliquer. Différentes hypothèses sont envisageables : 1) une instabilité des composés actifs dans l'acétonitrile, 2) une absence de détection de ces composés actifs dans l'UV, 3) une différence quantitative des composés actifs dans les fractions testées en comportement suite à la reconcentration réalisée par une technique mal adaptée (rotavapor utilisé peu adéquat pour de faibles quantités).

Cette technique ne nous a donc pas permis de faire la correspondance entre les pics observés, sensés représenter des molécules hydrophiles, en particulier des hydrates de carbone, et l'activité de l'extrait sur le comportement des femelles *D. pulchellus*.

Ces résultats difficilement exploitables, nous ont conduit à abandonner cette technique de fractionnement pour une autre.

5 - Activité des extraits de cocon après élimination des petites molécules

L'isolement des composés actifs a été réalisé par élimination sélective (critère de taille) de certains composants des extraits avec l'idée que les protéines du cocon pouvaient intervenir. En effet, comme précisé antérieurement, le cocon de *B. mori*, le plus étudié et le mieux connu, est composé à plus de 95% de protéines (Fournier, 1979 ; Weseloh, 1977).

Suite à la dialyse ou à la filtration sur gel de Sephadex G75, les petites molécules telles que les hydrates de carbone libres, les acides aminés, les sels inorganiques et les sels organiques, sont éliminées des extraits de cocons. Les extraits résultants sont déposés sur un leurre artificiel. Les résultats comportementaux obtenus sont ensuite comparés à ceux observés chez les femelles en présence de cocons frais ou d'extraits de cocons.

Les valeurs relatives aux durées moyennes de contact et au pourcentage de femelles ayant présenté des contacts abdominaux avec les cocons frais (**Fig. 14a, CF**), un leurre imprégné par l'extrait polypeptidique en guanidine dialysé redissout dans l'urée 4 M et l'extrait

polypeptidique filtré (**Fig. 20, ED et EF**) ne sont pas significativement différentes (test de Kruskal-Wallis, $p = 0,12$; test Chi-carré, d.d.l.=2, $p=0,37$). Ainsi, **les composés chimiques qui déclenchent l'acceptation de l'hôte sont des molécules de taille supérieure à 14 kDa**. Compte tenu de cette information de taille, il pourrait s'agir de polypeptides ou de glycopolypeptides.

6 - Caractérisation des polypeptides du cocon

6-1 Composition en polypeptides du cocon

Les polypeptides de cocons d'*A. assectella* de l'extrait polypeptidique total préparé en guanidine thiocyanate et dialysé (**ED**) ont été séparés sur gels SDS-PAGE. Trois gels ont été réalisés (**Fig. 21**) :

- a) 7 % de polyacrylamide, coloration à l'argent
- b) 10 % de polyacrylamide, coloration à l'argent
- c) 10 % de polyacrylamide, coloration au bleu de Coomassie® colloïdal.

Environ **27 bandes** d'un poids moléculaire allant de 20 à 350 kDa sont révélées sur les profils des gels présentés **Figures 21a et 21b**.

La coloration au bleu de Coomassie® (**Fig. 21c**) donne un profil de bandes similaire et permet une estimation semi-quantitative des différents polypeptides. **Neuf bandes** parmi les 27 semblent représenter approximativement 95% du matériel total déposé (par comparaison de l'intensité des différentes bandes).

6-2 Analyse des polypeptides du cocon solubles dans l'eau

L'analyse comportementale préliminaire ayant montré que des extractions aqueuses de cocons suffisaient pour déclencher l'acceptation de l'hôte, les polypeptides uniquement extraits à l'eau ont été étudiés.

Ces polypeptides du cocon d'*A. assectella* de l'extrait à l'eau filtré (**EF**) ont subi différents traitements enzymatiques (déglycosylations, protéolyse) de façon à déterminer la présence éventuelle d'hydrates de carbone fixés et confirmer leur nature polypeptidique. Les extraits résultants ont été séparés sur gels SDS-PAGE contenant 10 % de polyacrylamide, colorés ensuite à l'argent. Pour tous les gels présentés, les lignes M correspondent au profil du marqueur de taille.

❶ Profil des polypeptides des extraits **EF** et **ED** (**Fig. 22**)

Les polypeptides de l'extrait polypeptidique à l'eau et filtré (**EF**, ligne 1) présentent un profil plus simple que celui de l'extrait polypeptidique total dialysé (**ED**, ligne 2). Seules **4 bandes** avec un poids moléculaire respectif de 70, 78, 86 et 90 kDa sont révélées.

❷ Profil des polypeptides de l'extrait **EF** traité ou non par des glycosidases (**Fig. 23**)

L'analyse de ces 4 polypeptides a été poursuivie en recherchant d'éventuelles glycosylations.

Le profil du gel SDS-PAGE de l'extrait de polypeptides filtré (**EF**) traité par la N-glycosidase F (**Fig. 23a**, ligne 1) est différent de celui relatif à l'extrait non-traité (**Fig. 23a**, ligne 2). Seules **2 bandes**, de poids moléculaire légèrement inférieur à 67 et 80 kDa (**Fig. 23a**, ligne 1) sont présentes. Ces résultats, comparés à ceux de la N-déglycosylation des protéines ou des glycoprotéines contrôles du kit (**Fig. 23a**, lignes 3 et 4), suggèrent que les **4 polypeptides** du cocon d'*A. assectella* présents dans l'extrait filtré (**EF**) **sont N-glycosylés**.

Le profil du gel SDS-PAGE de l'extrait filtré (**EF**) traité par la O-glycosidase (**Fig. 23b**, ligne 1) est similaire au profil de l'extrait polypeptidique original (**EF**) (**Fig. 23b**, ligne 3). Ce résultat suggère que les **4 polypeptides du cocon** d'*A. assectella* présents dans l'extrait filtré (**EF**) **ne sont pas O-glycosylés**. En ligne 2 figure le profil de la O-glycosidase seule.

❸ Profil des polypeptides de l'extrait **EF** traité ou non à la pronase (**Fig. 24**)

Pour prouver que les 4 bandes correspondent bien à des polypeptides, l'extrait **EF** (ligne 1) a été digéré par la pronase (ligne 2), mélange d'enzymes coupant les liaisons peptidiques.

L'hydrolyse par la pronase se traduit par la disparition de ces 4 bandes polypeptidiques (ligne 2). Quant aux bandes de faible poids moléculaire présentes (ligne 2), elles proviennent de la pronase elle-même (contrôle pronase seule, ligne 3) et de la digestion des 4 bandes de haut poids moléculaire.

L'activité des (glyco)polypeptides du cocon sur le comportement d'acceptation de l'hôte (cf partie 5 des résultats) pourrait par conséquent être dûe :

- soit aux molécules intactes (constituant polypeptidique + hydrates de carbone),
- soit aux chaînes d'hydrates de carbone fixées sur les polypeptides,
- soit au moins à l'une des deux chaînes polypeptides.

6-3 Activité comportementale des chaînes polypeptidiques seules

Les différents extraits obtenus dans la section ci-dessus et les cocons traités à l'acide périodique (**AP**) ont été testés en comportement. Les résultats relatifs à la durée moyenne de contact et au pourcentage de femelles ayant présenté un contact abdominal avec le leurre imprégné d'extrait sont donnés **figure 20**. Les valeurs obtenues pour les leurres témoins ne sont pas présentées sur le graphique car aucune réponse n'a été observée.

L'extrait polypeptidique à l'eau et filtré (**EF**), un aliquote traité avec la N-glycosidase F (**NG**) et un aliquote traité dans les mêmes conditions que NG mais sans N-glycosidase F (**CG**) ont été testés pour leur activité à déclencher le comportement d'acceptation de l'hôte.

Le comportement des femelles de *D. pulchellus* exprimé en réponse à ces 3 extraits est comparable. La durée moyenne de contact et le pourcentage de femelles ayant présenté un examen abdominal ne présentent pas de différences significatives (respectivement, test Kruskal-Wallis, **p=0,483** ; test Chi-deux, d.d.l.=2 **p=0,382** ; **Fig. 20**). Puisque la N-déglycosylation n'affecte pas le comportement des femelles parasitoïdes et que cet extrait **NG** avait été filtré sur colonne pour éliminer les hydrates de carbone libérés par l'action enzymatique, **les chaînes polypeptidiques semblent être suffisantes pour déclencher le comportement d'acceptation de l'hôte.**

Le nombre de femelles ayant présenté un examen abdominal est significativement inférieur en présence de cocons traités à l'acide périodique 10%, donc sensés ne plus porter d'hydrates de carbone (**Fig. 20, AP**). Cependant, les cocons induisent des durées de contact longues et statistiquement non différentes de celles observées avec les cocons frais non traités (**Fig. 14 CF** ; test de Kruskal-Wallis, **p=0,05**). De plus, le pourcentage de femelles présentant des examens abdominaux est significativement supérieur à celui observé avec le leurre contrôle (proche de zéro, non montré). Tous ces résultats suggèrent à nouveau que **les chaînes polypeptidiques sont suffisantes pour déclencher le comportement d'acceptation de l'hôte.**

L'acide périodique est également susceptible d'oxyder des acides aminés tels que la tyrosine, le tryptophane et la méthionine (Handman *et al.*, 1987). Cette propriété pourrait expliquer les différences de pourcentages observées entre les cocons non-traités (**CF**) et ceux traités à l'acide périodique (**AP**), puisqu'il pourrait y avoir une certaine dégradation des polypeptides.

L'extrait polypeptidique filtré (**EF**), un aliquote digéré par la pronase (**PD**) et son contrôle (**CP**), sont testés pour leur capacité à déclencher le comportement d'acceptation de l'hôte (**Fig. 20**). Des femelles mises en présence d'un leurre imprégné d'un aliquote d'extrait polypeptidique digéré à la pronase présentent des durées moyennes de contact très courtes avec ce leurre et aucun examen abdominal. Ainsi, les polypeptides hydrolysés ne semblent stimuler que peu le comportement d'acceptation de l'hôte par les femelles de *D. pulchellus*.

L'intégrité de certains des polypeptides du cocon a besoin d'être préservée pour déclencher le comportement d'acceptation de l'hôte par les femelles de *D. pulchellus*.

7 - La spécificité des polypeptides du cocon

7-1 Polypeptides majeurs du cocon isolés par électroélution

Nous avons considéré que les 2 glycopolypeptides de haut poids moléculaire (90 et 86 kDa) correspondaient à un seul et même polypeptide (bande **B1**), et qu'il en était de même pour les 2 autres glycopolypeptides de plus bas poids moléculaire (78 et 70kDa, bande **B2**).

Huit polypeptides majoritaires des cocons d'*A. assectella* de l'extrait polypeptidique dialysé (**EG**) ont été isolés par électroélution pour obtenir leur composition respective en acides aminés.

Sur le gel SDS-PAGE, contenant 10 % de polyacrylamide, puis coloré à l'argent (**Fig. 25**) sont présentés 5 des 8 polypeptides **dénaturés purifiés** (P30, B2, B1, P100, P150) et les polypeptides P35 et P37 non encore isolés.

Le polypeptide P300, de plus haut poids moléculaire (300kDa), n'a pas été déposé en quantité suffisante pour le détecter en coloration à l'argent. Par contre, la composition en acides aminés de ce polypeptides a été obtenue (paragraphe suivant).

7-2 Composition en acides aminés des différents polypeptides du cocon

Les compositions en acides aminés des polypeptides des **cocons, des polypeptides solubles (ES) ou insolubles (EI) dans l'eau, des polypeptides natifs (B1 + B2) isolés de l'extrait (EF), ou de chacun des polypeptides dénaturés purifiés** sont présentées **tableau 14**. Les analyses ont été répétées pour chaque échantillon (P30, P35, P37, B2, B1, P100, P150, P300) 1 ou 2 fois (**tableau 14**).

Les différentes proportions ne sont données que pour 17 acides aminés, les hydrolyses

en HCl modifiant l'asparagine et la glutamine (perte d'un groupement NH₂) respectivement en acide aspartique et en acide glutamique et détruisant le tryptophane. **Certains acides aminés** sont en quantité infime ou absents, leur proportion a été désignée par la lettre grec ε. **La proportion de thréonine** n'a pu être déterminée pour tous les échantillons, son pic chromatographique étant confondu avec celui du NH₂ libéré par les hydrolyses. Ce manque de valeur est alors représenté par un tiret. **La proportion de lysine** des polypeptides de l'échantillon (**B1 + B2 de EF**) n'a été identifiée que pour l'une des répétitions. La proportion de cet acide aminé en grisé est donc un pourcentage moyen estimé.

Les différentes proportions en acides aminés sont très variables selon les échantillons. Si la composition en acides aminés des cocons renseigne sur la composition globale de tous les polypeptides présents dans un cocon, elle ne reflète absolument pas la composition de chacun des polypeptides du cocon et donc des polypeptides de soie. En effet, chacun des polypeptides isolés possède une proportion en acides aminés spécifique. Ainsi, la sérine et la glycine qui sont les acides aminés les plus représentés sur l'ensemble du cocon avec une quantité de 25 % peuvent représenter de 5,2 à 17,2 % pour la sérine et de 7,9 à 23,6 % pour la glycine, selon le polypeptide considéré.

La composition en acides aminés des polypeptides insolubles dans l'eau (**EI**) ne diffère significativement pas de celle des cocons. En considérant que la composition de la partie insoluble et soluble des cocons reflète celle des cocons entiers, nous pouvons supposer que les polypeptides de l'extrait **EI** sont majoritaires dans le cocon. Cette hypothèse est conforté par le profil protéique d'un extrait à l'eau filtré (**EF**), lequel ne comporte que deux polypeptides B1 et B2 (4 glycopolypeptides natifs isolés correspondant au signal kairomonal) sur la vingtaine estimée pour les cocons entiers (paragraphe **6-1**).

Les différences de proportion entre les polypeptides solubles (**ES**) dans l'eau et les deux polypeptides de l'extrait **EF** doivent provenir de la méthode de préparation de chacun des extraits. En effet, les polypeptides de **EF** ont été extraits par un simple lavage de cocons à l'eau pendant 5 min à la température ambiante alors que les polypeptides de **ES** ont été extraits par un lavage de cocons à l'eau pendant 1 h à 100°C (Lucas *et al.*, 1960). Des polypeptides ou acides aminés supplémentaires ont donc probablement été extraits par la deuxième méthode.

Quatre acides aminés sont majoritaires pour les polypeptides solubles dans l'eau : la glycine, la sérine, l'acide glutamique (Gln + Glu) et l'acide aspartique (Asp + Asn) qui représentent plus de 60 % de la composition globale en acides aminés. Trois acides aminés, la glycine, la sérine et l'alanine, représentent une proportion comparable des polypeptides insolubles.

Chacun des polypeptides isolés possède également des acides aminés majoritaires. En général, plus de 45 % de leur composition globale sont représentés par 3 ou 4 acides aminés, le plus souvent avec un ou plusieurs des acides aminés précédemment cités.

La composition de B1 et B2 est proche pour la plupart des acides aminés. Cette observation peut indiquer la présence de régions en acides aminés communes pour ces deux polypeptides.

D) Discussion

Nos résultats confirment que l'acceptation de l'hôte par *D. pulchellus* dépend principalement d'informations chimiques supportées par le cocon de l'hôte (Thibout, 1988 ; Bekkaoui & Thibout, 1993). Ceci a aussi été décrit dans les relations *Apantheles melanoscelus* / *Lymantria dispar* (Weseloh, 1977).

Environ 27 polypeptides de 20 à 330 kDa ont été mis en évidence dans le cocon d'*A. assectella*. Ceci est comparable à la gamme observée chez d'autres Lépidoptères, notamment chez *B. mori* (Prudhomme *et al.*, 1985). Cependant, le profil polypeptidique des cocons d'*A. assectella* est différent de celui des cocons de *Bombyx mori* et d'*Ephestia kuehniella*, une espèce plus proche phylogénétiquement (**Fig. 26**, les deux extraits de cocons de *Bombyx mori* et d'*Ephestia kuehniella* ont été préparés selon la méthode à la guanidine thiocyanate décrite au paragraphe 5-1 du matériels et méthodes). L'étude conduite sur la composition en acides aminés des différents polypeptides majeurs isolés, permet également de confirmer cette spécificité au niveau acides aminés. Chacun des polypeptides possède une caractéristique propre et peut donc être utilisé comme marqueur chimique au niveau inter- ou intraspécifique.

Quatre des 9 polypeptides majeurs du cocon d'*A. assectella*, les plus hydrophiles en conditions non dénaturantes, ont été purifiés, et la fraction contenant ces 4 composés natifs déclenche le comportement d'acceptation de l'hôte. Ces 4 polypeptides sont glycosylés, comme le sont ceux de la soie de *B. mori* (Sinohara & Asano, 1967 ; Sinohara *et al.*, 1971) et d'autres Lépidoptères (Asano & Sinohara, 1968 ; Sinohara, 1977). Les unités oligosaccharidiques sont des N-acétyl glucosamines liées à l'asparagine. Ce type de liaison a été identifiée dans la fibroïne et les séricines de *B. mori* (Sinohara, 1979 ; Garel *et al.*, 1997). La O-glycosidase utilisée ne révèle aucune O-acétyl galactosamine liée à une sérine ou à une thréonine chez *A. assectella*, mais elles ont été décrites chez *B. mori* (Sinohara, 1979).

Les tailles des 2 bandes (appelées B1 et B2) observées en SDS-PAGE après N-déglycosylation ne correspondent à aucune des tailles des 4 bandes observées sans

déglycosylation. Ces résultats montrent que les **4 glycopolypeptides extraits à l'eau correspondent à des formes glycosylées différentes**. Si les conditions d'électrophorèse sont réalisées sans réduction des ponts disulfures, ces quatre bandes ne sont plus visibles et une bande de faible intensité est observée à un poids moléculaire plus important. Ceci suggère que la kairomone soluble dans l'eau consiste en 2 polypeptides liés entre eux par des ponts disulfures. Le composé actif peut être constitué de l'association des 2 polypeptides, où au moins l'un des polypeptides est actif en comportement. La composition en acides aminés de ces 2 polypeptides natifs (B1 + B2) révèle la forte quantité de cystéine (autour de 3%), qui sont responsables de tels ponts. Cette valeur semble cependant surestimée, puisque sa proportion est tout de même nettement plus faible pour les polypeptides isolés (0,2 % pour B1 et B2). Ces différences pourraient être liées aux deux méthodes différentes utilisées pour purifier les deux polypeptides natifs (filtration) et chacun des deux polypeptides dénaturés (électroélution). Une forte proportion de cystéine ne semble d'ailleurs pas apparaître chez les protéines de soie déjà décrites chez *B. mori* et *Gonometa rufobrunnae* (Fournier, 1979 ; Freddi *et al.*, 1993). Par contre, une protéine de soie chez plusieurs espèces de *Chironomus* (Diptera) est caractérisée par un motif répété riche en cystéine (Case *et al.*, 1997).

Trois à quatre acides aminés représentent plus de 45 % de chacun des polypeptides isolés. Ils correspondent pour au moins deux d'entre eux (glycine et sérine, ou acide glutamique et acide aspartique) aux acides aminés majoritaires des protéines de soie de *B. mori* (Fournier, 1979). La plus grande similarité de la composition en acides aminés des deux polypeptides actifs isolés (B1 et B2) avec la séricine qu'avec celle de la fibroïne de *B. mori*, et la forte solubilité dans l'eau des deux polypeptides natifs actifs suggèrent que ces deux polypeptides pourraient appartenir au groupe des séricines. Malgré l'analogie avec les séricines d'autres Lépidoptères (Fournier, 1979), il existe des différences majeures entre la composition en acides aminés des polypeptides du cocon d'*A. assectella* et celles des protéines de soie d'autres espèces de Lépidoptères étudiées (Komatsu, 1979 ; Žurovec *et al.*, 1992 ; Freddi *et al.*, 1993). Cependant, ces différences ne sont pas plus importantes qu'entre celles de *B. mori* et celles d'autres Lépidoptères.

Si les deux polypeptides du signal kairomonal, présentent des caractéristiques communes avec ceux de la soie d'autres Lépidoptères (solubilité, présence de N-glycosylation, acides aminés majoritaires commun pour l'un des polypeptides), les données recueillies au cours de cette étude ne permettent cependant pas de trancher sur leur appartenance ou non aux protéines de structures de la soie de Lépidoptères. En effet, il pourrait s'agir de polypeptides

liés simplement à la soie et utilisés par le parasitoïde comme kairomone.

Les larves de Lépidoptères produisent un seul type de soie constitué de différentes protéines que l'on classe en deux groupes selon leur solubilité en milieu aqueux. On trouve ainsi des **protéines de soie insolubles dans l'eau**, regroupant la fibroïne et la P25 (qui constituent **la fibre** de la soie), et les **protéines de soie solubles dans l'eau**, les sérícines (qui permettent de **coller les fibroïnes** entre elles) (Prudhomme *et al.*, 1985). Le rôle des deux polypeptides dans la constitution de la fibre elle-même ou dans la liaison de ces fibres n'a pas encore été démontré.

On peut citer quelques exemples de protéines liées à la soie de certaines espèces d'arthropode, mais n'intervenant pas dans la structure du fil de soie :

Jackson (1987), identifie ainsi chez une araignée de la famille des Salticidae, une phéromone polaire intervenant dans le rapprochement des sexes qui est faiblement associée à la soie.

Chez certaines araignées Bolas, des synomones (ici des phéromones de Lépidoptères) sont produites et associées à leur toile. Ces composés semblent émis par des parties du corps de l'araignée autres que les filaires, puisqu'ils sont absents de la toile fraîche (Stowe *et al.*, 1987).

Rostas *et al.* (1998) isolent des kairomones du cocon de *Gilpinia hercyniae* (Diprionidae) qui proviendrait uniquement de la nymphe et diffuseraient sur ce cocon.

Cependant, (à la différence de ces études), les hydrolyses à l'acide périodique 10% et à l'acide chlorydrique 1 M (Bekkaoui & Thibout, 1993) des cocons d'*A. assectella* ne conduisent pas à la complète disparition du déclenchement du comportement d'acceptation. De plus, des cocons n'ayant jamais été en contact de la chrysalide, possèdent la même activité comportementale. Enfin, ces deux polypeptides sont présents dans les glandes sérícigènes des larves d'*A. assectella* (**Fig. 27**). Ces résultats semblent donc aller en faveur de protéines de structure de la soie.

Les séquences en acides aminés des produits des gènes de sérícines et de fibroïne de *B. mori*, *Galleria mellonella* et *Antheraea yamamai* (Tamura *et al.*, 1987 ; Žurovec *et al.*, 1992) sont divergents à 55-60%. Ces différences entre les sérícines et les fibroïnes d'autres espèces de Lépidoptères suggèrent que plusieurs « épitopes » dans les protéines de la soie pourraient agir comme signal de reconnaissance spécifique. *D. pulchellus* est une espèce parasitoïde étroitement associée à la teigne *A. assectella* (Thibout, 1988), par conséquent les séquences en acides aminés des polypeptides B1 et B2 du cocon d'*A. assectella* doivent être spécifiques. Cette hypothèse semble confortée par l'analyse des différents polypeptides.

Les résultats obtenus sur les polypeptides du cocon d'*A. assectella* après N-

déglycosylation, traitement à l'acide périodique 10% ou à la pronase, suggèrent que les chaînes d'hydrates de carbone des glycopolypeptides actifs du cocon ne sont pas responsables de l'activité d'acceptation de l'hôte par le parasitoïde *D. pulchellus*. L'activité apparaît uniquement dépendre de la molécule polypeptidique. Une étude comparable a déjà été menée chez d'autres invertébrés éloignés des insectes. Ainsi, Snell *et al.* (1995) ont mis en évidence que la phéromone sexuelle de certains rotifères est un glycopolypeptide dont l'activité biologique est dépendante de la chaîne d'hydrates de carbone.

Avec les travaux de Strand et Vinson (1982, 1983b), c'est l'une des première fois que des polypeptides ont été clairement identifiés pour agir comme signal d'acceptation dans des relations hôtes-parasitoïdes. Ce signal est reconnu par des chimiorécepteurs de contact, peut-être au niveau antennaire, comme le suggère le comportement des parasitoïdes. La perception de polypeptides par des récepteurs gustatifs sera étudié au chapitre IV. Il pourrait y avoir une analogie entre les récepteurs gustatifs des mammifères et ceux des insectes. On connaît par exemple, des polypeptides qui ont une "saveur" prononcée (Nogushi *et al.*, 1975 ; Yamasaki & Maekawa, 1980). Dans la perception gustative, l'environnement le plus ordinaire dans lequel des composés chimiques sont actifs est le milieu aqueux. Les quatre glycopolypeptides natifs actifs sur le comportement de *D. pulchellus* sont les plus hydrosolubles des polypeptides du cocon d'*A. assectella*.

Ce chapitre a donné lieu à deux articles : Bénédet et al. 1999, sous presse.

**III Recherche des gènes
codant pour les deux
polypeptides intervenant
comme signal kairomonal**

A) Introduction

Depuis les années soixantes, les protéines de soie d'arthropodes ont fait l'objet de nombreuses études (Kaplan *et al.*, 1993), tant au niveau composition globale en acides aminés (Lucas *et al.*, 1960 ; Lucas & Rudall, 1968 ; Kovoov, 1977 ; Fournier, 1979 ; Hinman *et al.*, 1992), qu'au niveau structural (Rudall & Kenchington, 1971 ; Gosline *et al.*, 1986 ; Spek *et al.*, 1997 ; revue de Craig, 1997).

Cependant, le niveau moléculaire et le séquençage de certains des gènes codant pour les protéines de soie d'arthropodes, en particulier d'insectes, n'a été réalisé que depuis peu et essentiellement chez *Bombyx mori*, espèce domestiquée (Tsujimoto & Suzuki, 1979 ; Okamoto *et al.*, 1982 ; Chevillar *et al.*, 1986 ; Garel *et al.*, 1997).

On peut cependant citer les études menées chez deux genres d'araignées, *Nephila* et *Araneus* (Argiopidae), qui ont permis le séquençage partiel des gènes codant pour deux protéines de soie (Spidroïne 1 et 2) proches des fibroïnes d'insecte de part la prédominance en trois acides aminés (sérine, glycine et alanine) (Xu & Lewis, 1990 ; Hinman *et al.*, 1992 ; Guerette *et al.*, 1996 ; Beckwitt *et al.*, 1998). Pourtant, ces études ne sont que partielles, compte tenu de la diversité beaucoup plus importante des types de protéines de soie des araignées. En effet, contrairement aux insectes dont chaque espèce ne produit qu'un seul type de soie (constitué de différentes protéines), certaines araignées, comme *Nephila clavipes*, possèdent jusqu'à 6 types de glandes à soie différentes, produisant chacune un type de soie (Kooverr, 1987 dans Hinman & Lewis, 1992).

Chez le genre *Chironomus* (Diptère), un fragment du gène codant pour 1 protéine de soie (sp185, ou sp220 selon l'espèce), qui appartient à l'une des 3 familles de protéines connues pour ce genre, a été partiellement séquencé (Martin *et al.*, 1996). Le rôle exact de cette protéine dans la structure de la soie n'a pas été défini, néanmoins elle est caractérisée par un motif (cyst-X-cys-X-cys) répété tous les 20 à 28 acides aminés.

Les autres exemples existants concernent surtout deux Lépidoptères, *Galleria mellonella* (Žurovec *et al.*, 1995, 1998a, 1998b ; Yang *et al.*, 1998) et l'espèce domestique, *Bombyx mori* (Suzuki & Brown, 1972 ; Couble *et al.*, 1983 ; Michaille *et al.*, 1986 ; Couble *et al.*, 1987). Les gènes ou fragments de gènes séquencés jusqu'alors chez *B. mori* et *G. mellonella* codent pour les différents types protéiques impliqués dans la **structure** de la soie du cocon. Il s'agit principalement des gènes codant pour les **protéines de soie insolubles dans l'eau** telles que la fibroïne et la P25 (qui constituent la fibre de la soie), mais aussi de ceux

codant pour les **protéines de soie solubles dans l'eau**, les sérícines (qui permettent de “coller” les fibroïnes entre elles) (Prudhomme *et al.*, 1985).

Le but essentiel des études moléculaires réalisées sur les protéines de soie a surtout été de comprendre les mécanismes d'**expression de ces gènes**. En effet, la glande à soie est un organe sous contrôle hormonal strictement limité à la production d'un ensemble de protéines qui constituent le fil de soie. Cette glande sérícigène est donc un excellent modèle pour étudier en particulier les mécanismes de la spécificité tissulaire, temporelle (à cause de l'existence de périodes sécrétrices) ou hormonale de l'expression de certains types de gènes (Tsujimoto & Suzuki, 1979 ; Garel, 1983 ; Mita *et al.*, 1988 ; Hui *et al.*, 1990 ; Drevet & Couble, 1991).

Les études les plus complètes ont été réalisées chez *B. mori*. Deux gènes, Ser 1 et Ser 2, codent pour la majorité des protéines de type sérícine. Ils sont transcrits uniquement au dernier stade larvaire, dans la partie médiane de la glande sérícigène (Michaille *et al.*, 1986, Garel *et al.*, 1997). L'expression de Ser 1 et Ser 2 est régulée par l'hormone juvénile et les ecdystéroïdes (Drevet & Couble, 1991). Le gène Ser 1 est transcrit sous forme de 4 ARNm de taille différente, le gène Ser 2 sous forme de 2 ARNm. Un épissage différentiel permet la synthèse de ces ARNs à partir du même gène. Les différents ARNm sont transcrits dans des parties distinctes de la partie médiane de la glande sérícigène (Couble *et al.*, 1987). Chacun de ces ARNm est traduit en une protéine spécifique, expliquant la détection des différentes protéines dans la partie médiane de la glande à soie.

Les études moléculaires sur les protéines de soie de Lépidoptères ont permis en outre une étude d'**ordre phylogénétique** (Kusuda *et al.*, 1986 ; Žurovec *et al.*, 1992).

Chez *G. mellonella* et *B. mori*, un gène code pour la chaîne lourde de la fibroïne et un gène pour la chaîne légère associée à la fibroïne, la P25. Les gènes de la chaîne légère de *G. mellonella* et *B. mori* présentent 50% d'homologie entre eux, au niveau nucléotidique, révélant une certaine parenté phylogénétique entre ces 2 gènes (Žurovec *et al.*, 1992). Les gènes codant pour la chaîne lourde ne présentent pas d'homologie entre eux, seule la composition en acides aminés est conservée.

Deux gènes s'exprimant dans la partie médiane de la glande sérícigène de *G. mellonella* ont été clonés (MG1 et MG2). Par analogie aux gènes de sérícine, s'exprimant dans cette région chez *B. mori*, les gènes (MG1 et MG2) ont été supposés codant pour des sérícines. Les gènes Ser1, MG1 et MG2 présentent peu d'homologie entre eux, excepté une région de 114 pb, répétée environ 10 fois dans chacun de ces gènes. Au sein des 114 pb, un motif codant pour un peptide Ser-Ser-Gly-Ser-Ser est retrouvé dans chacun de ces gènes. Ce motif protéique pourrait avoir un rôle primordial dans la structure des sérícines (Žurovec *et al.*, 1992).

L'isolement des gènes codant pour les 2 polypeptides du cocon d'*A. assectella* est important pour comprendre les mécanismes d'identification chimique de l'hôte par son parasitoïde, *D. pulchellus*. En Outre, les séquences des gènes ou la composition des protéines de soie déjà décrites dans la littérature sont autant de données précieuses pouvant nous aider à préciser, entre autre, la ou les fonctions premières de ces 2 polypeptides-sigaux et à appréhender éventuellement la diversité des gènes de soie au fil de l'évolution.

Notre étude s'est donc focalisée sur la recherche des gènes codant pour chacun des deux **polypeptides** B1 et B2 (correspondant aux 4 glycopolypeptides) ayant une activité kairomonale pour au moins l'un d'entre eux (**Chapitre II**).

Les résultats de solubilité différentielle de protéines de soie décrits chez *B. mori* et *G. mellonella* ont été pris comme référence pour classer les deux polypeptides B1 et B2 du cocon d'*A. assectella*, parmi les **séricines**. Cette hypothèse permet de justifier le choix de l'une de nos deux voies de recherche, à savoir l'utilisation du gène *Ser 1* de *B. mori* (codant pour la plupart des séricines du cocon de *B. mori* (Garel *et al.*, 1997)) ou de motifs répétés conservés des séricines connues de Lépidoptères.

L'obtention des gènes permettrait de confirmer les résultats obtenus au chapitre II selon lesquels l'un des polypeptides au moins sert de kairomone. Une étude comparative avec les protéines de structure de la soie déjà connues pourrait alors être réalisée.

La recherche des gènes a été effectuée selon deux voies différentes :

II La première a consisté en l'exploitation des connaissances acquises chez d'autres Lépidoptères, c'est à dire en utilisant soit une sonde du gène de séricine 1 de *B. mori*, soit des sondes oligonucléotidiques de motifs répétés obtenus après comparaison des séquences de séricines disponibles dans les banques de données (w.w.w.lovelace.infobiogen.fr).

♦ La deuxième a consisté en l'utilisation de microséquences en acides aminés obtenues de la partie NH₂-terminale des 2 polypeptides purifiés. Les microséquences ont été ensuite utilisées pour fabriquer des amorces oligonucléotidiques dégénérées servant (méthodologie **Fig. 28**) :

- d'une part à **cribler** des banques d'ADN complémentaires (ADNc) synthétisés à partir des ARN messagers (ARNm) d'*A. assectella*,

- d'autre part à **amplifier** par PCR (Polymerase Chain Reaction), les fragments d'ADN correspondant aux gènes codant pour ces deux polypeptides.

Les différentes méthodes utilisées et les résultats obtenus seront donnés au fur et à mesure des expériences.

B) Homologie avec des séquences connues de séricine

1 - Hybridation avec une sonde du gène *Ser 1* de *B. mori*

1-1 Hybridation sur ADN génomique

L'ADN génomique d'*A. assectella* a été isolé à partir d'adultes et selon la procédure décrite **annexe II**. Dix µg d'ADN génomique ont été digérés par trois endonucléases de restriction, soit EcoR1, soit BamH1 et soit Pst1 (3U d'enzyme / µg d'ADN), pendant 1 h à 37°C. L'ADN digéré a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (**Annexe III**) et en tampon TAE 1X (Tris acétate 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5) pendant 1 h à 90 V. Le gel a ensuite été transféré pendant 4 h sur une membrane de nylon (BiotransTM Nylon Membranes, ICN ; **Annexe IV**). Cinquante ng du gène *Ser 1* de *B. mori* fourni gracieusement par A. Garel (Lyon) ont été marqués avec du [α P³²dATP] (ICN) en utilisant 5 Unités (U) du fragment Klenow (Boehringer Mannheim), à 37 °C, pendant 2 h. Cette membrane de nylon appelée "southern blot" a été hybridée à 65°C avec la **sonde du gène *Ser 1*** de *B. mori* selon la procédure standard (détails **annexes V et VI**) :

- préhybridation à 65°C dans une solution de NaP 0,5 M, pH 7, SDS 7%, EDTA 1mM (Tampon Church), pendant 1 h.

- hybridation pendant une nuit avec la sonde, préalablement dénaturée à 100°C, dans 10 ml du même tampon Church à 65°C,

- lavages pendant 20 min à 65°C dans des solutions SSC (20XSSC : 3 M NaCl, 0,3 M citrate Na₃, pH 7,0), 0,1 % SDS, jusqu'à une concentration finale de 4XSSC, 0.1 % SDS (soit 40 % d'homologie)

Le **résultat** de l'hybridation est présenté **figure 29a**. Quelle que soit la digestion, une trainée ("smear") est observée. Ce résultat montre que la sonde s'est hybridée au hasard, sans spécificité, sur l'ADN génomique. Dans le cas d'une hybridation spécifique, une bande de taille précise était attendue.

1-2 Hybridation sur ARN

Trois méthodes de purification des ARNs totaux des larves et des chrysalides d'*A. assectella* ont été utilisées. Les ARNs totaux des larves L4 et L5 ou des chrysalides (500 à 1000 individus = 1 à 2 g) ont été extraits en utilisant trois techniques différentes (détails en **annexe VII**) :

- la méthode au Nonidet P40 / Urée 7 M,
- la méthode utilisant une solution de guanidine thiocyanate légèrement modifiée,
- le kit Quiagen (Rneasy Midi Kit).

Les ARNs totaux obtenus à partir de la méthode au Nonidet P40 / Urée 7 M et du kit Quiagen ont été utilisés pour les Northern blots et les PCR.

Le résultat de l'extraction d'ARNs totaux est présenté **figure 30**. Deux bandes indiquées correspondent aux ARNs ribosomiques 16S et 28S.

Quinze μg d'ARNs totaux sont séparés sur gel d'agarose 1% contenant du formaldéhyde et en tampon MOPS 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Les ARNs ont ensuite été transférés pendant 12 h sur une membrane de nitrocellulose HybondTM-C extra (Amersham, **Annexe IV**). Cette membrane de nitrocellulose a été hybridée à 65°C avec la sonde du gène séricine 1 de *B. mori* selon la même procédure que celle utilisée pour le southern. Les membranes hybridées ont été autoradiographiées sur films FUJI RX à - 80°C.

Le **résultat** de l'hybridation est présenté **figure 29b**. On observe une bande qui correspond à l'ARN 28S et un "smear". Aucune bande de taille attendue n'est observée, indiquant que la sonde Ser1 de *B. mori* ne présente pas d'homologie avec les ARNs d'*A. assectella*.

↪ Ces résultats nous permettent de supposer que le gène *Ser 1* de *B. mori* a peu ou pas de régions codantes homologues avec celles du ou des gènes codant pour les sérícines d'*A. assectella*. Cette première approche nous permet de confirmer la **spécificité des protéines de structure de la soie telles que les sérícines trouvées chez des espèces phylogénétiquement éloignées**. En effet, *B. mori* appartient à la super-famille des Bombycoïdea et *A. assectella* à la super-famille des Yponomeutoïdea. Cette faible homologie de séquences existe déjà entre les motifs de la sérícine de *B. mori* et ceux de la sérícine de *Galleria mellonella* (A. Garel, communication personnelle). Ce résultat conforte donc l'hypothèse donnée au chapitre II selon laquelle **chacun des polypeptides du cocon d'*A. assectella* posséderait une spécificité propre à l'espèce**.

2 - Hybridation avec une sonde déduite d'une région conservée dans les séricines de *B. mori* et *G. mellonella*

Le gène de séricine 1 code pour des protéines intervenant dans la structure même du fil de soie. Certains motifs du gène peuvent être relativement conservés et donc être présents dans les gènes de séricines d'autres espèces. Ainsi, la spécificité observée sur un gène complet n'interdit pas l'existence de motifs communs à plusieurs espèces.

2-1 Procédure

Cette hypothèse nous a conduit à rechercher des homologies de séquences conservées en acides aminés, déduites de la comparaison entre les gènes de séricine de *B. mori* et *G. mellonella* et disponibles dans les banques de données (**Fig. 31**).

Des motifs répétés conservés de 6 acides aminés ont ainsi pu être déterminés. Il s'agit des motifs **STGSSS**, **SGGSSS** ou **SSGSSS** (S = sérine, T = thréonine, G = glycine). La séquence des motifs répétés a été utilisée pour 4 oligonucléotides dégénérés. Les oligonucléotides inverses complémentaires (SERIC1R, SERIC2R, SERIC3R et SERIC4R) ont été synthétisés afin de pouvoir les hybrider sur les ARNs. Ceux-ci sont répertoriés dans le **tableau 15**.

Chacun des 4 oligonucléotides a été utilisé pour hybrider une membrane de nitrocellulose sur laquelle des ARNs totaux de larves et de chrysalides d'*A. assectella* ont été précédemment transférés. Cinquante pmoles de chacun des oligonucléotides sont marqués en position terminale avec du [γ P³²dATP] (ICN) en utilisant 10 U de T4 polynucléotide kinase (Promega). Chacun des oligonucléotides a été utilisé indépendamment (la membrane étant déshybridée avant de la réhybrider avec un autre oligonucléotide) comme sonde d'hybridation selon la procédure standard (**Annexe V et VI**) :

- préhybridation pendant 30 min à 65°C dans une solution de NaP 0,5 M, pH 7, SDS 7%, EDTA 1mM (Tampon Church),
- hybridation pendant une nuit avec un des oligonucléotides marqués radioactivement dans 10 ml du même tampon Church au Tm – 4°C de l'oligonucléotide utilisé,
- lavages pendant 20 min au Tm – 4°C de l'oligonucléotide utilisé, dans des solutions de 6XSSC puis 5XSSC, 0,1 % SDS.

La membrane hybridée a été autoradiographiée sur films FUJI RX à – 80°C.

2-1 Résultats - Interprétation

Le résultat présenté **figure 32** est celui obtenu après hybridation entre l'oligonucléotide SERICI3R et la membrane de nitrocellulose sur laquelle les ARNs totaux de larves L4 et L5 (ligne 1) ou de chrysalides (ligne 2) ont été transférés. Dans l'échantillon d'ARNs totaux de larves, 4 bandes sont visibles. Celle de taille supérieure pourrait correspondre à une hybridation de l'oligonucléotide avec l'ARN 28S, déduit **d'après la taille de la bande**. Cette bande apparaît également après l'hybridation sur les ARNs de chrysalides. La présence des trois autres bandes uniquement avec les ARNs de larves (ligne 1, flèches), nous indique l'existence parmi ces ARN totaux de séquences plus ou moins complémentaires à l'oligonucléotide SERICI3R. Ce résultat est en accord avec ce qui est attendu car les séricines ne sont synthétisées qu'au stade larvaire.

L'oligonucléotide SERICI1R conduit à un résultat similaire avec une hybridation beaucoup moins forte, les oligonucléotides SERICI(2R et 4R) ne révèlent aucune bande (résultats non présentés).

Ainsi, certaines des séquences répétées conservées du gène de séricine de *B. mori* et de *G. mellonella* semblent également exister chez *A. assectella*.

L'oligonucléotide SERICI3R a donc été utilisé comme sonde pour cribler la banque d'ADNc construite à partir d'amorces oligo(dT) (Banque polyA).

Aucun clone présentant des homologies avec l'oligonucléotide SERICI3R n'a pu être isolé jusqu'à présent.

C) *Microséquençage des polypeptides du signal kairomonal*

Afin d'utiliser des oligonucléotides spécifiques des polypeptides B1 et B2, le microséquençage de chacun des polypeptides a été entrepris. Plusieurs méthodes préparatives différentes ont été conduites afin d'obtenir les **séquences NH₂ terminales et internes** de chacun des **2 polypeptides du signal kairomonal (Chapitre II)**. A partir des séquences en acides aminés des extrémités NH₂ terminales, les séquences nucléotidiques correspondantes ont été déduites. Ces oligonucléotides spécifiques ont ensuite été utilisés, soit comme sondes d'hybridation, soit comme amorces complémentaires pour les expériences de PCR afin de cloner les gènes codant pour ces 2 polypeptides.

1 - Microséquençage en acides aminés de la partie NH₂ terminale des deux polypeptides B1 et B2

1-1 Purification des polypeptides

a) Procédure

Pour obtenir les 2 polypeptides du signal kairomonal, un extrait de cocons à l'eau a été préparé, selon la même procédure qu'au chapitre II : 1000 cocons de la souche élevée sur milieu artificiel avec poudre de poireaux ont été lavés dans 10 ml d'eau ultrapure désionisée ; ceci pendant 5 min à température ambiante et avec une faible agitation.

Les fibres de cocons pouvant rester, les débris ou les particules de l'extrait résultant ont été éliminés par filtration sur fibres de verre en seringue de 50 ml puis sur filtre Millipore (0,45 µm de porosité Millipore, Millex). L'extrait obtenu a été aliquoté puis concentré par lyophilisation. Chaque extrait est ensuite repris dans de l'eau ultrapure avant chaque utilisation.

Les deux polypeptides de l'extrait résultant ont été séparés sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide en sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE), sous conditions dénaturantes et selon la procédure utilisée au chapitre précédent (**Paragraphe B 7**). Les mêmes volumes d'échantillon contenant la même quantité de polypeptides totaux (10 à 15 µg) ont été déposés sur gel (16 × 14 cm, épaisseur 1mm) contenant 7% de polyacrylamide. Un marqueur de taille précoloré a été utilisé (200-8,3 kDa, Bio-Rad).

Après migration, de façon à pouvoir éluer chacune des bandes du gel, donc isoler et purifier les polypeptides, **deux procédures** ont été suivies :

- ❶ Electrotransfert des polypeptides du gel entier sur une membrane PVDF,
- ❷ Electroélution des polypeptides en solution puis fractionnement en CLHP.

Compte tenu des résultats obtenus au chapitre II, nous avons considéré que les 2 polypeptides de haut poids moléculaire (90 et 86 kDa) correspondaient à un seul et même polypeptide (bande **B1**), et qu'il en était de même pour les 2 autres polypeptides de plus bas poids moléculaire (78 et 70kDa, bande **B2**).

❶ Isolement des bandes B1 et B2 après transfert sur membrane

Les polypeptides ont été transférés par électrophorèse sur une membrane PVDF

(polyvinylidene difluoride membrane, Biotrans™, ICN) en conditions semi-sèches (SemiPhor™ Semi-Dry transfer Units, Hoefer®TE 70 Series). La solution de transfert utilisée est un tampon Tris-HCl 48 mM (w/v) pH 9, glycine 39 mM (w/v), SDS 1,3 mM (w/v) et 20 % de méthanol (v/v). Le transfert est réalisé à température ambiante pendant 2 h à 160 mA. La membrane subit ensuite le traitement suivant :

- rinçage abondant à l'eau ultrapure,
- coloration dans une solution de 50% (v/v) méthanol contenant 0,1% (w/v) de bleu de Coomassie® R250, pendant 5 min,
- décoloration dans une solution de méthanol 50 % (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v) jusqu'à apparition des bandes (**B1** et **B2**) correspondant aux deux polypeptides.

Chaque bande de membrane sur laquelle se trouve l'un des polypeptides est ensuite découpée.

② Isolement des bandes B1 et B2 par électroélution

Cette procédure permet l'obtention de plus de matériel purifié. Elle est également utilisée pour faciliter l'extraction de protéines digérées sans perte de matériel à partir de gels de polyacrylamide (Rosenfeld *et al.*, 1992).

Après migration, les gels subissent les traitements suivants :

- fixation et coloration dans une solution contenant 20 % (v/v) de méthanol, 1% (v/v) d'acide acétique et 0.1% (w/v) de bleu de Coomassie® G250 et R250, pendant 5 à 7 min.
- décoloration des gels dans une solution de méthanol 30 % (v/v), jusqu'à apparition des bandes protéiques **B1** et **B2**.

Chaque bande est découpée à partir du gel de polyacrylamide, puis isolée dans un tube Eppendorf.

L'**électroélution** des bandes **B1** et **B2** a été réalisée (selon la méthode décrite au chapitre II [**paragraphe B** 8-2]), dans une solution tampon, Tris-HCl (10 mM pH 9) / SDS à 0,5 % pendant 1 h 30 à 100 volts, répétée une fois après avoir changé la solution tampon. Les polypeptides migrent ainsi du gel vers le tampon d'élution. Pour éliminer le SDS et le Tris, les tampons d'élution contenant chaque polypeptide ont été dialysés contre 3 × 5 litres d'eau, pendant 24 h. Des membranes de porosité 12 à 14 kDa ont été utilisées pour la dialyse. Des morceaux de gel ne contenant pas de polypeptides ont subi la même procédure d'électroélution

pour servir de témoin.

Le bleu de Coomassie® n'étant pas éliminé par cette technique, les polypeptides ont été ensuite purifiés par chromatographie.

Le **système CLHP** non thermostaté utilisé est constitué d'une pompe (Spectra Physics) et d'un détecteur UV à barrette de diodes (Spectra Physics - UV 3000 System). Les colonnes cartouches utilisées sont de deux types : une **C18** ou une **C8** PE Brownlee 5 µm (2,1 mm de Ø × 30 mm de long, Touzart & Matignon). La séparation est faite en gradient d'éluion à partir de deux solvants : **A**, Eau ultrapure-acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) et **B**, Eau-acétonitrile-TFA (29,9%, 70%, 0,1%). Chaque solvant a été préalablement dégazé et reste sous un flux constant d'hélium. Les gradients d'éluions ont été, selon les besoins de la séparation, élaborés sur une période de 45 min ou de 65 min (**Tableau 16**).

La détection en UV est effectuée à 220 nm, longueur d'onde d'absorbance spécifique des protéines. Le débit de la phase mobile est de 0,2 ml/min.

Le témoin et les échantillons polypeptidiques obtenus après électroélution ont été injectés à raison d'un volume de 20 µl. L'enregistrement chromatographique a été suivi sur ordinateur et à chaque pic observé la fraction correspondante a été récupérée. Les fractions contenant les protéines ont été concentrées en utilisant un système d'évaporation Speedvac jusqu'à obtention d'un volume d'environ 50 µl.

b) Résultats

Les chromatogrammes présentés correspondent à ceux obtenus après injection d'un échantillon témoin (**T**, sans polypeptide) (**Fig. 33**) ou d'un échantillon contenant soit **B1** (**Fig. 34a**), soit **B2** (**Fig. 34b**). Les spectres d'absorbance entre 200 et 400 nm de chacun des pics correspondant à B1 ou B2 sont représentés en haut à gauche des chromatogrammes.

La comparaison des trois profils chromatographiques permet de sélectionner les pics, donc les fractions correspondant à **B1** ou **B2** indiquées sur chacun des chromatogrammes (**Fig. 34**). Les spectres d'absorbance entre 200 et 400 nm représentés pour chacun des deux pics correspondant à B1 et B2 sont caractéristiques de protéines et confirment leur attribution. Chacune des fractions est conservée pour effectuer un microséquençage de la partie NH₂ terminale du polypeptide (**paragraphe suivant**).

Le polypeptide **B2** est constitué de deux pics très proches. Il s'agit en fait des deux formes glycosylées du polypeptide **B2** (une séparation électrophorétique suivie d'une coloration à l'argent de chacun de ces deux pics a confirmé cette hypothèse, résultat non

présenté).

La nature des bandes séparées a été contrôlée par électrophorèse SDS-PAGE suivie d'une coloration à l'argent (résultat non présenté).

1-2 Séquence des polypeptides

Le séquençage en acides aminés de la partie NH₂ terminale des polypeptides a été réalisé par la méthode de chimie récurrente d'Edman (Weil, 1987). Les microséquençages ont été effectués sur un séquenceur automatique (Protein-Peptide Sequencing System model 477A). Le procédé consiste en une répétition de cycles constitués d'une succession de réactions chimiques d'Edman suivie d'une chromatographie (**Annexe VIII**). A chaque cycle, un profil d'acides aminés est obtenu. L'abondance relative des pics et la comparaison entre les profils de chaque cycle permet d'obtenir un microséquençage.

a) A partir des polypeptides B1 et B2 transférés sur membrane PVDF

Les bandes de membrane PVDF sur lesquelles ont été fixées chacun des polypeptides sont directement introduites dans le séquenceur.

Les résultats du séquençage de la partie NH₂ terminale des polypeptides **B1** et **B2** sont respectivement présentés **figures 35a** et **35c**. Ce séquençage a permis d'obtenir les 12 premiers acides aminés NH₂ terminaux de chacun des deux polypeptides avec toutefois des incertitudes sur l'attribution de certains acides aminés. Par exemple, le troisième acide aminé de **B1** est soit une cystéine, soit un tryptophane ou une asparagine. L'acide aminé le plus probable à chaque position est représenté en grisé.

b) A partir des bandes B1 et B2 électroéluées

La fraction de CLHP contenant le polypeptide **B1** a été utilisée pour tenter de confirmer les résultats précédents. Cette fraction a été déposée sur un filtre puis séchée avant d'être introduite dans le séquenceur.

Le résultat du séquençage de la partie NH₂ terminale pour le polypeptide **B1** est présenté **figure 35b**. Ce séquençage a permis d'obtenir 12 acides aminés NH₂ terminaux du polypeptide **B1**. Cependant, l'attribution donnée à quasiment tous les acides aminés est incertaine. Ce résultat pourrait être dû au fait que l'extrait traité était contaminé par un autre polypeptide ou des acides aminés libres.

Le recoupement entre les différents résultats obtenus a cependant permis de confirmer certaines des attributions en acides aminés du premier séquençage obtenu à partir des

membranes : il s'agit du groupe d'acides aminés Arg-Lys-Val-Leu-Pro-Pro (**Fig. 35a** et **35c**).

Compte tenu de la contamination de la fraction B1, il était probable que la fraction CLHP contenant le polypeptide B2, purifié selon la même procédure que B1, soit également contaminée. Par conséquent, cette fraction n'a pas été séquencée.

Des homologues avec les séquences obtenues pour B1 et B2 ont été recherchées dans les banques protéiques en utilisant le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Sequences Tool) (w.w.w.lovelace.infobiogen.fr). Aucune séquence présente dans les banques ne possède d'homologie avec ces séquences.

2 - Microséquençage en acides aminés d'un fragment peptidique interne aux polypeptides

2-1 Préparation des polypeptides et trypsinolyse

Les deux polypeptides de l'extrait à l'eau ont été séparés sur gel d'électrophorèse (SDS-PAGE), sous conditions dénaturantes selon la procédure précédemment décrite (**Paragraphe D**) 1-1a).

Pour réaliser un microséquençage interne des polypeptides, il est nécessaire de les couper en petits fragments. Pour cela, un traitement enzymatique à la trypsine a été réalisé. Cette endopeptidase hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau des lysines et des arginines, sauf si l'acide aminé qui suit est une proline. La trypsinolyse a été conduite selon 2 procédures :

❶ Par une digestion enzymatique des polypeptides directement dans le gel puis une élution par des solvants,

❷ Ou par une digestion enzymatique des polypeptides en solution après électroélution de chacun d'entre eux.

Procédure ❶ : Chacune des bandes de polyacrylamide contenant l'un des polypeptides a été partiellement déshydratée puis mise à incuber pendant 12 h à 37°C dans un tampon (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, CaCl₂ 1mM) dans lequel est ajoutée de la trypsine [25 µg/ml, réf. V511A, trypsine modifiée par le fabricant (Promega) pour diminuer l'autolyse de l'enzyme]. L'activité lytique de la trypsine est stoppée en ajoutant 0,05% de TFA.

Après trypsinolyse, le tampon de digestion est prélevé. Deux extractions successives en acétonitrile 60 % ont été réalisées sur les bandes de polyacrylamide contenant les fragments de

polypeptides trypsinolysés (détails **annexe IX**). Les différents éluats ont été ensuite rassemblés, puis injectés en CLHP pour purifiés les différents fragments, selon la méthode décrite au **paragraphe 1-1 a)②**.

Des morceaux de gel sans polypeptide ont subi le même traitement. Le surnageant résultant a été utilisé comme témoin.

Procédure ② : Des échantillons de **B1** ou **B2** obtenus après électroélution [méthode décrite au **paragraphe 1-1 a)②**] ont été incubés dans le tampon précédent (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, CaCl₂ 1 mM) à raison de 0,01 µg de trypsine par microgramme de polypeptide estimé (10 à 15 µg). Le résultat de la digestion partielle de chacun des polypeptides a été contrôlé sur gel d'électrophorèse. Les peptides libérés après digestion à la trypsine ont été purifiés par CLHP.

2-2 Purification des peptides par CLPH

La procédure et les conditions de séparation CLHP sont celles décrites au **paragraphe 1-1 a)②**.

Les chromatogrammes présentés correspondent à ceux obtenus après injections de :

- deux échantillons témoins : un échantillon sans polypeptide (**Fig. 36a**) et un échantillon contenant 100 µg de trypsine (**Fig. 36b**),
- deux échantillons résultant de la trypsinolyse sur gel ① (**B1 Fig. 37a** ou **B2 Fig. 37b**),
- deux échantillons résultant de la trypsinolyse sur extrait ② (**B1 Fig. 38a** ou **B2 Fig. 38b**),

Les spectres d'absorbance entre 200 et 400 nm de chacun des pics correspondant à des peptides de B1 ou B2 sont représentés en haut à gauche des chromatogrammes.

Les échantillons témoins nous indiquent que le pic de la trypsine (**Fig. 36b**) possède un temps de rétention similaire (approximativement 45 minutes) à celui de l'un des pics contaminants (**Fig. 36a**) correspondant aux traces de bleu de coomassie®. Par ailleurs, la trypsine injectée en grande quantité (100 µg) ne donne qu'un pic de faible absorbance (environ 120 mAU). La quantité d'enzyme utilisée pour les hydrolyses (0,01 µg/µg de polypeptide) reste trop faible pour être contaminante.

Les chromatogrammes relatifs aux polypeptides **B1** et **B2** après trypsinolyse sur gel

(**Fig. 37**) ne laissent apparaître qu'un seul pic supplémentaire (**pic 1**). L'hydrolyse de **B1** donne un pic supplémentaire à 37 min et celle de **B2** un pic supplémentaire à 39 min. Les spectres d'absorbance entre 200 et 400 nm, représentés pour chacun des deux pics sont caractéristiques de protéines. Néanmoins, seule la fraction du pic correspondant à l'hydrolyse de **B1** est en quantité suffisante pour un séquençage (amplitude \cong 200 mV).

La comparaison de ces deux chromatogrammes avec ceux obtenus après injection des polypeptides **B1** et **B2** purifiés (**paragraphe 1-1b, Fig. 34**) indique que ceux-ci ne sont plus présents dans leur "intégrité" dans l'échantillon. La trypsinolyse aurait donc bien été effective. L'absence d'autres peptides sur les chromatogrammes pourrait être due au manque d'efficacité de l'éluion par solvant ou à la trop faible quantité des autres peptides.

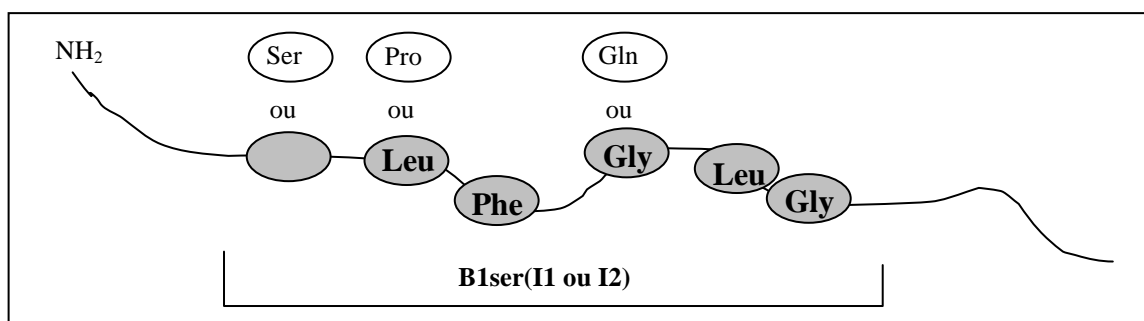
Les chromatogrammes relatifs aux polypeptides **B1** et **B2** après trypsinolyse sur extraits élués (**Fig. 38**) montrent des pics très peu séparés. On observe de larges pics (**pic 3 et 4 Fig. 38a** et **pic 1 Fig. 38b**) aux temps de rétention attendus lorsque les 2 polypeptides ne sont pas hydrolysés (après 32 min). Tout se passe comme si les produits d'hydrolyse n'étaient pas séparés. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de cystéines (résultats chapitre II), qui en s'associant en ponts disulfures empêcheraient la séparation des peptides hydrolysés.

Après l'hydrolyse de **B1**, 2 pics supplémentaires (**pic 1 et 2, Fig. 38a** ; temps de rétention de 26 et 27 min) correspondant à des peptides, si l'on se réfère aux spectres d'absorbance entre 200 et 400 nm, ont été obtenus. Chacun d'eux a été purifié par réinjection des fractions correspondantes en CLHP puis séquéncé.

2-3 Séquence

La procédure suivie est celle décrite au **paragraphe 1-2**.

Seule la fraction de CLHP contenant les peptides issus de la trypsinolyse de **B1** en gel (**pic 1, Fig. 37a**) a permis d'obtenir la séquence suivante (en grisé figurent les acides aminés utilisés pour obtenir les séquences oligonucléotidiques) :



Ce séquençage a permis d'obtenir les 6 premiers acides aminés NH₂ terminaux du

peptide issu de la trypsinolyse de **B1**. Des incertitudes quant à l'attribution de certains acides aminés existent. Il est possible que l'échantillon ait été contaminé par d'autres peptides, rendant impossible la distinction entre les deux séquences.

Des homologues avec la séquence interne ont été recherchés dans les banques protéiques (Blast, lovelace.infobiogen.fr). Aucune séquence ne présente d'homologie avec la séquence interne.

Les séquences obtenues à partir des fractions contenant les peptides issus de la trypsinolyse de **B1** sur extrait élué ont été illisibles à cause d'une forte contamination en glycine.

D) Recherche des gènes codant pour les polypeptides B1 et B2

1 - Oligonucléotides correspondant aux séquences NH₂ terminales et internes des polypeptides B1 et B2

A partir des séquences NH₂ terminales de B1 et B2 (**Fig. 39**) (code génétique **Annexe X**), les séquences nucléotidiques correspondant aux acides aminés, ont été obtenues (**tableau 17**). Chacun de ces oligonucléotides a été synthétisé (MWG-Biotech) et utilisé dans différentes expériences. Les oligonucléotides nécessaires à certaines expériences sont également présentés dans le **tableau 17**.

Les différents oligonucléotides synthétisés ont été utilisés pour rechercher les gènes codant pour les polypeptides **B1** et **B2**. Plusieurs approches ont été conduites utilisant des techniques telles que les amplifications PCR (**Annexe XI**), des hybridations et le criblage de banques d'ADNc ou d'ADN génomique (**Fig. 40**).

Seules les procédures et les résultats ayant permis d'obtenir des clones sont présentés.

2 - Utilisation des oligonucléotides pour des amplifications PCR à partir d'ARNm

2-1 Procédure (Fig. 41)

Les ARNm poly (A)⁺ des larves ont été purifiés sur colonne de cellulose oligo-dT (mRNA Separator Kit PT 1353-1, Clontech) à partir des ARNs totaux obtenus par les deux

premières méthodes d'extraction (au Nonidet P40 / Urée 7 M et celle utilisant la solution de guanidine thiocyanate). Il est ainsi possible d'obtenir de plus grandes quantités d'ARN.

Un μg d'**ADN complémentaire** a été obtenu par reverse transcription de 40 μg ARNs totaux de larves d'*A. assectella* avec 50 pmoles d'oligo(dT)-Réo et 16 U de transcriptase inverse (AMV) pendant 1 h à 42°C (condition spécifique du fabricant, Promega).

Les oligonucléotides utilisés sont **B1oligoa1**, ou **B1oligoa2**, ou **B1oligob1**, ou **B1oligob2**, ou **B2oligoc1**, ou **B2oligod1** associés à l'oligonucléotide **Réo** (**Tableau 17**).

L'utilisation d'un mélange de polymérases non thermosensibles et le tampon de réaction ont permis l'amplification des fragments PCR supérieurs à 1 kb (Boehringer Mannheim, ExpandTM Long Template PCR System).

La concentration ou la quantité des différents composés nécessaires à la réaction PCR (**a**) ainsi que les conditions d'amplification (**b**) sont résumées dans le **Tableau 18**.

Dans chacune des réactions PCR, un témoin négatif sans ADN matrice a été réalisé. Ceci permet de vérifier s'il y a eu contamination lors de la préparation des échantillons. Un autre témoin avec uniquement l'oligonucléotide **B1oligo(a1 ou a2)**, ou **B1oligo(b1 ou b2)**, ou **B2oligoc1**, ou **B2oligod1** a été réalisé pour contrôler l'absence d'auto-amplifications de ces oligonucléotides.

Chaque produit d'amplification par PCR est déposé sur un gel d'agarose 0,8 % en tampon TBE, séparé par électrophorèse pendant 1 h à 90 V, et coloré au bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BET).

2-2 Résultats

Les résultats de l'amplification PCR à partir de l'**ADNc** sont présentés **figure 42**. En ligne M, figurent les bandes du marqueur de taille, le phage λ digéré par l'enzyme de restriction EcoR1 - HindIII ($\lambda\text{EcoR1 - HindIII}$).

Plusieurs fragments de taille spécifique ont été amplifiés avec **B1oligoa1** (ligne 1), **B1oligob1** (ligne3), **B2oligoc1** (ligne 5) et **B2oligod1** (ligne 6) (**Fig. 42**, flèches). La taille des fragments attendus (environ 2 kb, déduit de la taille des protéines) a permis de sélectionner 6 des bandes détectées après électrophorèse en gel d'agarose. Chacune d'entre elles a été extraite et purifiée (Geneclean) puis clonée en plasmide vecteur pGEM[®]-T (Promega).

La quantité d'ADN de chacun des fragments obtenus est faible. Les clones recombinants obtenus ne contenaient que des fragments de taille inférieure à ceux attendus (II

semble que les fragments de taille supérieure à 1 kb, soient clonés très difficilement dans le vecteur pGEM[®]-T). En conséquence, une deuxième stratégie a été utilisée (paragraphes suivants).

3 - Criblages des Banques « polyA » et « au hasard » afin d’obtenir les clones correspondant à la bande B1

Les ARNm poly (A)⁺ isolés ont été utilisés pour la préparation des 2 banques d’ADNc en utilisant un kit du commerce (RiboClone[®] cDNA synthesis, Promega). La synthèse des ADNc simples brins a été réalisé en utilisant, soit des amorces Oligo(dT) (“**banque poly A**”), soit des amorces hexamériques qui s’hybrident au hasard (“**banque au hasard**”).

Les clonages des fragments d’ADNc ont été effectués dans l’ADN du vecteur **Lambda gt10** au moyen d’adaptateurs EcoR1 (EcoR1 adaptator ligation system kit, Promega). L’ADN recombinant résultant a ensuite été empaqueté in vitro (Packagene[®] Systems, Promega) (procédure **annexe III**).

Les phages ont été amplifiés dans la souche bactérienne d’*Escherichia coli* **C 600 hfl**.

Les difficultés rencontrées nous ont conduit à rechercher, dans un premier temps, les clones correspondant à la bande B1.

La “**banque poly A**” d’ADNc obtenue à partir d’une amorce Oligo (dT) représente 200 000 phages recombinants de taille d’inserts entre 500 et 2 kb. La “**banque au hasard**” obtenue à partir des amorces qui s’hybrident au hasard représente 110 000 phages recombinants de taille d’inserts entre 500 et 1,5 kb.

D’une part, les banques d’ADNc ont été criblées avec les oligonucléotides **B1oligo(a1** ou **a2)** ou **B1oligo(b1** et **b2)** marqués radioactivement

D’autre part, l’ADNc cloné dans la banque a été amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides **B1oligo(b1** et **b2)** situés dans le gène codant pour le polypeptide B1 et les oligonucléotides **Lgt10(F** et **R)** situés sur les bras d’ADN du phage.

3-1 Criblage des banques par une sonde radioactive

Cette procédure a consisté à **cribler** les deux banques avec les oligonucléotides **B1oligo(a1** et **a2)** ou **B1oligo(b1** et **b2)** déduits du microséquençage peptidique de **B1** (**Tableau 17**).

Pour principe, chacune des banques a été étalée, afin de représenter 2 à 3 fois la banque

d'origine sur boîtes de Pétri (9 cm de diamètre), à raison de 20 000 phages recombinants par boîte. L'ADN des phages a ensuite été transféré *in situ* sur des membranes de nylon (BiotransTM Nylon Membranes, ICN). Cinquante pmoles de chacun des oligonucléotides sélectionnés ont été marqués en position terminale avec du [γ P³²dATP] (ICN) en utilisant 10 U de T4 polynucléotide kinase (Promega, **Annexe V**). Les membranes ont été hybridées avec ces oligonucléotides. L'hybridation a été réalisée à T_m moyenne moins 4°C de chacun des oligonucléotides, soit 49°C pour **B1oligo(a1 et a2)** et 46°C pour **B1oligo(b1 et b2)**. Le rinçage s'est effectué à T_m - 4°C, en 5XSSC final (**Annexe VI**).

a) Résultats du criblage de la “banque au hasard”

Seule l'hybridation avec les sondes **B1(oligob1 et b2)** de la **banque au hasard**, a permis de révéler 6 spots d'hybridation correspondant à 6 clones de phages recombinants (**Fig. 43a**).

Un secteur large entourant chacune des plages de lyse positives a été récupéré. Les phages (“**phages criblage 1**”) ont été élués en TM (Tris 10mM, MgCl₂ 10 mM). Chacune de ces plages contient de nombreux clones phagiques différents. Afin de purifier le phage contenant le fragment hybridant avec les oligonucléotides **B1(oligob1 et b2)**, les plages de lyse du criblage 1 ont été réétalées à raison de 500 phages par boîte. Les phages ont été transférés sur membranes, hybridés de nouveau avec **B1(oligob1 et b2)**. Pour chacun des clones, des signaux positifs qui semblaient peu spécifiques, ont été obtenus. Chaque clone ainsi obtenu a été étudié (“**phages criblage 2**”) (**Fig. 43b**).

Ces résultats nous ont conduit à suivre les 2 procédures suivantes :

❶ Analyse des phages du criblage 1

L'ADN des phages recombinants du criblage 1, contenant à la fois des fragments hybridant et n'hybridant pas avec les oligonucléotides, a été purifié (**Annexe XIII**). Les fragments insérés ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces oligonucléotidiques **Lgt10(F et R)** (**tableau 17**) complémentaires de régions d'ADN de phage situées de part et

d'autre du site de ligation (**Fig. 44**).

Chaque amplification d'ADN par PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 μ l. La quantité d'ADN de phages utilisée pour chaque réaction est de 100 ng. Chacune des réactions est réalisée avec un témoin négatif dans lequel aucun ADN matrice n'a été additionné à la réaction.

La concentration des différents réactifs nécessaires à la réaction PCR (**a**) ainsi que les conditions d'amplification (**b**) sont résumées dans le **Tableau 19**.

Chaque produit d'amplification PCR est déposé sur un gel d'agarose 0,8 % en tampon TBE 1X, séparé par électrophorèse et coloré au bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml, BET).

Les résultats de l'amplification des fragments insérés dans les phages recombinants positifs sont présentés **figure 45**. En ligne M, figurent les bandes du marqueur de taille, phage λ digéré par l'enzyme de restriction HindIII (λ HindIII).

Plusieurs bandes reflétant une amplification d'ADN sont présentes pour chaque phage (**Fig. 45a**, ligne **1 à 6**). Le gel a été transféré sur membrane de nitrocellulose ensuite hybridée à la température de 46°C avec les oligonucléotides **B1oligo(b1 et b2)**, et rincée en 5XSSC final à 46°C. L'autoradiographie (**Fig. 45b**) révèle un signal d'hybridation de certaines des bandes observées sur le gel coloré au BET, correspondant aux fragments clonés dans ces phages recombinants. Un signal positif a été obtenu dans les clones 1 à 5.

Le fragment PCR présentant un signal d'hybridation avec **B1oligo(b1 et b2)**, a été isolé pour les clones 1 à 5 et cloné en plasmide vecteur pGEM[®]-T (Promega). Un μ g d'ADN de chacun des clones a été déposé en "spot" sur une membrane et hybridé avec l'oligonucléotide **B1oligo(b1 et b2)**. Seuls 3 clones ont présentés un signal d'hybridation. Il s'agit des clones S23, S30 et S40 correspondant respectivement aux clones 1, 2 et 3, qui ont été ensuite séquencés (**Fig. 46**). Les séquences ont été réalisées sur un système LI-COR (DNA Sequencer 4000L). Le clonage et les conditions de séquençage sont décrites en **Annexe XIV**.

Les séquences correspondant aux oligonucléotides **Lgt10(F ou R)** du phage λ gt10 utilisées pour les amplifications PCR ont été retrouvées. Par contre, les oligonucléotides **B1oligo(b1 ou b2)** ne se retrouvent pas à l'intérieur de la séquence. Les fragments insérés ne correspondent pas aux séquences nucléotidiques attendues.

🕒 Analyse des phages du criblage 2

L'ADN des phages isolés à partir du criblage 2 a été digéré par l'enzyme de restriction EcoR1 pour permettre la libération des différents fragments insérés. L'ADN digéré a été ensuite déposé sur un gel d'agarose 0,8 %, séparé par électrophorèse et coloré au BET.

Le résultat de la digestion de l'ADN des 6 clones purifiés (ligne 1 à 6) est présenté **figure 47**. En ligne M, figurent les bandes du marqueur de taille, phage λ digéré par l'enzyme de restriction HindIII (λ HindIII).

Une seule bande, correspondant à 1 fragment inséré, est présente pour l'un des phages (**fig. 47a, ligne 1**). Les autres phages semblent vides (**fig. 47a, lignes 2 à 6**).

Le gel a ensuite été transféré sur membrane de nylon (ICN) ensuite hybridée avec les oligonucléotides **B1oligo(b1 et b2)**. L'autoradiographie (**Fig. 47b**) révèle la bande observée sur gel. Celle-ci est extraite du gel, clonée (clone SE2) en plasmide vecteur pGEM[®]-T (Promega) puis séquencée (**Fig. 48**) (détail **Annexe XIV**). La séquence obtenue ne possède pas les séquences correspondant aux oligonucléotides **B1oligo(b1 ou b2)**. Il ne s'agit donc pas de la séquence d'un clone possédant le gène codant pour la bande B1.

b) Résultats du criblage de la banque poly A

Aucun clone positif n'a été obtenu après criblage de la **banque poly A**.

3-2 Criblage de la banque « au hasard » par amplification PCR

L'ADN de l'ensemble des phages de la **banque “au hasard”** a été préparé (**Annexe XIII**). Ensuite, des fragments PCR ont été amplifiés en utilisant d'un côté, les oligonucléotides **B1oligo(b1 et b2)** et de l'autre les oligonucléotides **Lgt10(F et R)** (**Fig. 49**). Le but était d'amplifier sans purification préalable les fragments contenant les oligonucléotides b1 et b2.

La concentration des différents réactifs nécessaires à la réaction PCR (**a**) ainsi que les conditions d'amplification (**b**) sont résumées dans le **Tableau 20**.

Les résultats de l'amplification de l'ADNc de l'ensemble des phages recombinés de la **banque “au hasard”** avec les oligonucléotides **B1oligob1** (ligne 1) ou **B1oligob2** (ligne 2) et **Lgt10(F ou R)** sont présentés **figure 50**.

Plusieurs fragments d'amplifications ont été observés : 2 fragments obtenus avec **B1oligob1** et **Lgt10F** (ligne 1) et 3 avec **B1oligob2** et **Lgt10F** (ligne 2) (**Fig. 50**). Chacune des 5 bandes détectée après électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % a été purifiée (GeneClean) puis clonées en plasmide vecteur pGEM[®]-T (Promega) pour en déterminer la séquence. Il s'agit des

clones : b1F24, b1F32, b1F45, b1F62 et b1F64. Les 5 séquences correspondantes sont présentées **figure 51**.

Les séquences des oligonucléotides ont été retrouvées mais la suite de la séquence ne correspond pas aux nucléotides attendus d'après les microséquences en acides aminés.

4 - Criblage de la Banque « polyA » afin d'obtenir les clones correspondant à la bande B2 par amplification PCR

L'ADN de l'ensemble des phages de la **banque «poly A»** a été préparé (**Annexe XIII**). Ensuite, des fragments PCR ont été amplifiés en utilisant d'un coté, les oligonucléotides **B2oligo(c1 et d1)** et de l'autre les oligonucléotides **Lgt10(F et R)** (**Fig. 49**). Le but était d'amplifier sans purification préalable les fragments contenant les oligonucléotides B2oligo1 et B2oligo1.

La concentration des différents réactifs nécessaires à la réaction PCR (**a**) ainsi que les conditions d'amplification (**b**) sont résumées dans le **Tableau 21**.

Les résultats de l'amplification de l'ADNc de l'ensemble des phages recombinés de la **banque «poly A»** avec les oligonucléotides **B1oligoc1** (ligne 1) ou **B1oligod1** (ligne 2) et **Lgt10(F ou R)** sont présentés **figure 52**. En ligne M, figurent les bandes du marqueur de taille, le phage λ digéré par l'enzyme de restriction HindIII (λ HindIII).

Plusieurs fragments d'amplification ont été observés avec **B2oligoc1** (ligne 1) et **B2oligod1** (ligne 2) (**Fig. 52**) : deux bandes, correspondant à la taille de fragments attendus (environ 2 kb, déduit de la taille des protéines), détectées après électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % ont été purifiées individuellement (Geneclean) puis clonées en plasmide vecteur pGEM[®]-T (Promega) pour en déterminer la séquence. Il s'agit du clone 20 et 30 correspondant respectivement aux fragments d'amplification obtenus avec **B1oligoc1** et **Lgt10F** et avec **B1oligod1** et **Lgt10F**.

Chacune des séquences des clones est présentée **figure 53**. Les séquences des oligonucléotides **B2oligo(c1 et d1)** ont été retrouvées mais, soit la suite de la séquence ne correspond pas aux nucléotides attendus d'après les microséquences en acides aminés (clone 20), soit l'oligonucléotide **B2oligod1** se retrouve aux deux extrémités de la séquence (clone 30).

✎ **En définitive, les différents essais de criblage des banques «poly A» et «au**

hasard” ou d’amplifications PCR des fragments d’ADN de phages des deux banques, n’ont pas permis jusqu’à présent d’isoler les gènes codant pour l’un ou l’autre des polypeptides B1 et B2.

Par ailleurs, certaines expériences sont encore en cours avec les oligonucléotides B1serb3, B1serb4, B1serI1R et B1serI2R.

E) Conclusion-Perspectives

D’après les caractéristiques de solubilité, les deux polypeptides du cocon d’*A. assectella* utilisés comme signal kairomonal par *D. pulchellus* ont été classés parmi les **séricines**.

Les **hybridations** réalisées à l’aide de la sonde *Ser1* de *B. mori* ont mis en évidence que ce gène, qui pourtant code pour la majorité des protéines de séricines intervenant dans la structure du fil de soie de *B. mori*, semble différent de celui rencontré chez *A. assectella*. De telles différences présentes au niveau des régions codantes ne sont pas surprenantes puisqu’elles existent déjà entre les gènes *Ser 1 / MG1* et *Ser2 / MG2* de deux espèces proches phylogénétiquement, à savoir *B. mori* (gène *Ser*) et *G. mellonella* (gène *MG*) (Žurovec *et al.*, 1992 ; Garel *et al.*, 1997).

L’hybridation obtenue sur les ARNs totaux de larves d’*A. assectella* avec la sonde Serici3R, motifs de 6 acides aminés conservés dans les séquences codant pour les séricines de *B. mori* et *G. mellonella*, a révélé que ce motif existerait également chez *A. assectella*. Chez *B. mori*, l’exon 8 du gène *Ser 1* code pour un peptide constitué d’un motif de 38 acides aminés répétés 13 fois contenant 40 % de sérine (Garel *et al.*, 1997). Cet exon contient le motif de 6 acides aminés communs à *B. mori* et *G. mellonella* et probablement à *A. assectella*. Ces résultats laissent supposer que les gènes codant pour les séricines d’*A. assectella* ont au moins un domaine qui semble conservé entre ceux de *B. mori* ou *G. mellonella*. Cette région pourrait être importante pour la structure de la séricine.

Cependant, les différences importantes observées entre les divers gènes de séricine, n’ont pas permis l’obtention de la séquence des gènes codant pour les séricines d’*A. assectella*, groupe de protéines auquel les polypeptides B1 et B2 semblent appartenir.

Les **microséquençages** partiels NH₂ terminaux sont nécessaires soit pour obtenir les outils moléculaires (oligonucléotides) de criblage ou d’amplification des gènes recherchés, soit pour vérifier l’attribution d’une séquence nucléotidique codante à une protéine spécifique.

La comparaison des séquences en acides aminés NH₂ terminaux obtenues pour les deux polypeptides avec celles déduites des séquences nucléotidiques (sens 5'-3') connues chez *B. mori*, n'a pas permis la mise en évidence d'**homologies** (Tsujiimoto & Suzuki, 1979 ; Garel *et al.*, 1997 ; Žurovec *et al.*, 1998a). La recherche d'homologies de séquence par l'utilisation de banques de données (BLAST) n'a donné aucune similitude avec des protéines de soie déjà connues.

Par ailleurs, les incertitudes quant à l'attribution de certains acides aminés n'ont pu être levées. Elles pourraient être en grande partie dues à l'impureté de certains des échantillons utilisés (peptides contaminants, forte quantité de Glycine contaminante) pourtant fractionnés sur CLHP, ou à l'apparition de NH₂ terminaux bloqués sans doute à cause de l'acrylamide.

D'autres difficultés, inhérentes aux chaînes polypeptidiques elles-mêmes sont apparues. La présence de cystéines, formant probablement des ponts disulfures, n'a pas permis de séparer par CLHP tous les fragments résultant de la trypsinolyse. Pourtant, si l'on s'en tient aux pourcentages d'arginine (2 à 3 %) et de lysine (4 à 5 %) dans chacun des deux polypeptides (Chapitre II), le nombre de fragments serait important (environ 70 sites de coupures).

Une expérience complémentaire consistant en des réductions et des alkylations des ponts disulfures (utilisation de Dithiotréitol (DTT) et de 4 vinyl-pyridine) suivies d'une séparation en CLHP des fragments résultants a conduit à la perte quasi totale de ceux-ci. Ils resteraient accrochés sur la colonne, ce qui semble indiquer la forte hydrophobicité de ces fragments et la nécessité d'améliorer la technique de séparation des deux polypeptides B1 et B2 sur CLHP.

Les différentes **amplifications** ou **criblages** ayant utilisé les oligonucléotides déduits à partir des séquences polypeptidiques **B1oligo(a1 et a2)**, **B1oligo(b1 et b2)**, **B2oligoc1** et **B2oligod1** n'ont pas permis d'isoler les gènes codant pour les polypeptides **B1** et **B2**. La séquence de l'oligonucléotide utilisé est généralement retrouvée mais la suite ne correspond jamais à la séquence attendue d'après les résultats des microséquences. Deux hypothèses pour expliquer ces résultats peuvent être émises :

- le code génétique étant dégénéré, les oligonucléotides déduits à partir de la séquence en acides aminés des polypeptides, comportent des ambiguïtés, en particulier sur la troisième base. Les oligonucléotides ainsi déduits ne sont pas complètement homologues de la séquence existant dans le génome. Ils manquent donc de spécificité. L'amélioration de la spécificité dans la complémentarité des amorces utilisées avec les gènes pourrait être obtenue, soit en utilisant des séquences internes renfermant un tryptophane ou une méthionine, acides aminés codés par

un seul codon, soit en tentant d'obtenir des séquences en acides aminés plus longues et évidemment moins incertaines. Les difficultés rencontrées lors du microséquençage de la séquence interne ne sont cependant pas résolues.

- la trop grande **dégradation des ARNs totaux de larves** utilisés. Cette dégradation semble essentiellement dûe à la forte quantité de RNAses présentes dans les cellules des larves L4 et L5. Les ADNc produits sont tronqués en 5', ne permettant pas l'obtention de fragments de taille suffisante (taille attendue \cong 2 kb), correspondant aux extrémités NH₂ terminales des polypeptides. Cette dégradation dûe au grand "turn-over" des cellules, se rencontre notamment chez les larves de *Drosophile* et semble difficile à contourner malgré les différentes procédures de purification d'ARN utilisées. Là encore, l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques internes semblerait la meilleure solution.

L'ensemble de cette étude nous montre l'importance de l'étape de microséquençage de façon à obtenir des séquences en acides aminés internes **spécifiques**. L'isolement des polypeptides **B1** et **B2** par électrophorèse suivie d'électroélutions a conduit à l'obtention d'échantillons néanmoins contaminés, notamment par de la glycine. Il reste donc à améliorer cette procédure de purification.

La technique d'électroélution, mise spécialement au point pour ces expériences, présente l'avantage d'être simple et d'obtenir le matériel suffisant pour d'autres expériences : par exemple, des hydrolyses par d'autres enzymes que la trypsine ou des réactifs chimiques tels que le bromure de cyanogène (hydrolyse après les méthionines) ou l'acide chlorhydrique.

Les problèmes de contamination pourraient être résolus ou du moins diminués par l'utilisation de tubes de dialyse de porosité plus grande ou d'un tampon de migration d'électrophorèse sans glycine.

La purification par CLHP des fragments hydrolysés pourrait se faire en utilisant d'autres types de colonne, plus adéquate pour des composés hydrophobes.

Malgré les problèmes rencontrés dans la recherche des gènes, il est indubitable que cette thématique ouvre de nombreuses perspectives de recherche et ceci dans des domaines très diversifiés de la biologie, à savoir :

- **au niveau comportemental**, leur expression en bactéries permettrait de confirmer l'utilisation de séquences peptidiques comme kairomone par les femelles *D. pulchellus*. De telles expressions sur des protéines de soie ont certes déjà été obtenues pour des gènes codant pour des protéines de soie d'araignée (Fahnestock & Irwin, 1997 ; Fahnestock & Bedzyk,

1997) mais demeurent rares.

- **au niveau évolutif**, en permettant des comparaisons phylogénétiques des gènes de soie. Si les gènes codant pour les fibroïnes, la P25 et les séricines de *B. mori* sont maintenant connus, il n'en demeure pas moins que peu de séquences nucléotidiques codant pour des protéines de soie d'autres Lépidoptères ou d'autres arthropodes sont pour le moment décrites. De plus, une autre protéine de soie appelé séroïne, chez *G. mellonella*, intermédiaire entre les fibroïnes et les séricines, vient d'être identifiée et son gène séquencé (Žurovec, 1998). Cette protéine présente-t'elle des homologues avec les polypeptides de la soie d'*A. assectella* ?

- **au niveau moléculaire** : la déduction des séquences peptidiques pourrait permettre, sur la base des caractéristiques aussi bien chimiques que physiques des acides aminés constitutifs, l'établissement de modèles structuraux déduisant l'association entre des polypeptides, donc de **B1** et **B2**.

- **au niveau mécanistique sensoriel**, en permettant par marquage des polypeptides de comprendre les mécanismes de base de la réception de telles molécules et d'identifier les molécules réceptrices lors du processus de transduction du signal.

**IV Organes sensoriels
intervenant dans la
perception des
kairomones du cocon d'*A.*
asssectella par les
femelles *D. pulchellus***

A) Introduction

Types de perception

Le comportement de reconnaissance d'un hôte consiste en une succession de phases déclenchées par des stimuli perçus à courte distance ou au contact direct avec celui-ci. On distingue les stimuli **physiques** : vibratoires, visuels et tactiles et les stimuli **chimiques** : olfactifs et gustatifs. Ces signaux présentent une grande diversité dans leur ensemble et agissent le plus souvent en synergie sur les insectes, et en particulier sur les parasitoïdes (revue de Vinson, 1985).

Toute étude tentant de connaître le système sensoriel et les mécanismes biologiques de perception des signaux impliqués chez un parasitoïde et de les associer à un comportement donné, s'avère donc difficile.

La perception de **signaux physiques** a été décrite dans la littérature ; citons les exemples de :

- la perception du "chant" des grillons mâles par *Ormia* (= *Euphasiopteryx*) *ochracea* (Braconidae) par l'organe tympanique (revue de Feener & Brown, 1997)
- la capacité de *Trichogramma minutum* (Trichogrammatidae) à "mesurer" les œufs-hôtes grâce à des organes sensoriels de l'extrémité du scape (Schmidt & Schmidt, 1986, 1987 ; Schmidt, 1991)
- la perception par *Sympiesis sericeicornis* (Eulophidae) de signaux vibratoires de son hôte au moyen de sensilles mécanoréceptrices des tarse (Meyhöfer *et al.*, 1997).

Néanmoins, ces études demeurent rares et le plus souvent incomplètes. Les descriptions de morphologie fonctionnelle des mécanorécepteurs impliqués sont, quant à elles, beaucoup plus nombreuses (revue de Keil, 1997).

Les exemples associant les études du comportement, du système sensoriel et des mécanismes de perception concernent essentiellement les **signaux chimiques**, et principalement ceux perçus par **olfaction**. La raison est peut-être d'ordre "hiérarchique". En effet, si plusieurs modalités sensorielles interfèrent au cours d'une succession de séquences comportementales, il apparaît que « l'odorat » reste la modalité sensorielle la plus fréquente (Haynes & Birch, 1985). Elle permet la détection à distance des insectes, elle peut stimuler la prise alimentaire, la ponte et d'autres comportements inter- ou intraspécifiques tels que l'aggrégation, la répulsion et surtout l'attraction (sexuelle ou autre) (revue de Haynes & Birch,

1985).

Chez les insectes, la perception de substances volatiles et leur identification a fait l'objet de nombreuses études (revue de Vinson, 1985). Une attention particulière a été portée sur les composés chimiques volatils issus des insectes eux-mêmes, principalement les phéromones, mais il faut aussi mentionner les substances volatiles provenant de l'environnement (plante-hôte en particulier). Certaines de ces études très complètes, car s'intéressant à plusieurs niveaux biologiques ("du comportement à la molécule"), ont permis de mieux **comprendre la perception olfactive et son influence sur les comportements**. Elles ont par exemple permis d'établir les mécanismes moléculaires de la détection des odeurs (Kaissling, 1971, 1986 ; Vogt, 1987 ; De Kramer & Henberger, 1987 ; Payne *et al.*, 1987 ; Masson & Mustaparta, 1990 ; Pelosi & Garibotti, 1993 ; Kaissling, 1996).

La gustation, ou (du fait de sa faible analogie avec celle des vertébrés) plus judicieusement la **chimioréception de contact** (Hodgson, 1968, 1974), intervient également de façon importante lors de la vie d'un insecte (comportement sexuel, de reconnaissance, de prise alimentaire, de ponte...). Lors de la **phase d'acceptation** d'un hôte (végétal ou animal), la reconnaissance de l'hôte à courte distance mise à part, cette modalité sensorielle est la plus utilisée. De nombreux composés chimiques perçus par contact sont maintenant bien identifiés (Chapitre II). Depuis ces dix dernières années, les études relatives à la gustation chez les insectes sont en plein essor et s'attachent à des niveaux biologiques de plus en plus fins. On pourrait citer les analyses génétiques menées sur des mutants de *Drosophila melanogaster* (Tompkins, 1979 ; Tompkins *et al.*, 1979 ; Tanimura *et al.*, 1982 ; Singh, 1997). En complément aux études d'anatomie, de physiologie et de comportement de plus en plus développées ces travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sollicités dans la perception de diverses molécules (Singh, 1997).

Les bases morphologiques et anatomiques de la chimioréception ont été déjà largement définies chez les insectes (revues de Zacharuk, 1980, 1985). Quelques travaux plus récents ont tenté de s'intéresser aux comportements et aux équipements sensoriels impliqués dans ces comportements (Bin *et al.*, 1989 ; Isidoro *et al.*, 1996). L'utilisation de techniques d'électrophysiologie a permis, dans de nombreux cas, de confirmer la fonction gustative des récepteurs et de préciser la perception ou non de molécules précises telles que des glucosinolates, des cardénolides et des acides aminés (Stoffolano *et al.*, 1990, Städler *et al.* 1995, Albert *et al.*, 1997).

En définitive, le comportement d'acceptation de l'hôte est la résultante de la perception

de stimuli physiques et/ou chimiques et de leurs variations, perceptions rendues possibles grâce à un équipement sensoriel souvent très développé chez les insectes et en particuliers chez les parasitoïdes.

Équipement sensoriel des insectes

Lors de la phase d'acceptation de l'hôte, la perception par un parasitoïde des **facteurs chimiques**, qu'ils soient internes ou externes, se fait par l'intermédiaire des **chimiorécepteurs de contact** des antennes, des tarsi, des palpes labiaux ou de l'ovipositeur.

Le rôle important des **antennes** comme organe sensoriel est déjà bien établi chez les insectes (Schneider, 1964; Quicke, 1997) et notamment dans les comportements de sélection (Vinson *et al.*, 1986) et d'acceptation de l'hôte (Weseloh, 1972 ; Bin *et al.*, 1989 ; Isidoro *et al.*, 1996).

Chez les endoparasitoïdes et les ectoparasitoïdes, l'**ovipositeur** est souvent l'organe clef intervenant lors de la phase de discrimination de la qualité de l'hôte (Wylie, 1965, 1971 ; Ganesalingam, 1974 ; Greany *et al.*, 1977 ; Van Lenteren, 1981 ; Hofsvang, 1988 ; Bai & Mackauer, 1990 ; Nelson & Roitberg, 1993 ; Quicke, 1997).

Chez certaines espèces de parasitoïdes, comme *Cardiochiles nigriceps* (Braconidae) ou *Trichogramma minutum* (Trichogrammatidae), les sensilles présentes sur les **tarsi** sont généralement chimioréceptrices mais peu d'exemples décrivent leur intervention lors de la phase d'acceptation et de manière générale dans la sélection de l'hôte (revue de Quicke, 1997).

Quant aux chimiorécepteurs des **palpes labiaux**, ils sont souvent essentiellement impliqués dans le comportement alimentaire des insectes. Le rôle de ces palpes labiaux dans la perception de signaux chimiques lors de l'une des étapes de la phase d'acceptation de l'hôte par un parasitoïde semble anecdotique car peu étudié.

La plupart des travaux concernant les organes sensoriels d'Hyménoptères parasitoïdes se sont concentrés sur les antennes et l'ovipositeur, qui sont pourvus de nombreux récepteurs sensoriels de différents types. En effet, ils portent des **sensilles**, permettant la perception des odeurs (sens olfactif) mais aussi beaucoup d'autres sensilles intervenant dans la gustation, la détection de la chaleur ou de l'humidité, le toucher, et chez quelques espèces la détection des sons (Slifer, 1970 ; Steinbrecht, 1984 ; Altner & Loftus, 1985).

La structure des sensilles présente trois parties (**Fig. 54**) :

- une expansion cuticulaire, généralement en forme de soie. Elle est la première partie en contact avec les molécules stimulantes.

- une ou plusieurs cellules réceptrices (neurones), dont les dendrites sensibles baignant dans la lymphe sensillaire seront stimulées par les molécules adsorbées.

- des cellules auxiliaires ou enveloppes, telles que la cellule thécogène, la cellule trichogène et la cellule tormogène intervenant dans la formation de la partie cuticulaire de la sensille ou fournissant l'environnement ionique des neurones sensoriels (Kaissling, 1987 ; Keil & Steinbrecht, 1984).

La diversité des formes rencontrées, souvent liée à différentes perceptions (olfactives, gustatives, de chaleur, d'hygrométrie, ...), est aussi bien inter qu'intraspécifique. Pas moins de 16 morphotypes différents de sensilles ont pu être répertoriés sur les antennes de *D. pulchellus* (Rojas-Rousse & Palevody, 1983 ; Lecomte *et al.*, 1990).

Une typologie fonctionnelle, basée sur la morphologie et l'ultrastructure des expansions a été bien établie (Zacharuk, 1980 ; Altner, 1977 ; Altner & Prillinger, 1980) et peut être résumée comme suit :

- **sensille sans pore** : la majorité de ces sensilles correspondent à des mécanorécepteurs. Elles sont caractérisées par un socle flexible. Des fonctions de thermo- ou d'hygroréception ont également été décrites pour ce type de sensilles.

- **sensilles à un seul pore** généralement apical : la présence d'un pore unique caractérise les sensilles ayant une fonction chimiotactile (fonction chimiosensorielle de contact). En général, les dendrites des neurones gustatifs ne sont pas ramifiées dans la sensille et le nombre de dendrites (mis en évidence en microscopie électronique à transmission sur des coupes transversales de ces sensilles) correspond au nombre de cellules nerveuses. Une fonction mécanoréceptrice est fréquemment associée à cette fonction gustative.

- **sensilles à pores multiples** : les pores sont généralement très nombreux et répartis sur la totalité de la paroi cuticulaire. Ces sensilles ont généralement une fonction olfactive.

Sur ces bases morphologiques et ultrastructurales la fonction d'une sensille peut donc être appréhendée. Cependant, seules des études électrophysiologiques complémentaires peuvent confirmer ou infirmer cette fonction.

Organes sensoriels impliqués dans la phase d'acceptation de l'hôte chez *D. pulchellus*

Nous avons pu isoler et identifier des stimuli chimiotactiles intervenant dans le comportement d'identification d'*A. assectella* par *D. pulchellus*. La compréhension des mécanismes de perception implique obligatoirement une analyse précise des **organes sensoriels cibles**. Dans cette perspective, la procédure suivie a été la suivante :

❶ Localiser les organes impliqués dans la phase d'acceptation de l'hôte en utilisant les données bibliographiques et les observations expérimentales directes (Chap. I et II).

Chez *D. pulchellus*, la phase d'identification de l'hôte réalisée par contact se déroule à l'extérieur et à l'intérieur du cocon de l'hôte. Les examens antennaires et abdominaux de l'hôte par les femelles semblent prépondérants.

Cette étude a donc été conduite sur deux organes :

- les **antennes** de *D. pulchellus* qui sont les premiers organes à entrer en contact avec le cocon de l'hôte
- le **proctigère** qui intervient vraisemblablement lors des contacts abdominaux avec la chrysalide hôte.

Il est possible que d'autres organes sensoriels soient impliqués dans ce comportement, dont la description poussée a permis de montrer l'existence de contacts répétés des tarsi et des pièces buccales avec le cocon, ainsi que des valves abdominales avec la chrysalide. Comme plusieurs auteurs l'ont montré pour d'autres espèces d'endoparasitoïdes (Van Lenteren, 1981 ; Nettles *et al.*, 1982 ; Kainoh & Brown, 1994 ; Quicke, 1997), la pénétration de l'ovipositeur lors de l'acte de ponte doit en outre fournir des informations chimiques à l'insecte. Cependant, la série de tests effectuée par Labeyrie (1960) permet de conforter l'hypothèse selon laquelle les récepteurs antennaires sont directement impliqués dans la phase d'acceptation de la chrysalide dans son cocon. Elle permet de négliger le rôle des palpes labiaux et des valves abdominales : *« l'ablation des antennes ne provoque pas de mortalité ni même une diminution de la longévité ; l'activité générale se trouve à peine diminuée, les femelles marchent normalement et peuvent même voler. Mises en présence de cocons contenant des chrysalides, elles sont pourtant incapables de les découvrir ; mieux, placées sur le cocon, elles manifestent pour ce dernier la plus parfaite indifférence. Cette absence de réactions vis à vis de l'hôte reste totale pendant toute la vie de la femelle, quelle que soit la durée du séjour de l'hôte. Aucune faculté de remplacement ne lui permet de suppléer à la défaillance des antennes. Ceci est d'autant plus*

remarquable que l'absence d'antennes n'empêche pas la femelle de trouver le sucre et l'eau qui lui permettent de s'alimenter. Les palpes qui permettent cette découverte de la nourriture ne jouent donc aucun rôle, même de remplacement, dans la reconnaissance de l'hôte. » ... « L'ablation des valves palpiformes (situées à l'extrémité abdominale et servant d'étui pour l'ovipositeur) ne diminue pas la longévité des femelles, elle n'empêche pas non plus la ponte, bien que leur très forte pilosité ait pu faire croire à un rôle sensoriel capital » (Labeyrie, 1960).

② Caractériser d'un point de vue fonctionnel des organes sensoriels impliqués dans la perception des kairomones du cocon et de la chrysalide, par une approche morphologique et ultrastructurale faisant appel à la microscopie électronique, complétée par une étude électrophysiologique des sensilles supposées spécifiques.

Les résultats de nos observations et des précédentes études (Labeyrie, 1960) nous ont indiqués que les antennes sont les organes qui interviennent en tout premier lieu. Nous allons donc nous intéresser plus précisément à leurs sensilles. Pour cela trois études ont été réalisées.

Une étude purement **morphologique**, qui a fait appel aux techniques de **microscopie électronique à balayage**. Il est alors possible d'obtenir des informations sur la forme externe, le nombre et la taille des diverses sensilles et éventuellement d'observer la présence de pores.

Une étude **ultrastructurale**, qui requiert l'utilisation de la **microscopie électronique à transmission**. A partir des coupes réalisées, il est alors possible d'avoir des informations sur le nombre et la localisation des dendrites et des cellules auxiliaires et ainsi de présumer de la fonction des sensilles.

La confirmation de la fonction des sensilles passe par les **études électrophysiologiques** au cours desquelles le stimulus actif en comportement a été testé sur les sensilles supposées être impliquées dans la perception de ce signal "sapide".

B) Matériels et Méthodes

1 - Préparation des organes sensoriels pour la microscopie électronique à balayage

Les femelles ou les mâles de *D. pulchellus* utilisés pour les expériences ont été prélevés

le jour de leur émergence des chrysalides d'*A. assectella*. Les insectes ont été disséqués dans le liquide de Ringer. Les antennes d'une part, et l'extrémité de l'abdomen avec le proctigère d'autre part (celui-ci est maintenu dévaginé à l'aide d'une micropipette de verre à extrémité arrondie) sont récupérés et déshydratés progressivement par des bains successifs de 15 à 20 min, dans de l'éthanol de degré croissant (50, 70, 90, 100%). Les échantillons sont ensuite placés dans un dernier bain d'acétone pour quelques minutes puis séchés.

Les échantillons sont conservés collés sur des plots en laiton à l'aide d'un adhésif double-face ou d'une colle à l'argent. Ils sont métallisés sous vide à l'or-palladium par pulvérisation cathodique pendant 3 à 4 min.

Les échantillons ont été observés par la suite au microscope à balayage DSM 982 Gemini.

2 - Préparation des organes sensoriels pour la microscopie électronique à transmission

Deux procédures différentes ont été suivies pour fixer les antennes de *D. pulchellus* :

❶ Les femelles sont prélevées le jour de l'émergence puis les antennes sont disséquées. Les antennes ou les antennomères apicaux sont préparés selon la procédure modifiée de Mc Kenzie *et al.* (1993) :

- fixation dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,2-7,3, contenant 2,5% de glutaraldéhyde et 5% de sucrose pendant 6 h à 4°C,

- rinçage dans le tampon de cacodylate 0,1 M pendant 12 h à 4°C,

- post-fixation dans une solution de tétraoxyde d'osmium 1% pendant 1h à 4°C et rinçage quelques minutes dans le même tampon,

- déshydratation dans des bains successifs d'éthanol de degré et de durée croissants [2 × (50°-5 min, 70°-10 min, 90°-15 min, 100°-20 min)], suivie de 2 bains de 30 min dans une solution d'oxide de propylène,

- imprégnation dans de l'Epon-Araldite en utilisant l'oxide de propylène comme liant pendant la nuit à 4°C,

- orientation des pièces, puis solidification de la résine pendant 12 h à 37°C puis 48 h à 65°C.

❷ Les antennes ou les antennomères apicaux de préimagos femelles prélevés dans la chrysalide 2 à 3 jours avant l'émergence sont disséqués et fixés dans une solution de TRUMP pendant 24

h minimum, à 4°C.

Les échantillons sont alors post-fixés, déshydratés puis imprégnés selon la procédure précédente.

Les blocs de résines contenant les échantillons et préparés selon les procédures ❶ et ❷ sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome. Des coupes semi-fines (0,5 à 1 µm) sont réalisées au moyen d'un couteau de verre. Après coloration au bleu de toluidine, une zone du reste de la pièce à découper est sélectionnée pour effectuer les coupes fines (≈ 80 nm). Les coupes fines sont exécutées au moyen d'un couteau de diamant.

Les coupes fines sont contrastées (**Annexe XV**) à l'acétate d'uranyl aqueux et au citrate de plomb puis observées au microscope électronique à transmission JEOL JEM 1010.

3 - Tests électrophysiologiques : enregistrements « tip-recording » (une sensille)

Il est communément admis que les grandes étapes physiologiques de la perception chimiosensorielle de contact sont les suivantes (Hansen, 1978) :

- par l'extrémité ouverte de la sensille, le pore, les molécules atteignent les dendrites des cellules sensorielles,
- un potentiel électrique se développe et se transmet le long de la dendrite,
- un **potentiel d'action** est généré dans la région du corps cellulaire (Dethier, 1970 ; Städler, 1984).

Le but des tests électrophysiologiques est ici de déterminer laquelle (ou lesquelles) parmi les sensilles chimiosensorielles gustatives répertoriées, possède des récepteurs aux composés d'un extrait actif en comportement et développe un potentiel d'action.

Tout d'abord, un extrait de lavage de cocons à l'eau a été réalisé comme antérieurement (chapitre II). Pour rappel, 1000 cocons d'*A. assectella* élevés sur milieu supplémenté en poudre de poireaux sont lavés dans 10 ml d'eau ultrapure pendant 5 min à température ambiante. Les particules entraînées lors du lavage sont éliminées par filtration. L'extrait est ensuite lyophilisé pour le concentrer.

Les tests en électrophysiologie ont été réalisés avec :

- une solution test d'eau contenant du NaCl 50 mM,
- la solution de lavage à l'eau à la quantité de 20 équivalents-lavage de cocons lyophilisés additionné de NaCl 50 mM (solution qui contient les **2 polypeptides B1 et**

B2 identifiés comme molécules kairomonales dans le chapitre II).

Le NaCl est utilisé pour favoriser la conductivité.

Les enregistrements sont réalisés sur les antennes des femelles de *D. pulchellus* vivantes et retenues par de la pâte à modeler. Seules les antennes, fixées sur un adhésif sont apparentes. L'**électrode indifférente**, un fil d' Ag-AgCl, est introduite au préalable dans le thorax de la femelle. L'**électrode d'enregistrement** est un fil d'Ag-AgCl placé dans une micropipette de verre effilée de 4 à 5 µm de diamètre interne, remplie d'une des 2 solutions à tester. Le fil d'Ag-AgCl est connecté à un préamplificateur (Biologic VF 180) associé à un oscilloscope relié lui-même à une interface d'acquisition (Syntech IDAC-02). Une sensille sélectionnée est coiffée par l'électrode d'enregistrement dirigée sous microscope à l'aide d'un micromanipulateur. Le signal électrique est enregistré pendant les 15 premières secondes, puis traité à l'aide du logiciel Autospike V4 (Syntech) (**Fig. 55**).

L'obtention de **potentiels d'action** indique la **présence de récepteurs dendritiques spécifiques des molécules contenues dans la micropipette de verre**.

L'étude électrophysiologique nécessite un extrait de cocons suffisamment conducteur, contenant du NaCl 50 mM. Ce dernier a été testé pour vérifier son action sur le comportement des femelles.

4 - Tests comportementaux

4-1 Insectes, tests et critères comportementaux

Les femelles *D. pulchellus* utilisées pour les tests comportementaux sont préparées de la façon décrite aux chapitres I et II.

Pour chaque test biologique, la femelle est placée en **situation de choix** entre un leurre témoin et un leurre expérimental. Vingt µl d'extrait expérimental stimulant sont déposés sur le leurre ensuite séché. Les leures témoins sont simplement imprégnés de 20 µl d'eau, puis séchés.

L'extrait de lavage à l'eau concentré et le même extrait additionné de NaCl 50 mM ont été utilisés à la quantité de 20 équivalents-lavage de cocons lyophilisés et testés pour leur capacité à déclencher le comportement d'acceptation de femelles parasitoïdes.

Les deux critères retenus au chapitre II, la **durée moyenne de contact et le pourcentage de femelles** d'un groupe expérimental donné, **présentant des contacts de l'extrémité abdominale avec un leurre**, sont utilisés.

4-2 Choix des tests statistiques

Le test non-paramétrique d'analyse de variance de rang de **Kruskal-Wallis** a été utilisé pour comparer les résultats des différents échantillons indépendants.

Les fréquences sont comparés au moyen du test χ^2 .

Le niveau de signification des tests est **P=0,05** pour des situations bilatérales (Minitab est le logiciel de traitement statistique utilisé).

C) Résultats - Interprétations

1 - Etude morphologique : observations en microscopie électronique à balayage

1-1 L'antenne

L'antenne comprend un article basal élargi, **le scape**, un deuxième article, **le pédicelle**, suivi de nombreux autres antennomères, qui constituent le **flagelle**. Chez *D. pulchellus*, il se compose de 22 (**Fig. 56**) à 24 antennomères, selon les individus (Lecomte *et al.*, 1990). Les antennes mesurent en moyenne 25 mm de long, 0,8 mm de diamètre au niveau du flagelle et 2 mm au niveau du scape (Lecomte *et al.*, 1990).

Le tout premier contact antennaire sur le cocon s'effectue par l'antennomère 22, puis essentiellement par les 13 antennomères distaux. Tous les types sensillaires présents sur les antennes des femelles de *D. pulchellus* ont été décrits sur ce dernier antennomère.

L'antennomère apical

La totalité de la surface de l'antennomère est représentée sur les **figures 57** (face dorsale / axe de l'insecte), **58** (face ventrale / axe de l'insecte). Huit morphotypes de sensilles, localisés de façon différentielle puisque certains d'entre eux n'apparaissent pas sur toute la surface de l'antennomère (Type 6, par exemple), ont été répertoriés. Il existe également une différence d'abondance relative de chacun des types sensillaires, les sensilles de type 8 étant par exemple les plus représentées. Les différents types sensillaires définis selon leur expansion cuticulaire sont décrits ci-après. Entre parenthèses est précisé le nom donné à ce type de sensilles d'après Lecomte *et al.*, 1990.

* **Sensille de type 1 (type k) (Fig. 59) :**

L'expansion cuticulaire de la sensille de type 1, en forme de soie, est **perpendiculaire** à l'axe de l'antenne. Cette orientation fait que ces sensilles dépassent nettement des autres types. La **longueur** totale est d'environ 13 μm et le **diamètre**, relativement constant d'environ 0,6 μm à mi-hauteur. La **base** s'insère dans une cupule bien délimitée et légèrement surélevée. Elle est cannelée longitudinalement et son **extrémité** arrondie est ouverte par un pore unique en forme de 8 ou plus simplement circulaire. La déshydratation du matériel pourrait expliquer les variations de forme du pore selon les sensilles. Cette structure ne semble donc pas rigide. Au moins 9 de ces sensilles ont pu être dénombrées (**Fig. 58**). Le **nombre** de sensilles de type 1 sur le dernier antennomère semble donc peu important.

Ces sensilles ne sont pas regroupées dans une zone spécifique et se répartissent sur l'ensemble de la surface de l'antennomère (**Fig. 57 et 58**).

La présence d'un pore unique à l'extrémité amène à envisager une **fonction chimiotactile** pour ce type de sensille

* **Sensille de type 2 (type g) (Fig. 60) :**

La longueur de l'expansion cuticulaire de la sensille de type 2 (environ **8.5 μm**) est inférieure à celle de type 1. Cette sensille disposée **obliquement** par rapport à l'axe de l'antenne et dirigée vers l'avant de l'insecte, est de **section ovale** relativement constante d'environ $2 \times 1 \mu\text{m}$. Sa **base**, légèrement évasée, semble sur la moitié de sa circonférence être en prolongement de la cuticule et sur l'autre moitié s'inscrire plus profondément sous la cuticule. Cette expansion est marquée de cannelures jusqu'à sa **partie distale**. A ce niveau, les cannelures se rejoignent en deux rangées de digitations. Aucun pore n'est visible à l'apex, pourtant un écart plus ou moins important apparaît parfois entre les deux rangées de digitations (**Fig. 60c, d et e**). Ces sensilles sont plus nombreuses que celles de type 1. Au moins 30 de ces sensilles ont été dénombrées, essentiellement sur la partie ventrale de l'antennomère, tandis qu'elles sont peu représentées sur la face dorsale de l'antennomère (2 sensilles de type 2 sont visibles) (**Fig. 57, 58**).

Les digitations de l'apex laisse supposer une **fonction chimiotactile** de ce type de sensille.

* **Sensille de type 3 (type b) (Fig. 61) :**

La sensille de type 3 possède une expansion de **6.8 μm de longueur**, de **section ovale** relativement constante de $4 \times 1,5 \mu\text{m}$. Elle est **orientée** obliquement par rapport à l'axe antennaire, la pointe dirigée vers la partie antérieure de l'insecte. Sa **base** s'inscrit sur une

“membrane de jointure” plus ou moins apparente, située à l’intérieur d’une cavité de forme elliptique. La paroi distale de cette expansion est aplatie. Cette **partie distale** est parfois creusée (effet probable de la déshydratation), et présente une succession de plis transversaux et continus. Aucune ouverture n’apparaît sur ces sensilles. Au moins 9 sensilles de ce type ont pu être dénombrées (**Fig. 58**). Leur **localisation** semble **spécifique** puisqu’elles ne sont pas présentes sur l’ensemble de la surface de l’antennomère : aucune sensille de ce type n’est visible sur la face dorsale de l’antennomère apical (**Fig. 57**). Ce type de sensilles semble présent uniquement vers la base de l’antennomère face ventrale (**Fig. 58**).

Leur extrémité rainurée, apparemment sans pore (caractéristique de sensilles olfactives ou gustatives) **ne** permet **pas** de conclure à une **fonction chimiosensorielle** mais plutôt mécanique.

*** Sensille de type 4 (type c) (Fig. 62) :**

Cette sensille, placée **perpendiculairement** à l’axe antennaire, est beaucoup plus courte (**3,5 µm de haut**). Elle est en forme de “bouchon de Champagne”. Sa tête sphérique, d’environ **1,4 µm de diamètre** marquée sur son pourtour de sillons verticaux profonds pouvant être des pores, est prolongée par une sorte de “pied” renflé à sa base, qui s’insère dans une cavité circulaire bien délimitée. Leur **nombre** sur l’antennomère apical est faible ; un seul sur la **figure 57**. Il est possible que leur présence soit caractéristique d’autres antennomères ou alors elles sont très peu représentées.

Les profonds sillons pouvant être des pores de petite taille, une **fonction** chimiosensorielle de type olfactif est plutôt supposée (cf microscopie à transmission).

*** Sensille de type 5 (type d) (Fig. 63) :**

Cette sensille présente une forme similaire à celle du type 1 mais est plus courte, **8,5 µm de long**. Son **diamètre** circulaire est relativement constant sur toute sa longueur (0,8 µm). Elle est cannelée et orientée **obliquement** par rapport à l’axe antennaire et courbée vers l’avant de l’insecte. Sa **base** s’inscrit dans une cavité circulaire bien délimitée. Son **apex** est arrondi et présente un pore. Au moins 10 sensilles de ce type ont été dénombrés, essentiellement sur l’antennomère apical de la **figure 58**. Leur **localisation** semble spécifique de la face ventrale de l’antennomère, et aucune n’est visible sur sa face dorsale (**Fig. 57**).

La présence d’un pore unique terminal supporte l’hypothèse d’une **fonction chimiotactile** pour ce type de sensille.

*** Sensille de type 6 (type a) (Fig. 64) :**

Il s'agit des sensilles placoides déjà bien étudiées chez *D. pulchellus* (Rojas-Rousse & Palevody, 1983). Leur position est **longitudinale** par rapport à l'axe antennaire, elles ont une forme elliptique en dôme légèrement bombé et inséré dans une cavité aux bords bien délimités. Leur dimension peut varier selon leur emplacement sur les antennomères mais elles font en moyenne **35 µm de long** et **4 µm de large**. Leur **paroi** porte de nombreux pores de petite taille. Le **nombre** de ces sensilles est proche de celui des types 1 ou 3. Au moins 9 sensilles placoides ont pu être dénombrées sur l'antennomère apical de la **figure 57**. Leur **localisation** semble être spécifiquement dorsale pour cet antennomère (**Fig. 57**) et elles sont absentes sur la face ventrale (**Fig. 58**).

La présence de nombreux pores de petite taille supporte l'hypothèse d'une **fonction chimiosensorielle** de type olfactif pour ce morphotype (Rojas-Rousse & Palevody, 1983).

*** Sensille de type 7 (type e) (Fig. 65) :**

Cette sensille est constituée d'une expansion cuticulaire d'environ **12 µm de long** à pointe effilée de 0,7 µm. Son **diamètre** relativement constant sur toute sa longueur est de 1 µm à mi-hauteur. Elle est courbée par rapport à l'axe de l'antenne et dirigée vers l'avant de l'insecte. Sa **base**, légèrement renflée, s'insère de façon décentrée, sur une sorte de membrane de jointure surélevée et située à l'intérieur d'une cavité circulaire. La **paroi externe** relativement lisse de cette sensille, est pourvue de nombreux petits pores. Le **nombre** de ces sensilles est faible. Seulement 4 ont pu être dénombrées sur l'antennomère apical de la **figure 57**. Leur **localisation** semble se résumer à la face dorsale de l'antennomère (**Fig. 57**).

La présence de nombreux pores peut nous permettre d'attribuer une **fonction chimiosensorielle** de type olfactif à ces sensilles.

*** Sensille de type 8 (type j et n) (Fig. 66) :**

Cette sensille est constituée d'un processus cuticulaire d'environ **14 µm de long**, relativement large à sa base et effilé jusqu'à son extrémité. Son **diamètre** est approximativement de 0,5 µm à mi-hauteur. Cannelée longitudinalement et courbée, elle s'insère **obliquement** par rapport à l'axe de l'antenne et est toujours dirigée vers l'avant de l'insecte. Sa **base** semble s'insérer de deux manières différentes : soit dans une cavité circulaire lorsqu'elle est située sur la face où se trouvent les sensilles de type 6 (**Fig. 57, 64a et 66a**), soit directement sur la cuticule pour la moitié de sa circonférence et plus profondément sous la

cuticule pour l'autre moitié lorsqu'elle se trouve située avec des sensilles de type 2 ou 3 (**Fig. 60a et b, 61a et 66b**). Sa paroi ne présente aucun pore. Le **nombre** de ces sensilles est important. Plus de 200 de ces sensilles ont pu être dénombrées sur l'antennomère apical (**Fig. 57**). Elles sont **uniformément réparties** sur **toute la surface** de celui-ci.

Ces caractéristiques morphologiques suggèrent que ce type de sensilles aurait une **fonction mécanoréceptrice**.

1-2 Le proctigère

Lors de la piqûre de l'hôte, le **proctigère** dévaginable de *D. pulchellus* entre en contact avec la chrysalide. C'est un organe non chitinisé du dernier segment abdominal à l'extrémité de laquelle débouche l'anus de l'insecte. Il est situé en position dorsale par rapport aux valves palpiformes qui entourent l'ovipositeur et peut être divisé en deux « bourrelets », l'un ventral, l'autre dorsal, entourant l'anus (**Fig. 67**). A sa base et disposée latéralement, se trouve une paire de **socii** claviformes, selon la terminologie empruntée à Bitsch (1979).

Le proctigère possède un certain nombre de sensilles, certaines étant spécifiques des socii.

*** Sensilles des socii (Fig. 68)**

Deux types de sensilles différant de par le mode d'insertion de leur base, soit dans une cavité (type a), soit sur une sorte de bulbe (type b) sont présents sur les socii. Ces sensilles dépourvues de pore sont proches du morphotype 8 décrit sur l'antenne.

Compte tenu de leurs caractéristiques morphologiques, ces sensilles auraient une **fonction mécanoréceptrice**.

*** Sensille du proctigère (Fig. 69)**

Cette sensille est constituée d'une protubérance cuticulaire en forme de bouton d'environ 0,8 µm de **haut** et 1,5 µm de **diamètre**. Elle s'inscrit au centre d'une collerette surélevée d'environ 5 µm de diamètre externe. Son extrémité présente un pore unique. Leur **nombre** sur le proctigère est de 12 chez la femelle et de 6 chez le mâle (observations sur 4 femelles et 3 mâles). Elles sont réparties en deux plages latérales identiques sur le bourrelet dorsal du proctigère (**Fig. 69**).

La présence d'un pore unique à leur extrémité terminale supporte l'hypothèse d'une **fonction** chimiotactile pour ce type de sensille.

2 - Etude ultrastructurale : observations en microscopie électronique à transmission

Ne pouvant avec certitude présumer d'une fonction sur la seule base d'informations morphologiques externes, des observations en microscopie électronique à transmission sur les sensilles de **type 2, 3, 4, 6 et 8** ont pu être réalisées.

Faute de coupes fines de bonne qualité, les sensilles de **type 1, 5 et 7** qui sont moins fréquentes et donc plus difficiles à obtenir n'ont pas été présentées.

* Sensille de type 2

Les **figures 70 à 73** représentent des coupes longitudinales de sensilles (coupe longitudinale et coupes transversales de l'antennomère apical). Sur la **figure 74**, il s'agit de différentes coupes de l'extrémité apicale de cette sensille.

Les intervalles entre les digitations de la région cuticulaire distale apparaissent comme autant de petites pores (**Fig. 70** vue générale et **74** vue détaillée), ouverts sur le milieu intrasensillaire. Celui-ci contient le prolongement dendritique d'au moins un neurone (noyau visible sur la **Fig. 72**). Dans la région basale une gaine cuticulaire (visible sur l'ensemble des figures) dense aux électrons entoure le dendrite contenant de nombreux neurotubules. Il peut s'agir du "fourreau scolopoïde, ou scolops" décrit dans la littérature pour les cellules chimiosensorielles (Seguy, 1967 ; Vinnikov, 1974).

Sous la cuticule, divers types cellulaires discernables par leur membrane plasmique sont visibles et entourent la cellule réceptrice. Il s'agirait des différentes cellules enveloppes internes. L'une d'entre elles se caractérise par un réseau important de réticulum endoplasmique témoignant d'une activité de synthèse (**Fig. 72**). Deux autres types cellulaires au moins sont présents. Ils se caractérisent par leur richesse en microvillosités, d'où probablement d'importants transports de molécules. Ces trois types de cellules enveloppes seraient les cellules thécogène, tormogène ou trichogène responsables de la sécrétion de la sensille proprement dite, de la membrane d'articulation, de la gaine cuticulaire et de la lymphe sensillaire (**Fig. 73**).

La membrane plasmique des types cellulaires à microvillosités, délimite des espaces extracellulaires riches en vésicules. Il pourrait s'agir d'espace contenant la lymphe sensillaire ou liqueur sensillaire.

La présence de prolongements dendritiques dans l'expansion cuticulaire et les nombreux pores à l'extrémité de cette sensille vont dans le sens d'une fonction

chimiosensorielle.

Un schéma d'ensemble de la structure de cette sensille de type 2 a pu être dégagé (**Fig. 75**).

* Sensille de type 3

Une vue générale de cette sensille en coupe est présentée **figure 71**. Les **figures 76** et **77** représentent des coupes longitudinales de cette sensille.

L'organisation anatomique de cette sensille se rapproche de celle du type précédent (**Fig. 71**, vue générale). On peut toutefois noter des différences : la présence de nombreuses dendrites caractérisée par un fort réseau de neurotubules et l'absence, semble-t-il, de gaine cuticulaire pour l'ensemble des dendrites (**Fig. 76**). La membrane de jointure présente dans la partie basale de la sensille et décrite lors des précédentes observations morphologiques semble de nature cuticulaire.

L'extrémité de la sensille est dentée comme celle de la sensille de type 2 et laisse apparaître de multiples ouvertures entre milieu intra- et extrasensillaire. Ces observations complètent les observations morphologiques qui nous faisaient plutôt penser à une succession de plis transversaux et continus à l'apex de la sensille (cf **Fig. 61d**, **Fig. 77**). Tout l'espace interne de l'expansion cuticulaire est rempli de ramifications dendritiques (**Fig. 77**).

Le seul noyau visible sur la coupe transversale doit être celui du neurone (**Fig. 76**). Il semble enveloppé par une cellule auxiliaire au moins, présente de part et d'autre des dendrites. Celle-ci est riche en réticulum endoplasmique et semble similaire à l'un des types de cellule décrit pour la précédente sensille.

Contrairement à nos premières hypothèses, cette sensille pourrait donc avoir une fonction chimiosensorielle ; ce qui demande à être confirmée.

En se basant sur les différentes coupes transversales et longitudinales obtenues, un schéma d'ensemble de la structure de cette sensille de type 3 a pu être dégagé (**Fig. 78**).

* Sensille de type 4

Deux coupes transversales de cette sensille sont présentées (**Fig. 79**)

Il s'agit de la sensille dite en forme de « bouchon de Champagne » (Lecomte *et al.*, 1990). L'extrémité cuticulaire de la sensille très dense aux électrons laisse apparaître des zones plus claires correspondant aux **sillons verticaux** signalés en morphologie. Ils sont **ouverts sur le milieu intérieur** (**Fig. 79a**). L'expansion cuticulaire semble parcourue par **une seule dendrite** qui plonge en profondeur jusqu'à un grand nombre de noyaux. Là encore, la dendrite

est entourée de **cellules auxiliaires** dont le cytoplasme est riche en réticulum endoplasmique (**Fig. 79b**). L'expansion cuticulaire semble, en périphérie de la dendrite, former un espace extracellulaire contenant probablement la liqueur sensillaire (**Fig. 79**).

Compte tenu de la présence d'au moins une dendrite et de plusieurs sillons correspondant vraisemblablement à des pores, une fonction chimiosensorielle probablement de type olfactif pourrait être attribuée à cette sensille.

Faute d'un nombre suffisant de coupes de bonne qualité de cette sensille, essentiellement dû à son nombre très réduit sur les antennes, aucun schéma d'ensemble n'a pu être dégagé pour cette sensille de type 4.

* **Sensille de type 6**

Cette sensille avait déjà fait l'objet d'une étude ultrastructurale (Rojas-Rousse & Palevody, 1983).

La structure cuticulaire externe comporte deux chambres, l'une supérieure renfermant les ramifications dendritiques, l'autre inférieure renfermant les prolongements des cellules enveloppes. Les deux chambres sont limitées par l'épaississement épicuticulaire formant deux bourrelets longitudinaux (**Fig. 80 ; Fig. 81** d'après Rojas-Rousse & Palevody, 1983). Les cellules sensillaires comprennent plusieurs neurones situés sous les cellules épidermiques et deux cellules gliales à fonction nutritive enveloppant respectivement les segments proximaux des dendrites et les axones. Elles comprennent également trois types de cellules enveloppes.

Compte tenu de la présence d'un nombre important de pores de petite taille et de nombreuses ramifications dendritiques, il s'agirait de sensilles olfactives.

* **Sensille de type 8**

Une coupe de cette sensille est présentée (**Fig. 82**). Cette sensille correspond au type de mécanorécepteur décrit par Keil (1998). Elle est caractérisée par une expansion cuticulaire en forme de soie à extrémité pointue sans pore. D'après la littérature, ces sensilles sont composées d'un neurone bipolaire dont l'axone est entouré d'une cellule gliale et trois cellules enveloppes (**Fig. 83** d'après Keil, 1998 ; **Fig. 82**). La partie fonctionnelle la plus importante du neurone consiste en un complexe de microtubules dans la pointe dendritique (**Fig. 82**).

3 - Premiers tests électrophysiologiques

Les enregistrements unitaires ont été réalisés tout d'abord sur les **sensilles de type 1, 2 et 3**, supposées être des sensilles chimiosensorielles gustatives d'après les études

morphologiques et ultrastructurales.

Deux solutions ont été testées :

- du NaCl 50 mM,
- la solution d'un lyophilisat de lavage de cocons à l'eau supplémentée en NaCl 50 mM.

4-1 Préambule aux tests électrophysiologiques

Afin de contrôler que les méthodes préparatives des extraits en NaCl ne perturbent pas le comportement d'acceptation des femelles *D. pulchellus*, celles-ci ont été observées en présence de leurres imprégnés par des lavages de cocons à l'eau ultrapure ou à l'eau +NaCl 50 mM. Pour chacune de ces 2 situations deux paramètres sont étudiés (**Fig. 84**) :

- la durée moyenne de contact / (femelle × min)
- le pourcentage de femelles ayant présenté un examen abdominal du cocon ou du leurre expérimental.

Les durées moyennes de contact / (femelle × min) en présence des leurres témoins (coton + 20 µl H₂O) sont très faibles (< 0.8 sec) et les femelles ne réalisent aucun examen abdominal. Les valeurs obtenues ne sont donc pas représentées sur le graphique.

Les valeurs moyennes de ces deux critères comportementaux ne présentent pas de différences significatives pour les leurres imprégnés par des lavages de cocons à l'eau ultrapure ou à l'eau + NaCl 50 mM. Ces résultats indiquent que le NaCl à une concentration de 50 mM ne modifie pas significativement l'activité de l'extrait et ne perturbe pas le comportement d'acceptation des femelles de *D. pulchellus*. Cet extrait actif sera donc utilisé à cette même concentration en électrophysiologie.

4-2 Tests électrophysiologiques

Les premiers résultats des enregistrements unitaires sont présentés **figure 85**. Ces résultats ont été obtenus sur trois sensilles de chaque type, sur une même femelle de *D. pulchellus*. Aucune des sensilles ne fournit une réponse (absence de potentiels d'action) à la solution de NaCl 50 mM ; le tracé obtenu ne correspond qu'à la résistance d'une sensille, qualifié de "bruit de fond" (**Fig. 85c**). Par contre, les enregistrements unitaires sur les sensilles de **type 1** et **2** avec l'électrode contenant l'extrait de cocons génèrent une série de potentiels d'action (**Fig. 85a et 85b**). Après isolement des potentiels d'action du bruit de fond (**Fig. 86**), il est possible de distinguer des pics d'amplitudes différentes : type a (petite amplitude), type b (amplitude supérieure) ce qui suggère l'existence de 2 cellules réceptrices différentes.

Aucune des sensilles de **type 3** n'a présenté de réponses à l'extrait actif. Cependant, un contact électrique s'est établi, confortant la présence de pores. Dans l'affirmative d'une fonction chimiosensorielle de contact pour cette sensille, ce résultat semble suggérer l'absence de cellule réceptrice spécifique de la kairomone.

Le nombre total de potentiels d'action (PA) générés pendant la même période est plus important pour la sensille de **type 2** que pour la sensille de **type 1** (pour une durée de stimulation de 7,2 s : 37 PA pour la sensille de type 1, plus de 100 pour la sensille de type 2), ce qui traduit une différence d'activité.

↳ Les résultats obtenus lors de ces premiers tests électrophysiologiques nous permettent de **conclure à une fonction chimiotactile pour les sensilles de types 1 et 2. Compte tenu de sa réponse de forte amplitude à l'extrait actif, la sensille de type 2 pourrait être le récepteur clef du signal kairomonal lors du contact des antennes avec le cocon.**

La fonction de la sensille de type 3 ne peut pas être déduite de cette étude, bien qu'une fonction chimioréceptrice soit très fortement probable.

D) Discussion

Morphologie, ultrastructure et fonction des sensilles de l'antenne

Les différents types sensillaires rencontrés sur les antennes de *D. pulchellus*, ont été décrits de façon plus précise que dans une étude précédente (Lecomte *et al.*, 1990).

La présence ou l'absence de pores, ainsi que la structure particulière de l'apex de certaines sensilles, telles les digitations, nous ont conduit à une première classification basée sur leur morphologie d'où a été déduite leur fonction potentielle. Cette dernière a dans la mesure du possible été confortée par l'étude ultrastructurale : sensilles mécanoréceptrices, sensilles olfactives et sensilles potentiellement chimiotactiles. Cette classification a permis de trouver des **similitudes** avec les sensilles d'autres insectes, chez lesquels leur description est généralement faite en référence à leur forme externe (sensille trichoïde, basiconique, chétiforme, campaniforme, coeloconique et placoïde) ou la présence/absence de pores (Altner, 1977 ; Zacharuk, 1980, 1985).

Conclure à des homologies fonctionnelles reste cependant difficile et incertain. Ainsi, les sensilles placoïdes (**type 6**) ont fait l'objet de beaucoup d'études morphologiques et fonctionnelles, en particulier chez les Ichneumonidea (Richerson *et al.*, 1972 ; Borden *et al.*,

1978 ; Barlin *et al.*, 1981 ; Rojas-Rousse & Palevody, 1983; Stepper *et al.*, 1983). Un rôle olfactif leur est communément attribuée. Cependant, chez l'ichneumonidé *Coeloides brunneri*, ces sensilles seraient, selon Richerson et Borden (1972), des récepteurs sensibles aux infrarouges.

Dans notre étude ultrastructurale, la présence de dendrites dans les expansions cuticulaires des sensilles de **types 2, 3 et 4** permet de supposer une fonction chimiosensorielle (olfaction ou gustation). L'étude électrophysiologique associée permet de conclure à une fonction chimiotactile des sensilles de **types 1 et 2**. Par contre, celle des sensilles de **type 3** ne peut être déduite avec certitude. Des sensilles chimiotactiles à extrémité apparemment multipore comme pour les sensilles de types 2 et 3 ont déjà été décrites chez l'Hyménoptère, *Trissolcus basalis*. Celles-ci sont associées à des glandes dont les sécrétions dissolveraient les infochimiques non volatiles de la surface d'un hôte potentiel ou d'un partenaire sexuel, favorisant ainsi leur détection (Isidoro *et al.*, 1996).

Les sensilles de **type 5**, morphologiquement similaires à celles du type 1 ont probablement la même fonction chimiotactile mais elle reste à démontrer. Les sensilles de **type 7**, multipores, ont exclusivement été décrites comme sensilles olfactives (Kaissling, 1987). Cette fonction a été suggérée chez des Lépidoptères (Mochizuki *et al.*, 1992), des Coléoptères (Merivee *et al.*, 1998), et des Hyménoptères (Amornsak *et al.*, 1998). Enfin, les sensilles de **type 8**, les plus largement représentées sur l'antenne de *D. pulchellus* sont des sensilles mécanoréceptrices sans pore (Keil & Steinbrecht, 1984 ; Keil, 1997, 1998).

L'**estimation du nombre** de sensilles présentes sur l'antennomère apical est très voisine de celle faite lors d'une étude précédente (Lecomte *et al.*, 1990). Les variations du nombre des sensilles observées laissent penser qu'il existe des différences interindividuelles. Par exemple, le nombre des sensilles de **type 6** ou les placoides chez les femelles, est de 9 dans notre étude alors qu'il n'était que de 4 dans la précédente étude (Lecomte *et al.*, 1990).

La **localisation** des différents types sensillaires effectuée sur la surface de l'antennomère est en accord avec celle déjà établie par Lecomte *et al.* (1990). Des types sensillaires n'apparaissent que sur un profil de l'antennomère : les sensilles de **type 2** à digitations (correspondant aux sensilles **g** décrites par ces auteurs) et de **type 3** (correspondant aux sensilles **b**) localisées uniquement sur la **face ventrale** de cet antennomère, ou celles de **type 6** (correspondant aux sensilles **a**) localisées uniquement sur la **face dorsale**.

Il existe également des différences liées au sexe. Les sensilles de **types 2 et 3 existent uniquement chez les femelles** de *D. pulchellus* (Lecomte *et al.*, 1990).

↳ Ce résultat va dans le sens de l'hypothèse **du rôle de ces 2 types de sensilles dans la**

perception des kairomones induisant le comportement d'acceptation de l'hôte par la femelle.

Entre notre étude et celle de Lecomte *et al.* (1990), une différence d'interprétation quant à la sensille de **type 8** existe. Sur la base des différences d'insertion de cette sensille dans la cuticule, ces auteurs ont considéré qu'il s'agissait de sensilles bien distinctes (nommées sensilles **j** et **n**) ayant, selon eux, des fonctions différentes. La sensille de type **j**, sans pore, serait mécanoréceptrice. Celle de type **n** exuderait des gouttelettes et posséderait donc des pores. Notre étude montre au contraire l'absence de pore sur ces deux variantes sensillaires. Ainsi, les avons nous placées dans une seule et même catégorie. L'"assise" en continuité avec la cuticule caractérise les sensilles de la face ventrale alors que les sensilles de la face dorsale sont simplement logées dans une dépression tégumentaire. Cette différence d'insertion basale pourrait simplement être dûe aux contraintes mécaniques différentes appliquées sur les deux variantes de la sensille de type 8. Les sensilles de la face ventrale étant les plus susceptibles d'entrer en contact avec un substrat, possèdent une assise qui apparaît comme plus "solide".

Rôle probable des sensilles de types 1, 2 et 3 dans le comportement d'acceptation

Les caractéristiques comportementales et l'identification d'une kairomone de nature protéique (Chapitre I et II) ont suggéré que la perception de ce stimulus s'effectuait au niveau de l'antenne, par contact. La richesse et la diversité des sensilles potentiellement chimiosensorielles des antennes de *D. pulchellus* confortent cette hypothèse, également soutenue par :

- les **études ultrastructurales**. L'ultrastructure des sensilles de **types 2 et 3** est à rapprocher de celle des sensilles chimiotactiles unipores décrites dans d'autres travaux (Vinnikov, 1974). La présence d'une extrémité apicale multipore ne semble pas aller à l'encontre d'une fonction chimiosensorielle de contact (Isodoro *et al.*, 1996),

- les **enregistrements électrophysiologiques**. L'extrait actif en comportement, testé en électrophysiologie, a généré des potentiels d'action chez les sensilles de **types 1 et 2**. Au moins une partie de la perception des substances de l'extrait aqueux de lavage de cocons est donc bien réalisée à ce niveau.

Le rôle important de sensilles antennaires chimiotactiles dans le processus de reconnaissance a déjà été mis en évidence chez *Cheiloneurus noxius* (Encyrtidae) (Weseloh, 1972) et *Trissolcus basalis* (Scelionidae) (Bin *et al.*, 1989 ; Isodoro *et al.*, 1996). Chez *D. pulchellus* comme chez *Trissolcus basalis*, la **présence** de sensilles gustatives (types 2 et 3) **exclusivement chez les femelles** conforte l'hypothèse de leur intervention dans le comportement d'acceptation de l'hôte qui n'existe que chez la femelle.

Une autre caractéristique importante concerne la **localisation** des sensilles de **type 2 et 3**. Elles sont toutes deux localisées sur la face ventrale de l'antenne et plus particulièrement de l'antennomère 12 à 23 (Lecomte *et al.*, 1990). Ceci est en accord avec les observations comportementales : lors des contacts des antennes avec le cocon les antennomères distaux interviennent presque exclusivement (Chapitre I, section 3-1). Cette localisation bien précise des organes sensoriels gustatifs sur une face de l'antenne a déjà été observée chez de nombreux parasitoïdes et notamment chez *T. basalis* (Isodoro *et al.*, 1996). Ces auteurs ont pu distinguer une zone particulière appelée "touch and taste area", aire associée à une ou plusieurs sensilles gustatives qui pour "goûter", donc percevoir le composé actif, doivent tout d'abord le "toucher". Cette aire particulière se retrouve chez d'autres espèces de la même famille (Isodoro *et al.*, 1996).

Le **nombre** moyen des sensilles de **type 2** (47 sensilles par antennomère) est beaucoup plus important que celui de **type 3** (13 sensilles) (Lecomte *et al.*, 1990). L'obtention de potentiels d'action plus nombreux pour le type 2 que pour le type 1 en réponse à l'extrait actif en comportement, va dans le sens de **la prépondérance du rôle des sensilles de type 2 dans la perception du signal kairomonal induisant le comportement d'acceptation de l'hôte**.

Le proctigère

Dans la littérature, le contact entre le proctigère et l'hôte lors de la ponte chez les parasitoïdes n'a jamais été décrit. Compte tenu de notre connaissance de l'insecte, deux rôles sont cependant envisageables chez *D. pulchellus* :

- un **rôle direct** très probable, de perception gustative lors du contact avec la chrysalide, puisque le proctigère porte des sensilles campaniformes unipores (**type 9**). Ce type de sensilles assez commun, sans pore cependant, se rencontre par exemple sur les ovipositeurs de certains parasitoïdes (Le Ralec, 1991). Ces sensilles seraient mécanoréceptrices.

Ce type de comportement a pu être observé chez d'autres insectes. Chez les

Lépidoptères, il est fréquent que les femelles balayent la surface du végétal de leur extrémité abdominale dévaginée. Les femelles d'*Ostrinia nubilalis* ou d'*A. assectella* présentent un tel comportement, au cours duquel des stimuli issus du végétal peuvent stimuler la ponte (Garnier-Geoffroy *et al.*, 1996, Thibout & Auger, 1996).

- un **rôle indirect** plus hypothétique, dans la transmission des virus commensaux installés dans le tube digestif des femelles. Ces virus transmis lors de la ponte facilitent la réussite parasitaire par dérèglement du système immunitaire de l'hôte et lyse de la plupart de ses tissus (Rabouille *et al.*, 1994).

Perception de signaux chimiques

La littérature offre un large panel d'études dans lesquelles **des composés chimiques spécifiques** agissent comme signal de déclenchement de divers comportements chez les insectes (Vinson, 1991).

Les études électrophysiologiques conduites sur les sensilles chimiosensorielles tactiles d'insectes ont dans la plupart des cas permis d'identifier des **récepteurs cellulaires** aux sels (cations) ou aux hydrates de carbone (Städler, 1984). *Tabanus nigrovittatus* (Diptera : Tabanidae) est ainsi sensible à trois sucres (fructose, sucrose et glucose) (Stoffolano *et al.*, 1990). Les tests électrophysiologiques ayant permis l'identification des **récepteurs à des stimuli d'oviposition** ont surtout été réalisés chez les Lépidoptères et les Diptères, insectes non parasitoïdes. Des récepteurs tarsaux chez les femelles de *Pieris brassicae* (Ma & Schoonhoven, 1973), de *Pieris napi* (Du *et al.*, 1995) et de *Pieris rapae* (Städler *et al.*, 1995) sont sensibles à des glucosinolates et pour *Pieris rapae* également à des cardélonides issus de leur plante-hôte. D'autres résultats électrophysiologiques chez *Danaus plexippus* suggèrent que la sélection de la plante hôte est liée à la perception d'informations chimiques par des récepteurs tarsaux et antennaires (Baur *et al.*, 1998). D'autre part, un allélochimique spécifique du chou s'est avéré stimuler le neurone unique des sensilles du cinquième tarsomère du Diptère *Delia radicum* (Roessingh *et al.*, 1997).

L'une des caractéristiques de ces composés identifiés reste la présence de sucres dans la molécule perçue.

Il semble que certains neurones puissent répondre à des composés chimiques de nature différente (Blaney, 1975). Ainsi, une cellule réceptrice aux sucres est également sensible à quelques acides aminés chez les Diptères *Boettcherisca peregrina* et *P. regina* (Shiraishi & Kuwabara, 1970), et *Neobelliera (=Sarcophaga) bullata* (Albert *et al.*, 1997). Par ailleurs,

certains auteurs ont identifié chez la larve de *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera : Tortricidae) un type de sensilles sensible à des acides aminés (Panzuto & Albert, 1998). Par contre, l'intervention de protéines comme signal kairomonal a été rarement rapportée (Weseloh, 1977 ; Strand & Vinson, 1983a).

↳ Il apparaît rapidement que la grande majorité des études correspond à la perception de signaux chimiques chez des Diptères ou des Lépidoptères phytophages, **rarement chez des Hyménoptères parasitoïdes**. Ensuite, notre étude chez *D. pulchellus* semble bien être l'un des rares exemples illustrant avec précision **la perception d'une kairomone de nature protéique**.

Des récepteurs spécifiques aux protéines ne semblent pas avoir été très souvent identifiés chez les insectes (Städler, 1984). Il existe cependant des sensilles répondant à l'hémoglobine chez *Phormia regina* (Wallis, 1961), ainsi qu'à l'albumine chez *Musca domestica* (Gritsai, 1978).

↳ Dans notre étude chez *D. pulchellus*, non seulement l'**organe-cible**, les antennes, a été **identifié**, mais aussi **les** (ou au moins certains des) **récepteurs spécifiques des protéines kairomonales ont été localisés**. Il s'agit des sensilles de type 1 et 2 susceptibles de générer des potentiels d'actions, voire même probablement le seul type 2 présent chez les femelles uniquement. Il resterait maintenant à étudier plus avant la perception et le codage de la spécificité sensorielle.

Chez les Hyménoptères parasitoïdes, l'exploitation d'un hôte pour assurer le développement de sa descendance est vitale. Cette exploitation est sous l'influence de nombreux facteurs qui inclut en plus de l'environnement, aussi bien la biologie et le stade de l'hôte attaqué, que les stratégies évolutives et les comportements des parasitoïdes, des hôtes ou des compétiteurs. On peut ainsi citer : les hôtes fixés ou en mouvement, les hôtes dispersés ou groupés mais aussi le mode endoparasitoïde ou ectoparasitoïde, parasitoïde généraliste ou spécialiste, parasitoïde solitaire ou grégaire (Vinson, 1985 ; Quicke, 1997). L'exploitation s'appuie sur la perception d'un ensemble de signaux, physiques et / ou chimiques, circulant entre la plante, l'hôte et ses parasitoïdes (Schmidt, 1991 ; Vinson, 1991 ; Vet & Dicke, 1992).

L'histoire individuelle de *D. pulchellus*, espèce endoparasitoïde spécialiste, est donc étroitement liée à son hôte *A. assectella*. Cette liaison stricte s'exprime aussi bien par la stratégie d'exploitation de l'hôte par l'Ichneumonidae (Labeyrie, 1960) que par la compatibilité immunitaire entre les deux individus (Bigot *et al.*, 1997).

L'ensemble de ce travail a permis de confirmer l'importance des composés chimiques du cocon de l'hôte pour son identification (ou acceptation) par le parasitoïde. Il a permis d'identifier **deux polypeptides** du cocon de soie d'*A. assectella*, B1 et B2, dont l'un au moins agit comme signal kairomonal pour *D. pulchellus*. Ce travail fait parti des rares cas déjà décrits où un composé de nature protéique intervient dans des relations interspécifiques entre hôte-parasitoïde (Strand & Vinson, 1983a, b ; Nordlund *et al.*, 1987).

L'utilisation de protéines comme signal dans les relations inter- et intraspécifiques chez les insectes autres que des parasitoïdes est également peu rapportée dans la littérature. Il a été ainsi montré que les glandes tergaux des blattes produisent trois catégories de sécrétions protéiques dont l'une, conjointement avec d'autres composés phéromonaux, pourrait intervenir lors de la reconnaissance par chimioréception de contact entre partenaires (Brossut *et al.*, 1998). Par ailleurs, les hydrocarbures cuticulaires sont plus généralement décrits comme stimuli de contact agissant dans les interactions interindividuels (Howard, 1992, 1993 ; Smith & Breed, 1995 ; Rivault *et al.*, 1998 ; Singer, 1998).

Les compositions en acides aminés des différents polypeptides majoritaires isolés du cocon d'*A. assectella*, dont les deux polypeptides B1 et B2 et la comparaison avec la composition des protéines de soie d'autres Lépidoptères (Fournier, 1979 ; Zurovec *et al.*, 1979, Freddi *et al.*, 1993) nous suggèrent que des polypeptides peuvent agir comme signal de reconnaissance spécifique.

Les résultats concernant les microséquences des acides aminés NH₂ terminaux et la

composition en acides aminés pour chacun des deux polypeptides nous indiquent qu'il s'agit bien de deux polypeptides différents dont l'un au moins peut agir comme signal kairomonal. L'extraction de ces deux polypeptides natifs et l'étude de leur polarité nous ont conduit à admettre qu'ils sont fortement hydrophiles (Chapitre II). Pourtant après purification par électrophorèse, chacun d'entre eux apparaît comme beaucoup plus hydrophobes. Ainsi en CLHP, les pics polypeptidiques n'apparaissent qu'en fin de chromatographie à un pourcentage d'acétonitrile élevé, supérieur à 75 %. Ce résultat obtenu pour chacun des polypeptides dénaturés pourrait s'expliquer par la forme native des deux polypeptides. En effet, la proportion de cystéine pour les deux polypeptides B1 et B2 natifs est assez importante, environ 3 %. Cet acide aminé pourrait intervenir dans l'établissement de ponts disulfures entre les 2 chaînes polypeptidiques. Il n'y aurait donc qu'une unique protéine constituée des 2 polypeptides différents, ce qui de par sa structure en condition native et de par la présence de glycosylations sur les deux chaînes lui conférerait un caractère hydrophile plus important.

Les résultats obtenus ne permettent cependant pas de savoir si les 2 polypeptides interviennent de manière liée ou isolée dans le signal kairomonal. Les fragments polypeptidiques B1 ou B2 pourraient avoir suffisamment d'informations pour agir comme stimulus. La présence de soufre dans le signal kairomonal pourrait être l'une des caractéristiques de spécificité d'une telle molécule. Ceci peut-il être mis en parallèle avec l'étroite association qui s'est établie entre ce parasitoïde, son hôte et également sa plante ? Le genre *Allium* est caractérisé par l'émission de molécules volatiles soufrées. Celles-ci interviennent notamment dans la phase de localisation de l'habitat par les femelles parasitoïdes (Lecomte & Thibout, 1984 a et b).

L'utilisation de polypeptides natifs partiellement digérés par des endopeptidases spécifiques permettraient de tester une telle hypothèse.

Indépendamment de cette hypothèse, le rôle de la plante dans l'interaction entre ces deux espèces d'insectes ne peut être écarté. Les études tenant compte du système tritrophique, plante/hôte/parasitoïde, ont ainsi montré l'influence significative de la plante dans le processus de sélection de l'hôte. Pour exemple, on peut rappeler que la sélection de l'habitat et du microhabitat de l'hôte par le parasitoïde apparaît généralement en réponse à des signaux de la plante. De plus, à travers l'hôte, la plante peut affecter le succès du développement du parasitoïde et ainsi déterminer sa valeur sélective. On peut donc estimer que la plante hôte agit à tous les niveaux du processus de sélection et peut-être lors de la phase d'acceptation.

Certaines études ultérieures sur les comportements du parasitoïde devront donc en tenir compte.

Les recherches sur la chimioréception ont été largement dominées par les études de signaux volatils, laissant partiellement de côté la chimioréception de contact ou « gustation ». Ce n'est que récemment que le rôle des composés chimiques non-volatils, plus spécifiquement dans la prise alimentaire ou le rapprochement des sexes, a reçu une plus grande attention (Städler, 1984). En conséquence, peu de cellules réceptrices ont été caractérisées et pour la majorité d'entre-elles, leur sensibilité concerne différents composés chimiques de source végétale inducteurs des comportements de prise de nourriture ou de ponte chez des phytophages (Städler, 1984).

Nos expériences d'électrophysiologie ont démontré l'existence de sensilles chimioréceptrices de contact sur l'antenne des femelles de *D. pulchellus* possédant des cellules sensibles aux composés d'un extrait de cocons actif en comportement. Il s'agit, à ma connaissance, du seul cas montrant la sensibilité de cellules réceptrices d'un parasitoïde à des composés issus de son hôte et "contrôlant" son comportement d'acceptation.

La confirmation de la sensibilité de ces cellules à l'un au moins des 2 polypeptides B1 et B2, présent dans l'extrait de lavage de cocons, offre des perspectives intéressantes à plusieurs niveaux. Ces différentes études nécessiteront la production de ces polypeptides en forte quantité. Ce problème pourrait être résolu en exprimant les gènes en bactéries, bien sûr, une fois le problème du clonage des gènes résolu.

Au niveau comportemental :

La forte hydrosolubilité semble être l'une des conditions importante à remplir pour la perception. Chez *D. pulchellus*, la kairomone native, de nature polypeptidique, possède cette caractéristique en milieu aqueux. Pourtant, la chimioréception de contact s'effectue sur la surface du cocon sec, qui est donc basiquement différent de la perception de solutions aqueuses. Cette constatation n'est pas nouvelle chez les insectes. Städler (1984) souligne que les contacts chimiosensoriels des phytophages avec la surface de la plante hôte non endommagée, semblent essentiels et que la chimioréception de contact s'effectue sur la surface sèche. Il se pose alors la question de leur perception.

D'autres auteurs suggèrent l'intervention de glandes sécrétrices associées aux sensilles chimiotactiles qui par leurs sécrétions permettrait, la dissolution des molécules sapides non volatiles de la surface de l'hôte et leur détection (Isodoro *et al.*, 1996).

De telles glandes sont elles présentes sur l'antenne des femelles de *D. pulchellus* ? Si

oui, interviennent-elles lors du comportement d'acceptation ? Actuellement, sur l'ensemble des coupes analysées en microscopie électronique à transmission, aucune glande de ce type n'a été observée.

Au niveau mécanistique sensorielle :

La perception sensorielle du signal kairomonal de *D. pulchellus* se traduit par une interaction entre le stimulus de nature protéique provenant du milieu externe et les récepteurs des dendrites. L'information, née au niveau de cette interaction du fait de la reconnaissance probable de forme des stimuli exercés par les récepteurs, est traduite en « sensation » grâce au codage nerveux.

Une étape ultérieure de notre étude, pourrait donc être de caractériser ces récepteurs. Pour cela un marquage des polypeptides devrait permettre l'identification des sites de perception afin de comprendre les mécanismes de base de la réception de telles molécules. Il permettrait notamment d'étudier leur spécificité vis à vis du signal. D'autre part, l'existence de protéines de transport dans la liqueur sensillaire pourrait être "statuée" et permettrait d'établir des analogies avec le système olfactif.

Au niveau évolutif :

L'identification moléculaire précise des gènes codant pour les 2 polypeptides du signal kairomonal permettrait de rechercher les homologues éventuelles avec d'autres gènes de soie déjà connus tant chez les Lépidoptères que chez les Arachnides. Elle permettrait d'identifier les motifs, s'ils existent, indispensables à la structure des fils de soie. Elle permettrait peut-être de conclure au rôle premier de ces polypeptides.



Bibliographie

- Albert, P. J., Banga, N. & Dolzan, E.** (1997). Behavioural and gustatory responses of females *Neobellieria* (= *Sarcophaga*) *bullata* to sucrose and amino-acids. *Physiological Entomology* **22**: 1-5.
- Alborn, H. T., Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H.** (1995). Host-specific recognition kairomone for the parasitoid *Microplitis croceipes* (Cresson). *Journal of Chemical Ecology* **21**(11): 1697-1708.
- Ali, M. F. & Morgan, E. D.** (1990). Chemical communication in insect communities: A guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. *Biological Review* **65**: 227-247.
- Alrouz, H. & Thibout, E.** (1988). Premières observations sur le comportement alimentaire des larves de la teigne du poireau *Acrolepiopsis assectella*, rôle des *Allium*. *Acta Oecologica, Oecologia applicata* **9**: 261-273.
- Altner, H.** (1977). Insect sensillum specificity and structure: an approach to a new typology. Olfaction and Taste VI. Paris, pp. 295-302.
- Altner, H. & Prillinger, L.** (1980). Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo- and hygroreceptors and its functional significance. *International Review of Cytology* **67**: 69-139.
- Altner, H. & Loftus, R.** (1985). Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Annual Review of Entomology* **30**: 273-295.
- Ambriz, S. J., Strand, M. R. & Burkholder, W. E.** (1996). Behavioral response of the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Forst) (Hymenoptera: Pteromalidae) to Extracts from cocoons of *Lasioderma serricorne* Fab. (Coleoptera: Anobiidae) and their effects on subsequent oviposition responses." *Biological Control* **6**: 51-56.
- Amornsak, W., Cribb, B., & Gordh, G.** (1998). External morphology of antennal sensilla of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Insect Morphology & Embryology* **27**(2): 67-82.
- Arnault, C.** (1982). Conséquences de l'alimentation artificielle sur le développement larvaire de la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **32**: 116-122.
- Arthur, A. P., Hegdekar, B. M. & Rollins, L.** (1969). Component of the host haemolymph that induces oviposition in a parasitic insect. *Nature* **223**: 966-967.
- Arthur, A. P., Hegdekar, B. M. & Batsch, W. W.** (1972). A chemically defined synthetic medium that induces oviposition in the parasite *Itopectis conquisitor*. *Canadian Entomologist* **104**: 1251-1258.
- Arthur, A. P.** (1981). Host acceptance by parasitoids. Semiochemicals: Their role in pest control. D. A. J. Nordlung, R.L. & Lewis, W. J. New York, John Wiley and Sons.
- Asano, Y. & Sinohara, H.** (1968). Amino sugars in various silk fibroins. *Naturwissenschaften*

55: 345.

- Askew, R. R.** (1971). Parasitic insects. Heinemann (Ed). Educational books Ltd, London, 316 pp.
- Askew, R. R. & Shaw, M. R.** (1986). Parasitoid communities: Their size, structure and development. In: Insect parasitoids. Waage, J.K. & D., Greathead (Eds). Academic press, London, pp. 225-259.
- Auger, J., Lecomte, C., Paris, J. & Thibout, E.** (1989). Identification of leek-moth and diamondback-moth frass volatiles that stimulate parasitoid, *Diadromus pulchellus*. *Journal of Chemical Ecology* **15**(4): 1391-1398.
- Auger, J., Mellouki, F., Vannereau, A., Boscher, J., Cosson, L. & Mandon, N.** (1993). Analysis of *Allium* sulfur amino acids by HPLC after derivatization. *Chromatographia* **36**: 347-350.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingstone, R.E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K.** (1990). Current protocols in molecular biology, vol 1. Greene Publishing & Wiley intersciences, New York.
- Bai, B. & Mackauer, M.** (1990). Host discrimination by the aphid parasitoid *Aphelinus asychis*: when superparasitism is not adaptive. *Canadian Entomologist* **122**: 363-372.
- Balachowsky, A. S.** (1951). La lutte contre les insectes. Principes - méthodes - applications. Payot, Paris.
- Barlin, M. R., Vinson, S. B. & Piper, G. L.** (1981). Ultrastructure of the antennal sensilla of the cockroach-egg parasitoid, *Tetrastichus hagenowii*. *Journal of Morphology* **168**: 97-108.
- Battaglia, D., Pennacchio, F., Marincola, G. & Tranfaglia, A.** (1993). Cornicle secretion of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) as a contact kairomone for the parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology* **90**: 423-428.
- Baur, R., Haribal, M., Renwick, J. A. A. & Städler, E.** (1998). Contact chemoreception related to host selection and oviposition behaviour in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *Physiological Entomology* **23**: 7-19.
- Beckwitt, R., Arcidiacono, S. & Stote, R.** (1998). Evolution of repetitive proteins: Spider silks from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 121-130.
- Bekkaoui, A.** (1992). Rôle des stimuli chimiques de contact dans la reconnaissance des chrysalides-hôtes par *Diadromus pulchellus* wsm. (Hymenoptera), parasitoïde du phytophage *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera). Thèse de Doctorat, Université de Tours, 95 pages.
- Bekkaoui, A. & Thibout, E.** (1992). Rôle de substances cuticulaires non volatiles d'*Acrolepiopsis assectella* (Lep. : Hyponomeutoidea) dans la reconnaissance de l'hôte par les parasitoïdes *Diadromus pulchellus* et *D. collaris* (Hym. : Ichneumonidae). *Entomophaga*

37(4): 627-639.

- Bekkaoui, A. & Thibout, E.** (1993). Role of the cocoon of *Acrolepiopsis assectella* (Lep., Hyponomeutidae) in host recognition by the parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hym., Ichneumonidae). *Entomophaga* **38**(1): 101-113.
- Bénédet, F., Bigot, Y., Renault, S., Pouzat, J. & Thibout, E.** (1999). Polypeptides of *Acrolepiopsis assectella* cocoon (Lepidoptera: Yponomeutoidea): an external host-acceptance kairomone for the parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Physiology* **45**, 375-384.
- Bénédet, F., Bigot, Y., Renault, S., Pouzat, J. & Thibout, E.** Identification et perception des stimulus utilisés par l'endoparasitoïde *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae) lors de l'acceptation de l'hôte. *Annales de la Société Entomologique de France*. Sous presse
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A. & Tarvin, T. L.** (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography* **336**(1): 93-104.
- Bigot, Y., Rabouille, A., Sizaret, P. Y., Hamelin, M.-H. & Periquet, G.** (1997). Particule and genomic characteristics of a new member of the Ascoviridae: *Diadromus pulchellus* Ascovirus. *Journal of General Virology* **78**: 1139-1147.
- Bin, F., Colazza, S., Isidoro, N., Solinas, M. & Vinson, S. B.** (1989). Antennal chemosensilla and glands, and their possible meaning in the reproductive behaviour of *Trissolcus basalus* (Woll.) (Hym.: Scelionidae). *Entomologica* **XXIV**: 32-95.
- Bin, F., Vinson, S. B., Strand, M. R., Colazza, S. & Jones, W. A.** (1993). Source of an egg kairomone for *Trissolcus basalus*, a parasitoid of *Nezara viridula*. *Physiological Entomology* **18**: 7-15.
- Bitsch, I.** (1979). Morphologie abdominale des insectes. In : *Traité de zoologie*, tome VIII, fascicule II. Grassé, P. P. (Ed.). Masson, Paris.
- Blaney, W. M.** (1975). Behavioural and electrophysiological studies of taste discrimination by the maxillary palps of larvae of *Locusta migratoria* (L.). *Journal of Experimental Biology* **62**(3): 555-569.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J.** (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bogenschütz, H.** (1978). Movements of antennae in host-finding females of ichneumonid species *Coccygomimus turionellae*. *Entomolgy German* **4**: 122-132.
- Borden, J. H., Chong, I. & Rose, A.** (1978). Morphology of the elongate placoid sensillum on the antenna of *Itoplectis conquisitor*. *Annals of the Entomological Society of America* **71**: 223-227.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J.** (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8**: 93-99.

- Brossut, R., Korchi, D., Abed, D., Farine, J.-P., Ntari, M., Everaerts & Krzych, C.** (1997). Sécrétion protéiques et communication chimique chez les blattes. *XII^{ème} colloque physiologie de l'insecte, Nice*.
- Brown, W. L., Eisner, JR. T. & Whittaker, R. H.** (1970). Allomones and kairomones: transpecific chemical messengers. *Bioscience* **20**: 21-22.
- Carton, Y.** (1974). Biologie de *Pimpla instigator* (Ichneumonidae: Pimplinae). III. Analyse expérimentale du processus de reconnaissance de l'hôte-chrysalide. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **17**: 265-278.
- Case, S. T., Cox, C., Bell, W. C., Hoffman, R. T., Martin, J. & Hamilton, R.** (1997). Extraordinary conservation of cysteines among homologous *Chironomus* silk proteins sp185 and sp220. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 452-462.
- Charnov, E. L.** (1976). Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theoretical Population Biology* **9**: 129-136.
- Chevillard, M., Couble, P. & Prudhomme, J.-C.** (1986). Complete nucleotide sequence of the gene encoding the *Bombyx mori* silk protein P25 and predicted amino acid sequence of the protein. *Nucleic Acids Research* **14(15)**: 6341-6342.
- Chirgwin, J. M., Pzybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.** (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299.
- Clément, S. L., Rubink, W. L. & McCartney, D. A.** (1986). Larviposition response of *Bonnetia compta* (Dipt.: Tachinidae) to a kairomone of *Agrotis ipsilon* (Lep.: Noctuidae). *Entomophaga* **31(1)**: 277-284.
- Corbet, S. A.** (1971). Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella*, contains an epideictic pheromone and elicits oviposition movements in a Hymenopteran parasite." *Nature* **232**: 481-484.
- Couple, P., Moine, A., Garel, A. & Prudhomme, J. C.** (1983). Developmental variations of a non-fibroin mRNA encoding for a low molecular weight silk protein. *Developmental Biology* **97**: 398-407.
- Couple, P., Michaille, J.-J., Garel, A., Couble, M.-L. & Prudhomme, J.-C.** (1987). Developmental Switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silk gland. *Developmental Biology* **124**: 431-440.
- Craig, C. L.** (1997). Evolution of arthropod silk. *Annual Review of Entomologie* **42**: 231-267.
- DeBach, P.** (1944). Environmental contamination by an insect parasite and the effect on host selection. *Annals of the Entomological Society of America* **37**: 70-74.
- DeBach, P.** (1964). *Biological Control of Insect Pests and Weeds*. Reinhold, New York.
- DeKramer, J. J. & Hemberger, J.** (1987). The neurobiology of Pheromone reception. In:

Pheromone Biochemistry. Prestwich, G. D. & Blomquist, G. J. (Eds). Academic press, New York. pp. 385-431.

Dethier, V. G., Browne, L. B. & Smith, C. N. (1960). The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insect. *Journal of economic Entomology* **53**: 134-136.

Dethier, V. G. (1970). Insect taste receptors. *Neuroscience Research Programm Bulletin* **8(5)**: 513-516.

Dicke, M. & Sabelis, M. W. (1988). Infochemical terminology based on cost-benefit analysis rather origin of compounds ? *Functional Ecology* **2**: 131-139.

Dicke, M. & Sabelis, M. W. (1992). Costs and benefits of chemical information conveyance: Proximate and ultimate factors. In: Insect chemical ecology. An evolutionary approach. Roitberg, B. D. & Isman, M. B. (Eds). Chapman & hall, New York, pp. 122-155.

Ding, D., Qui, H. G. & Hwang, C. B. (1980). In vitro rearing of an egg-parasitoid *Tetrastichus schoenobi* Ferriere (Hymenoptera, Tetrastichidae). *Contributors Shanghai Institut of Entomology* **1**: 55-59.

Dmoch, J. & Rutkowska-Ostrowska, Z. (1978). Host-finding and host-acceptance mechanism in *Trichomalus perfectus* Walker (Hymenoptera, Pteromalidae). *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.* **26** : 317-323.

Dmoch, J., Lewis, W. J., Martin, P. B. & Nordlung, D. A. (1985). Role of host-produced stimuli and learning in host selection behavior of *Cotesia* (= *Apanteles*) *marginiventris* (Cresson). *Journal of Chemical Ecology* **11(4)**: 453-463.

Doutt, R. L. (1959). The biology of parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **4**: 161-182.

Doutt, R. L. (1964). Biological characteristics of entomophagous adults. Biological Control of Insect Pests and Weeds. P. DeBach. London, Chapman & Hall: 147-167.

Doutt, R. L., Annecke, D. P. & Tremblay, E. (1976). Biology and host relationships of parasitoids. In: Theory and Practice of Biological Control. Huffaker, C. B. & P. S. Messenger (Eds), Academic press, New-York, pp. 143-163.

Drevet, J. R. & Couble, P. M. (1991). Preparation and rapid fractionation of a silk gland cell-free protein extract: preliminary investigations of the protein-binding properties of the P25 gene 5'-flanking sequences. *Sericologia* **31(4)**: 635-656.

Drost, Y. C. & Cardé, R. T. (1990). Influence of experience on sequential and temporal organization of host-acceptance behavior in *Brachymeria intermedia* (Chalcididae), an endoparasitoid of gypsy moth. *Journal of Insect Behavior* **3(5)**: 647-661.

Du, Y.-J., Van Loon, J. J. A. & Renwick, J. A. A. (1995). Contact chemoreception of oviposition-stimulating glucosinolates and an oviposition-deterrent cardenolide in two subspecies of *Pieris napi*. *Physiological Entomology* **20**: 164-174.

Edwards, R. L. (1955). The host-finding and oviposition behaviour of *Mormoniella vitripennis* (Walker) (Hym., Pteromalidae), a parasite of muscoid flies. *Behaviour* **7**: 88-112.

- Eggleton, P. & Gaston, K.** (1990). Parasitoid species and assemblages: Convenient definitions or misleading compromises ? *Oikos* **59(3)**: 417-421.
- Eggleton, P. & Belshaw, R.** (1992). Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **337**: 1-20.
- Fabre, J. H.** (1879-1907). Souvenirs entomologiques. Etudes sur l'instinct et les mœurs des insectes. Editions Robert Laffont, S. A. Paris.
- Fahnestock, S. R. & Irwin, S. L.** (1997). Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology & Biotechnology*. **47**: 23-32.
- Fahnestock, S. R. & Bedzyk, L. A.** (1997). Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology & Biotechnology*. **47**: 33-39.
- Fauria, K.** (1994). Comportement de reconnaissance de l'hôte par *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera, Ichneumonidae). Description et rôle du cocon. Rapport de D.E.A., 27 p..
- Feener, D. H. & Brown, B. V.** (1997). Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology* **42**: 73-97.
- Fournier, A.** (1979). Quantitative data on the *Bombyx mori* L. Silkworm: A review. *Biochimie* **61**: 283-320.
- Freddi, G., Svilokos, A. B., Ishikawa, H. & Tsukada, M.** (1993). Chemical composition and physical properties of *Gonometa rufobrunnae* silk. *Journal of Applied Polymer Science* **48**: 99-106.
- Frediani, D.** (1954). Ricerche morfologiche sull' *Acrolepia assectella* Zell. (Lepidoptera, Plutellidae) Nell Italia centrale. *Redia* **39**: 187-249.
- Ganesalingam, V.K.** (1974). Mechanism of discrimination between parasitized and unparasitized hosts by *Venturia canescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **17**: 36-44.
- Garel, J. P.** (1983). Endocrinological aspects of silk production. In: The physiology and biology of spinning in *Bombyx mori*. *Experientia* **39** : 461-466.
- Garel, A., Deleage, G. & Prudhomme, J.-C.** (1997). Structure and organization of the *Bombyx mori* sericin 1 gene and of the sericins 1 deduced from the sequence of the ser 1B c DNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27(5)**: 469-477.
- Garnier-Geoffroy, F., Robert, P., Hawlitzky, N. & Frerot, B.** (1997). Oviposition behaviour in *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Pyralidae) and consequences on host location and oviposition in *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae). *Entomophaga* **27(5)**: 469-477.
- Gauld, I. D. & Bolton, B.** (1988). The Hymenoptera. Oxford University Press / The Natural History Museum, London, Oxford, 322 p.

- Godfray, H.C.J.** (1994). Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, 473 p.
- Gosline, J. M., DeMont, M. E. & Denny, M. W.** (1986). The structure and properties of spider silk. *Endeavour, New series* **10(1)**: 37-43.
- Grasswitz, T. R. & Paine, T. D.** (1992). Kairomonal effect of an aphid cornicle secretion on *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera, Aphidiidae). *Journal of Insect Behavior* **5**: 447-457.
- Greany, P. D., Hawke, S. D., Carlysle, T. C. & Anthony, D. W.** (1977). Sense organs in the ovipositor of *Biosteres* (*Opius*) *longicaudatus*, aparaste of the caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America* **70(3)**: 319-321.
- Greathead, D.** (1986). Parasitoids in classical biological control. In: Insect Parasitoids. Waage, J. K. & Greathead, D. (Eds). Academic press, London, pp. 290-315.
- Gritsai, D. B.** (1978). Protein-sensitive elements of the labellar sensilla of *Musca domestica*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **14**: 142-149.
- Guerette, P. A. Ginzinger, D. G. Weber, B. H. F. & Gosline, J. M.** (1996). Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* **272**: 112-114.
- Hamilton, W. D.** (1967). Extraordinary sex ratios. *Science* **156**: 477-4878.
- Handman, E., macConville, M. J. & Goding, J. W.** (1987). Carbohydrate antigens as possible parasite vaccines. A case of the leishmlania glycolipid. *Immunology today* **8** 181-185.
- Hansen, K.** (1978). Insect chemoreception. In: Taxis and behavior. Receptors and recognition, Ser B, vol 15. Pp. 233-292. Hazelbauer, G. L (Ed).Chapman & Hall, London.
- Hassell, D. P.** (1986). Parasitoids and Population regulation. In: Insect Parasitoids. Waage, J. K. & Greathead, D. (Eds). Academic press, London, pp. 201-222.
- Haynes, K. F. & Birch, M. C.** (1985). Other pheromones, allomones and kairomones in the behavioral responses of insects. Vol. 9 Behavior. In: Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology.. Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. (Eds). Pergamon press, New York, pp. 225-255
- Hegdekar, B. M. & Arthur, A. P.** (1973). Host hemolymph chemicals that induce oviposition in the parasite *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Canadian Entomologist* **105**: 787-793.
- Heinrickson, R. L. & Meredith, S. C.** (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry* **136**: 65-74.
- Hendry, L. B., Greany, P. D. & Gill, R. J.** (1973). Kairomone mediated host-finding behavior in the parasitic wasp *Orgilus lepidus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **16**: 471-

477.

- Henson, R. D., Vinson, S. B. & Barfield, C. S.** (1977). Ovipositional behavior of *Bracon mellitor* Say, a parasitoid of the boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) III. Isolation and identification of natural releasers of ovipositor probing. *Journal of Chemical Entomology* **3**(2): 151-158.
- Hinman, M. B. & Lewis, R. V.** (1992). Isolation of clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila cavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *The journal of biological chemistry* **267**(27): 19320-19324.
- Hinman, M., Dong, Z., Xu, M. & Lewis, R. V.** (1992). Spider silk: A mystery starting to unravel. Results and Problems in Cell Differentiation 19 Biopolymers. S. T. Case. Springer-Verlag, Berlin, pp. 227-254.
- Hodgson, E. S.** (1968). Taste receptors of arthropods. In: Invertebrate receptors. Carthy, J. D. & Newell, G. E. (Eds). *Symposium of the Zoological Society of London* **23**: 269-277. Academic press, London.
- Hodgson, E. S.** (1974). Chemoreception. In: The physiology of Insecta. Rockstein, M. (Ed). Academic press, New York, pp.127-164.
- Hofsvang, T.** (1988). Mechanisms of host discrimination and intraspecific competition in the aphid parasitoid *Ephedrus cerasicola*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **48**: 233-239.
- Howard, R. W.** (1992). "Comparative analysis of cuticular hydrocarbons from the ectoparasitoids *Cephalonomia waterstoni* and *Laelius utilis* (Hymenoptera: Bethyridae) and their respective hosts, *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae) and *Trogoderma variabile* (Coleoptera: Dermestidae)." *Ann. Entomol. Soc. Am.* **85**(3): 317-325.
- Howard, R. W.** (1993). Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: Insect lipids: Chemistry, biochemistry and biology. Stanley-Samuelson, D. W. & Nelson, D. R. (Eds). University of Nebraska Press, Lincoln. pp. 179-226
- Hui, C.-C., Matsuno, K. & Suauki, Y.** (1990). Fibroin gene promoter contains a cluster of homeodomain binding sites that interact with silk gland factors. *Journal of Molecular Biology* **213**: 651-670.
- Isidoro, N., Bin, F., Colazza, S. & Vinson, S. B.** (1996). Morphology of antennal gustatory sensilla and glands in some parasitoid Hymenoptera with hypothesis on their role in sex and host recognition. *Journal of Hymenoptera Research* **5**: 206-239.
- Jackson, R. R.** (1987). Comparative study of releaser pheromones associated with the silk of jumping spiders (Araneae, Salticidae). *New Zealand Journal of Zoology* **14**: 1-10.
- Jacob, F.** (1987). Le beau et le vrai. Dans : Statue intérieure. pp. 195-199.
- Jervis, M. A. & Kidd, N.** (1996). Insect Natural Enemies. Chapman & Hall, London.
- Kainoh, Y., Hiyori, T. & Tamaki, Y.** (1982). Kairomone of the egg-larval parasitoid,

Ascogaster reticulatus Watanabe (Hymenoptera: Braconidae). *Applied Entomogy and Zoology* **17(1)**: 102-110.

Kainoh, Y. (1989). The role of chemical stimuli in the host-finding and oviposition behavior of *Ascogaster reticulatus* watanabe (Hymenoptera, Braconidae). *Agricultural and Forestry Science* **5**:115-162.

Kainoh, Y., Tatsuki, S., Sugie, H. & Tamaki, Y. (1989). Host-egg kairomones essential for egg-larval parasitoid, *Ascogaster reticulatus* Watanabe (Hymenoptera, Braconidae). II - Identification of internal kairomone. *Journal of Chemical Ecology* **15**: 1219-1229.

Kainoh, Y. & Brown, J. J. (1994). Amino acids as oviposition stimulants for the egg larval parasitoid, *Chelonus* sp. near *curvimaculatus* (Hymenoptera, Braconidae). *Biological Control* **4**: 22-25.

Kaissling, K. E. (1971). Insect Olfaction. In: handbook of Sensory physiology, Vol IV. Beidler, L. M. (Ed). Springer-Verlag, Berlin, pp. 351-431

Kaissling, K. E. (1986). Chemo-electrical transduction in insect olfactory receptors. *Annual Review of Neuroscience* **9**: 121-145.

Kaissling, K. E. (1987). Insect Olfaction. Colbow, K. (Ed). Simon Fraser University, Burnaby.

Kaissling, K.-E. (1996). Peripheral mechanisms of pheromone reception in moths. *Chemical Senses* **21**: 257-268.

Kalmes, R. (1984). Examen des problèmes posés par la sympatrie sur *Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptère, Yponomeutoide) dans le sud-est de la France des deux Hyménoptères Ichneumonidae *Diadromus collaris* et *Diadromus pulchellus*. Thèse de Doctorat, Université de Tours, 187 pages.

Kaplan, D., Adams, W. W., Farmer, B. & Viney, C. (1993). Silk polymers. American Chemistry Society, Washington D. C., 370 p..

Keil, T. A. & Steinbrecht, R. A. (1984). Mechanosensitive and olfactory sensilla of insects. Vol. 2. In: Insect ultrastructure. King, R. C. & Akai, M. (Eds). Plenum press, New York, pp. 477-516

Keil, T. A. (1997). Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microscopic Research and Technique* **39**: 506-531.

Keil, T. A. (1998). The structure of integumental mechanoreceptors. *Microscopic Anatomy of Invertebrates* **11B**: 385-404.

Kennedy, J. S. (1977). Olfactory responses to distant plants and other odors. In: Chemical Control of Insect behavior: Theory and Application. Shorey, H. H. & McKeivry, Jr J. J. (Eds). Wiley, New-York, pp. 67-91.

Kerguelen, V. & Cardé, R. T. (1996). Increased host acceptance in experienced females of the

parasitoid *Brachymeria intermedia*: Which types of oviposition behaviour contribute to experience ? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **78**: 95-103.

Kidd, N. A. C. & Jervis, M. A. (1996). Population Dynamics. In: Insect Natural Enemies. Jervis, M. A. & N. A. C., Kidd (Eds). Chapman & Hall, London, pp. 362-374.

King, B.H. (1992). Sex ratio manipulation by parasitoid wasps. Evolution and diversity of sex ratio. In: Insects and mites. Wrensch, D.L. & M., Ebbert (Eds). Chapman & Hall, New York, pp. 418-441.

Komatsu, K.-I. (1979). Chemistry and structure of silk. *Japan Agriculture Research Quarterly* **13**(1): 64-72.

Koover, J. (1987). Ecophysiology of spiders. Nentwig, W. (Ed). Springer-Verlag, Berlin, pp. 160-188.

Kovoor, J. (1977). La soie et les glandes séricigènes des arachnides. *Annales de Biologie* **3-4**: 7-171.

Kuris, A. M. (1974). Trophic interactions: similarity of parasitic castrators to parasitoids. *Quarterly Review of Biology*. **49**: 129-143.

Kusuda, J., Tazima, Y., Onimaru, K. & Ninaki, O. (1986). The sequence around the 5' end of the fibroin gene from the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, and comparison with that of the domesticated species, *B. mori*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 359-364.

Labeyrie, V. (1956). Observations sur la teigne du poireau (*Acrolepia assectella* Zell.). *Revue de Zoologie Agricole & Appliquée* **8**:13.

Labeyrie, V. (1960). Contribution à l'étude de la dynamique des populations d'insectes. I - Influence stimulatrice de l'hôte *Acrolepia assectella* Z. sur la multiplication d'un Hyménoptère Icheumonidae (*Diadromus* sp.). *Entomophaga Mém.* **1**: pp. 195.

Labeyrie, V. (1966). Sous-famille des Acrolepiinae. Dans : Entomologie appliquée à l'agriculture. Balachowsky, A. S. (Ed). Masson et Cie **2**: 233-249.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laing, J. (1937). Host-finding by insect parasites. I - Observation on the finding of hosts by *Alysia manducator*, *Mormoniella vitripennis* and *Trichogramma evanescens*. *Journal of Animal Ecology* **6**: 298-317.

Law, J. H. & Regnier, F. E. (1971). Pheromones. *Annual Review of Biochemistry* **40**: 533-548.

Lawson, J. H. (1986). The effects of parasitoids on phytophagous. In: Insect Communities. Waage, J. K. & Greathead, D. (Eds). Academic press, London, pp. 265-283.

- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1984a). Etude olfactométrique de l'action de diverses substances allélochimiques végétales dans la recherche de l'hôte par *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **35**: 295-303.
- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1984b). Le pouvoir attractif chez la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera, Yponomeutoidea) de quelques *Allium* des complexes *ampeloparsum* consommés par l'homme. *Acta oecologica-Oecologica applicata* **5**: 259-270.
- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1986). Analyse, dans deux types d'olfactomètres, du comportement de quête des femelles de *Diadromus pulchellus* en présence d'odeurs du phytophage-hôte et du végétal attaqué ou non. *Entomophaga* **31(1)**: 69-78.
- Lecomte, C., Thibout, E., & Thibeau, C.** (1990). Etude en microscopie électronique à balayage, des organes sensoriels de *Diadromus pulchellus* Wsm (Hymenoptera, Ichneumonidae). I. Antennes de la femelle et du mâle *Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne* **61(1-4)**: 15-38.
- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1991). Learning and conditioning in a specialist parasitoid *Diadromus pulchellus* (Ichneumonidae). *Insect Parasitoids* **LXXIV (3)**: 305-307.
- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1993). Pre- and post-imaginal experience in a specialist parasitoid *Diadromus puchellus* (Hym.: Ichneumonidae). *Entomophaga* **38(2)**: 175-184.
- Leonard, D. E., Bierl, B. A. & Beroza, M.** (1975). Gypsy moth kairomones influencing behavior of the parasitoids *Brachymeria intermedia* and *Apanteles melanoscelus*. *Environmental Entomology* **4**: 929-930.
- LeRalec, A.** (1991). Les Hyménoptères parasitoïdes: Adaptations de l'appareil reproducteur femelle. Morphologie et ultrastructure de l'ovaire, de l'œuf et de l'ovipositeur. Thèse de Doctorat, Rennes 1, 135 pages.
- Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H.** (1988). Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature* **331**: 257-259.
- Lewis, W. J. & Martin Jr W. R.** (1990). Semiochemicals for use with parasitoids: Status and future. *Journal of Chemical Ecology* **16(11)**: 3067-3089.
- Lewis, W. J., Tumlinson, J. H. & Krasnoff, S.** (1991). Chemically mediated associative learning: an important function in the foraging behavior of *Microplitis croceipes*. *Journal of Chemical Ecology* **17(7)**: 1309-1325.
- Lucas, F., Shaw, J. T. B. & Smith, S. G.** (1957). The amino acid sequence in a fraction of the fibroin of *Bombyx mori*. *The Biochemistry Journal* **66**: 468-479.
- Lucas, F., Shaw, J. T. B. & Smith, S. G.** (1960). Comparative studies of fibroins. I. The amino acid composition of various fibroins and its significance in relation to their crystal

structure and taxonomy. *Journal of Molecular Biology* **2**: 339-349.

Lucas, F. & Rudall, K. M. (1968). Extracellular fibrous proteins: the silks. *Comprehensive Biochemistry*. Florkin, M. & Stotz, E (Eds). Elsevier Publishing Company, Amsterdam London New York.

Ma, W. C. & Schoonoven, L. M. (1993). Tarsal contact chemosensory hairs of the large white butterfly, *Pieris brassicae* and their possible role in oviposition behaviour. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **16**: 343-357.

Mangel, M. (1987). Oviposition site selection and clutch size in insects. *Journal of Mathematical Biology* **25**: 1-22.

Mangel, M. (1989). An evolutionary interpretation of the “ motivation ” to oviposit. *Journal of Evolutionary Biology* **2**: 157-172.

Mangel, M. (1992). Descriptions of superparasitism by optimal foraging theory, evolutionary stable strategies and quantitative genetics. *Evolutionary Ecology* **6**: 152-169.

Martin, J., Hoffman, R. T. & Case, S. T. (1996). Identification of divergent homologs of *Chironomus tentans* sp185 and its balbiani ring 3 gene in Australasian species of *Chironomus* and *Kiefferulus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26(5)**: 465-473.

Masson, C. & Mustaparta, H. (1990). Chemical information processing in the olfactory system of insects. *Physiological Reviews* **70(1)**: 199-245.

Mattiacci, L., Vinson, S. B., Williams, H. J., Aldrich, J. R. & Bin, F. (1993). Long-range attractant kairomone for egg parasitoid *Trissolcus basalidis*, isolated from defensive secretion of its host, *Nezara viridula*. *Journal of Chemical Ecology* **19(6)**: 1167-1181.

Mattiacci, L. & Dicke, M. (1995). The parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera, Braconidae) discriminates between first and fifth instars of its host *Pieris brassicae*, on the basis of contact cues from frass, silk, and herbivore-damaged leaf tissue. *Journal of Insect Behavior* **8(4)**: 485-498.

Merivee, E., Rahi, M., Bresciani, J., Ravn, H. P. & Luik, A. (1998). Antennal sensilla of the click beetle, *Limonus aeruginosus* (Olivier) (Coleoptera: Elateridae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* **27(4)**: 311-318.

Meyhöfer, R., Casas, J. & Dorn, S. (1997). Mechano- and chemoreceptors and their possible role in host location behavior of *Sympiesis sericeicornis* (Hymenoptera, Eulophidae). *Annals of the Entomological Society of America* **90(2)**: 208-219.

Michaille, J.-J., Couble, P., Prudhomme, J.-C. & Garel, A. (1986). A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*. *Biochimie* **68**: 1165-1173.

Millar, J. G. & Hare, J. D. (1993). Identification and synthesis of a kairomone inducing oviposition by the parasitoid *Aphytis melinus* from California red scale covers. *Journal of Chemical Ecology* **19(8)**: 1721-1735.

- Mita, K., Ichimura, S., Zama, M. & James, T. C.** (1988). Specific codon usage pattern and its implications on the secondary structure of silk fibroin mRNA. *Journal of Molecular Biology* **203**: 917-925.
- Mochizuki, F., Sugi, N. & Shibuya, T.** (1992). Pheromone sensilla of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology* **27(4)**: 547-556.
- Mudd, A.** (1981). Novel 2-acylcyclohexane-1,3-diones in the mandibular glands of Lepidopteran Larvae. Kairomones of *Ephestia kuehniella* Zeller. : 2357-2362.
- Mudd, A. & Corbet, S. A.** (1982). Response of the ichneumonid parasite *Nemeritis canescens* to kairomones from the flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Chemical Ecology* **8(5)**: 843-850.
- Mudd, A., Walters, J. H. H. & Corbet, S. A.** (1984). Relative kairomonal activities of 2-acylcyclohexane-1,3-diones in eliciting oviposition behavior from parasite *Nemeritis canescens* (Grav.). *Journal of Chemical Ecology* **1(11)**: 1597-1601.
- Mudd, A.** (1985). Synthesis of kairomonal 2-acylcyclohexane-1,3-dione components of larval mandibular glands of *Ephestia kuehniella*. *Journal of Chemical Ecology* **11(1)**: 51-57.
- Nelson, J.M. & B.D., Roitberg** (1993). Factors governing host discrimination by *Opius dimidiatus* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behavior* **6(1)**: 13-24.
- Nemoto, T., Shibuya, M., Kuwahara, Y. & Suzuki, T.** (1987). New 2-acylcyclo-hexane-1,3-diones-kairomone against a parasitic wasp, *venturia canescens*, from faeces of the almond moth, *Cadra cautella*, and the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Agricultural and Biological Chemistry* **51**: 1805-1810.
- Nettles, W. C., Morrison, R. K., Xi, Z., Ball, D., Shenkis, C. A. & Vinson, S. B.** (1982). Synergistic action of potassium chloride and magnesium sulfate on parasitoid wasp oviposition. *Science* **218**: 164-166.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W.** (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W. & Taube, D.** (1990). Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with Coomassie brilliant Blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* **11**: 101-117.
- Noda, T., Kitamura, C., Takahashi, S., Takagi, K., Kashio, T. & Tanaka, M.** (1982). Host selection behavior of *Anicetus beneficus* Ishii et Yasumatsu (Hymenoptera: Encyrtidae) I - Ovipositional behavior for the natural host *Ceroplastes rubens* Maskell (Hemiptera: Coccidae). *Applied Entomology and Zoology* **17(3)**: 35-357.
- Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. & Fujimaki, M.** (1975). Isolation and identification of acidic oligopeptides in a flavor potentiating fraction from a fish protein

- hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **23**: 49-54.
- Noldus, L. P. J. J. & Van Lenteren, J. C.** (1985). Kairomones for the egg parasite *Trichogramma evanescens* Westwood II. Effect of contact chemicals produced by two of its host, *Pieris brassicae* L. and *Pieris rapae* L. *Journal of Chemical Ecology* **11**(6): 793-800.
- Nordlund, D. A.** (1981). A glossary of terms used to describe chemicals that mediate intra- and interspecific interactions. In: management of Insect Pests with Semiochemicals. Mitchell, E. R. (Ed). Plenum press, New York.
- Nordlung, D. A. & Lewis, W. J.** (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology* **2**: 211-220.
- Nordlung, D. A., Jones, R. L. & Lewis, W. J.** (1981). Semiochemicals: Their role in Pest Control. John Wiley, New York.
- Nordlung, D. A., Strand, M. R., Lewis, W. J. & Vinson, S. B.** (1987). Role of kairomones from host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and *Trichogramma pretiosum*, with partial characterization. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **44**: 37-43.
- Norton, W. N. & Vinson, S. B.** (1974). A comparative ultrastructural and behavioral study of the antennal sensory sensilla of the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*. *Journal of Morphology* **142**: 329-350.
- Noyes, J. S.** (1974). The biology of the leek moth, *Acrolepia assectella* (Zeller). Ph. D. thesis University of London, p. 254.
- Ohara, Y., Takabayashi, J. & Takahashi, S.** (1996). Oviposition kairomones in the cuticular wax of host larvae, *Pseudaletia separata*, toward its parasitic wasp, *Cotesia kariyai*. *Applied Entomology and Zoology* **31**(2): 271-277.
- Okamoto, H., Ishkawa, E. & Suzuki, Y.** (1982). Structural analysis of sericin genes. homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequences. *The Journal of Biological Chemistry* **257**(24): 15192-15199.
- Ono, T.** (1983). Pupation site preference and body orientation of the potato tuber moth, *Phthorimaea opercutella*. *Physiological Entomology* **8**: 49-53.
- Panzuto, M. & Albert, P. J.** (1998). Chemoreception of amino acids by female fourth- and sixth-instar larvae of the spruce budworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**: 89-96.
- Payne, T. L., Birch, M. C. & Kennedy, C. E. J.** (1986). Mechanisms in Insect Olfaction. Clarendon Press, Oxford.
- Pelosi, P. & Garibotti, M.** (1993). Peripheral aspects of olfaction. *Cytotechnology* **11**: 7-11.
- Pralavorio, R., Arambourg, G.Y. & Guennelon, G.** (1973). Essai de mise au point d'un élevage permanent d'*Acrolepiopsis assectella* Zeller (Lepidoptera, Yponomeutoidea) dans le

Sud Est de la France, de deux Hyménoptères ichneumonides *Diadromus collaris* et *D. pulchellus*. Thèse de Doctorat d'Etat, Tours, pp. 187.

Price, P. W. (1970). Trail odors: recognition by insects parasitic on cocoons. *Science* **17**: 546-547.

Price, P. W. (1984). Insect ecology. Wiley, New-York.

Prudhomme, J.-C., Couble, P., Garel, J.-P. & Daillie, J. (1985). Silk synthesis. Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology. Kerkut, L.I. & Gilbert, L. I. (Eds). Pergamon Press, pp. 571-594.

Quednau, F. W. (1967). Notes on mating behaviour and oviposition of *Crysocharis laricinellae*, a parasitoid of the larch casebearer. *Canadian Entomologist*, **99**: 326-331.

Quicke, D.L.J. (1997). Parasitic wasps. Chapman & Hall, London, 470 p.

Rabouille, A., Bigot, Y., Drezen, J.-M., Sizaret, P.-Y., Hamelin, M.-H. & Périquet, G. (1994). A member of the reoviridae (DpRV) has a ploidy-specific genomic segment in the wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera). *Virology* **205** : 228-237.

Rajendram, G. F. & Hagen, K. S. (1974). Trichogramma oviposition into artificial substrates. *Environmental Entomology* **3**: 399-401.

Reuter, O. M. (1913). Lebensgewohnheiten und instinkte der insekten. Friedlander, Berlin.

Richerson, J. V., Borden, J. H. & Hollingdale, J. (1972). Morphology of a unique sensillum placodeum on the antennae of *Coeloides brunneri* (Hymenoptera, Braconidae). *Canadian Journal of Zoology* **50**: 909-913.

Richerson, J. V. & Borden, J. H. (1972). Host finding by heat perception in *Coeloides brunneri* (Hymenoptera, Braconidae). *Canadian Entomologist* **104**: 1877-1878.

Ritter, F. J. (1979). Chemical Ecology: Odour communications in Animals. Elsevier / North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Rivault, C., Cloarec, A. & Sreng, L. (1998). Cuticular extracts inducing aggregation in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Journal of Insect Physiology* **44**: 909-918.

Roessingh, P., Städler, E., Baur, R., Hurter, J. & Ramp, T. (1997). Tarsal chemoreceptors and oviposition behaviour of the cabbage root fly (*Delia radicum*) sensitive to fractions and new compounds of host-leaf surface extracts. *Physiological Entomology* **22**: 140-148.

Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. & Ferrara, P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **203**: 173-179.

Rogers, D. (1972). Random search and insect population models. *Journal of Animal Ecology* **41**: 369-383.

- Rojas-Rousse, D.** (1980). Examen de quelques problèmes posés à propos des fluctuations du taux sexuel chez un Hyménoptère entomophage *Diadromus pulchellus* (Ichneumonidae). Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Tours, 214 p.
- Rojas-Rousse, D. & Pavelody, C.** (1983). Organogénèse et ultrastructure des sensilles placoïdes des antennes de *Diadromus pulchellus* Wesmael (Hymenoptera, Ichneumonidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* **12(4)**: 171-185.
- Rostas, M. , Dippel, C. & Hilker, M.** (1998). Infochemicals influencing the host foraging behaviour of *Dahlbominus fuscipennis*, a pupal parasitoid of the European spruce sawfly (*Gilpinia hercynia*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**: 221-227.
- Rudall, K. M. & Kenchington, W.** (1971). Arthropod silks: the problem of fibrous proteins in animal tissues. *Annual Review of Entomology* **16**: 73-96.
- Ryan, R. E. & Rudinsky, J. A.** (1962). Biology and habits of the douglas fir beetle parasite, *Coeloides brunneri* Vierek. *Canadian Entomologist* **94**: 748-763.
- Salt, G.** (1935). Experimental studies on insect parasitism. III. Host selection. *Proceedings of the Royal Society of London* **117B**: 413-435.
- Sambrook, J., Fritshe, E. M. & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd édition. Cold spring Harber Laboratory Press. Cold Spring Harber, New York.
- Sandlan, K.** (1980). Host location by *Coccygomimus turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **27**: 233-245.
- Schmidt, G. T.** (1974). Host acceptance behavior of *Campoletis sonorensis* toward *Heliothis zea*. *Annals of the Entomological Society of America* **67**: 835-844.
- Schmidt, J. M. & Schmidt, J. J. B.** (1986). Correlations between body angles and substrate curvature in the parasitoid wasp *Trichogramma minutum*: A possible mechanism of host radius measurement. *Journal of Experimental Biology* **125**: 271-285.
- Schmidt, J. M. & Schmidt, J. J. B.** (1987). Measurement of host curvature by the parasitoid wasp *Trichogramma minutum*, and its effect on host examination and progeny allocation. *Journal of Experimental Biology* **129**: 151-164.
- Schmidt, J. M.** (1991). "The role of physical factors in tritrophic interactions." *Insect parasitoids* **LXXIV(3)**: 43-93.
- Schneider, D.** (1964). Insect Antennae. *Annual Review of Entomology* **9**: 103-123.
- Seguy, E.** (1967). Dictionnaire des termes techniques d'entomologie élémentaire. Editions Paul Lechevalier, Paris.
- Shiraishi, A. & Kuwabara, M.** (1970). The effects of amino-acids on the labellar hair chemosensory cells of the fly. *Journal of General Physiology* **56**: 768-782.
- Siegel, S.** (1956). Non parametric statistics for the behavioral sciences. Mc Graw-Hill, New

York, 312 p..

- Singer, T. L.** (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Amer. Zool.* **38**: 394-405.
- Singh, R. N.** (1997). Neurobiology of the gustatory systems of *Drosophila* and some terrestrial insects. *Microscopy research and Technique* **39**: 547-563.
- Sinohara, H. & Asano, Y.** (1967). Carbohydrate content of fibroin and sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biochemistry* **62(1)**: 129-130.
- Sinohara, H.** (1977). Carbohydrate content of various silk fibroins. *Insect Biochemistry* **7**: 3-4.
- Sinohara, H., Asano, Y. & Fukui, A.** (1971). Glycopeptides from silk fibroin of *Bombyx mori*. *Biochemica et Biophysica Acta* **237**: 273-279.
- Sinohara, H.** (1979). Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **63B**: 87-91.
- Slifer, E. H.** (1969). Sense organs on the antennae of a parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera, Pteromalidae). *Biological Bulletin* **136**: 253-263.
- Slifer, E. H.** (1970). The structure of arthropod chemoreceptors. *Annual Review of Entomology* **15**: 121-142.
- Smith, B. H. & Breed, M. D.** (1995). The chemical basis for nestmate recognition and mate discrimination in social insects. In: Chemical ecology of insects. Vol. 2. Cardé, R. T. & Bell, W. J. (Eds). Chapman & Hall, New-York, pp. 287-317.
- Snell, T. W., Rico-Martinez, R., Kelly, L. N. & Battle, T. E.** (1995). Identification of a sex pheromone from a rotifer. *Marine Biology* **123**: 347-353.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J.** (1981). Biometry, 2nd édition. Freeman, W. F. & Co. San Francisco, 859 pages.
- Spek, E. J., Wu, H.-C. & Kallenbach, N. R.** (1997). The role of alanine sequences in forming β -sheets of spider dragline silk. *Journal of the American chemical Society* **119(21)**: 5053-5054.
- Städler, E.** (1984). Contact chemoreception. Chemical ecology of insects. Bell, W. J. & Cardé, R. T. (Eds). Chapman & Hall, London, pp. 3-35.
- Städler, E., Renwick, J. A. A., Radke, C. D.** (1995). Tarsal contact chemoreceptor response to glucosinolates and cardenolides mediating oviposition in *Pieris rapae*. *Physiological Entomology* **20**: 175-187.
- Steinbrecht, R. A.** (1984). Arthropoda: Chemo-, thermo-, and hygromoreceptors. In: Biology of the integument. Vol. 1. Bereiter-Hahn, J., Maltoltsy & Richards, K. S. (Eds). Springer-Verlag, Berlin, , pp. 523-553.

- Stepper, j., becker, C. & Schmidt, K.** (1983). Feinbau und ontogenese der porenplatten auf den antenna von of *Pimpla turionnellae* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Zoomorphologie* **102**: 11-32.
- Stoffolano, Jr J. G., Angioy, R., Crnjar, R., Liscia, A. & Pietra, P.** (1990). Electrophysiological recordings from the taste chemosensilla of *Tabanus nigrovittatus* (Diptera: Tabanidae) and determination of behavioral tarsal acceptance thresholds. *Journal of Medical Entomology* **27(1)**: 14-23.
- Stowe, M. K., Tumlinson, J. H. & Heath, R. R.** (1987). Chemical mimicry: Bolas spiders emit components of moth prey species sex pheromones." *Science* **236**: 964-967.
- Strand, M. R. & Vinson, S. B.** (1982). Source and characterization of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis*; a parasitoid of *Heliothis virescens*. *Physiological Entomology* **7**: 83-90.
- Strand, M. R. & Vinson, S. B.** (1983a). Analyses of an egg recognition kairomone of telenomus heliothis (Hymenoptera: Scelionidae) Isolation and host function. *Journal of Chemical Ecology* **9(3)**: 423-432.
- Strand, M. R. & Vinson, S. B.** (1983b). Factors affecting host recognition and acceptance in the egg paraistoid *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Environmental Entomology* **12**: 1114-1119.
- Strand, M. R.** (1986). The physiological interaction of parasitoids with their hosts and their influence on reproductive strategies. In: Insect parasitoids. Waage, J. K. & Greathead, D. (Eds). Academic press, London, Pp. 97-138.
- Strand, M. R., Williams, H. J., Vinson, S. B. & Mudd, A.** (1989). Kairomonal activities of 2-acylcyclohexane-1,3 diones produced by *Ephestia Kuehniella* Zeller in eliciting searching behavior by the parasitoid *Bracon hebetor* (Say). *Journal of Chemical Ecology* **15(5)**: 1491-1500.
- Suzuki, Y. & Brown, D. D.** (1972). Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. *Journal of Molecular Biology* **63**: 409-429.
- Takabayashi, J., Noda, T. & Takahashi, S.** (1985). Effect of kairomones in the host searching behavior of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the common Armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). I - Presence of arresting stimulants produced by the host larvae. *Applied Entomology and Zoology* **20(4)**: 484-489.
- Takabayashi, J. & Takahashi, S.** (1985). Host selection behavior of *Anicetus beneficus* Ishii et Yasumatsu (Hymenoptera: Encyrtidae). III - Presence of ovipositional stimulants in the scale wax of the genus *Ceroplastes*. *Applied Entomol Zoo.* **20(2)**: 173-178.
- Takabayashi, J. & Takahashi, S.** (1986a). Effect of kairomones in the host searching behavior of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the common Armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). II - Isolation and identification of arrestants produced by the host larvae. *Applied Entomology and*

Zoology **21(1)**: 114-118.

- Takabayashi, J. & Takahashi, S.** (1986b). Effect of kairomones in the host searching behavior of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the common Armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). III - Synthesis and bioassay of arrestants and related compounds. *Applied Entomology and Zoology* **21(4)**: 519-524.
- Takahashi, S., Hajika, M., Takabayashi, J. & Fukui, M.** (1990). Oviposition stimulants in the coccoïd cuticular waxes of *Aphytis yanonensis* DeBach & Rosen. *Journal of Chemical Ecology* **16(5)**: 1657-1665.
- Tamura, T., Inoue, H. & Suzuki, Y.** (1987). The fibroin genes of *Antherea yamamai* and *Bombyx mori* are different in their core regions but reveal a striking sequence similarly in their 5' ends and 5' flanking regions. *Molecular and General Genetics* **207**: 189-195.
- Tanimura, T., Isno, K., Takamura, T. & Shimada, I.** (1982). Genetic dimorphism in taste sensitivity to trehalose in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology* **147**: 433-437.
- Thibout, E.** (1978). L'activité sexuelle et le rôle de l'accouplement sur la reproduction d'un Lépidoptère à distribution géographique étendue *Acrolepiopsis (Acrolepia) assectella* Zell (Yponomeutoidea). Thèse de Doctorat d'Etat, Tours, 158 p..
- Thibout, E.** (1981). Observations préliminaires et caractérisation de la diapause reproductrice chez la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera, Yponomeutoidea). *Acta Oecologica- Oecologia Generalist* **2**: 171-182.
- Thibout, E., Auger, J. & Lecomte, C.** (1982). Host plant chemicals responsible for attraction and oviposition in *Acrolepiopsis assectella*. *Proceedings of the 5th International Symposium on Insect-Plant relationships*. Pudoc, Wageningen, pp.107-115.
- Thibout, E. & Nowbahari, B.** (1987). La sélection du lieu de nymphose chez la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera): Déterminisme exogène et variations interpopulations. *Annales de la Société Entomologique de France* **23** : 183-192.
- Thibout, E.** (1988). La spécificité de *Diadromus pulchellus* (Hyménoptère : Ichneumonidae) vis-à-vis de son hôte *Acrolepiopsis assectella*, la teigne du poireau. *Entomophaga* **33(4)**: 439-452.
- Thibout, E. & Auger, J.** (1996). Behavioural events and host constituents involved in oviposition in the leek moth *Acrolepiopsis assectella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**: 101-104.
- Thompson, W. R. & Parker, H. L.** (1927). The problem of host relations with special reference to entomophagous parasites. *Parasitology* **19**: 1-34.
- Tilden, R. L. & Ferkovich, S. M.** (1988). Kairomonal stimulation of oviposition into an artificial substrate by the endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera, Braconidae).

Annals of the Entomological Society of America **81(1)**: 152-156.

- Tompkins, L.** (1979). Developmental analysis of two mutants affecting chemotactic behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **73**: 174-177.
- Tompkins, L., Cardoso, J., white, F. & Saunders, T. G.** (1979). Isolation and analysis of chemosensory behaviour mutants in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Natural Science of USA* **76** 884-887.
- Tsujimoto, Y. & Suzuki, Y.** (1979). Structural analysis of the fibroin gene at the 5' end and its surrounding regions. *Cell* **16**: 425-436.
- Tucker, J. E. & Leonard, D. E.** (1977). The role of kairomones in host recognition and host acceptance behavior of the parasite *Brachymeria intermedia*. *Environmental Entomology* **6(4)**: 527-531.
- Van Alphen, J. J. M. & Vet, L. E. M.** (1986). An evolutionary approach to host finding and selection. In: *Insect Parasitoids*. Waage, J.K. & Greathead, D. (Eds). Academic press, London, pp. 23-61.
- Van Lenteren, J. C.** (1981). Host discrimination by parasitoids. Semiochemicals. Their role in pest control. J. L. Nordlung.
- Van Lenteren, J. C.** (1986). Parasitoids in the greenhouse: Successes with seasonal inoculative release systems. In: *Insect Parasitoids*. Waage, J. K. & Greathead, D. (Eds). Academic press, London, pp. 342-368.
- Vet, L. E. M. & Dicke, M.** (1992). Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Reviews of Entomology* **37**: 141-172.
- Vinnikov, Y. A.** (1974). Taste. In: *Sensory reception cytology, Molecular mechanisms and evolution*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, pp. 132-169.
- Vinson, S. B.** (1975a). Source of material in the tobacco budworm involved in host recognition by the egg-larval parasitoid, *Chelonus texanus*. *Annals of the Entomological Society of America* **68**: 381-384.
- Vinson, S. B.** (1975b). Biochemical coevolution between parasitoids and their hosts. *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites*. P. W. Price. Plenum Press, New York, pp.14-48.
- Vinson, S. B.** (1976). Host selection by insect parasitoids. *Annual Reviews of Entomology* **21**: 109-133.
- Vinson, S. B., Henson, R. D. & Barfield, C. S.** (1976). Ovipositional behavior of *Bracon melitor* Say (Hymenoptera, Braconidae), a parasitoid of Boll weevil (*Anthonomus grandis* Boh.). I - Isolation and identification of a synthetic released of ovipositor probing. *Journal of Chemical Ecology* **2(4)**: 431-440.
- Vinson, S. B.** (1977). Behavioral chemicals in the augmentation of natural enemies. In:

Biological Control in the augmentation of natural enemies. Ridgeway, R. L. & Vinson, S. B. (Eds). Plenum press, New York, pp. 237-279.

Vinson, S. B. & Iwantsch, G. H. (1980). Host suitability for insect parasitoids. *Annual Reviews of Entomology* **25**: 397-419.

Vinson, S. B. (1984). Parasitoid-host relationship. In: Chemical Ecology of Insects. W. J. C. Bell & S.T. Sunderland (Eds). Chapman and Hall, New York.

Vinson, S. B. (1985). The behavior of parasitoids. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, Vol. 9 Behavior. Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. (Eds), Pergamon press, New York, pp. 417-469.

Vinson, S. B. & Piper, G. L. (1986). Source and characterization of host recognition kairomones of *Tetrastichus hagenowii*, a parasitoid of cockroach eggs. *Physiological Entomology* **11**: 459-468.

Vinson, S. B., Bin, F. & Strand, M. R. (1986). The role of the antennae and host factors in host selection behavior of *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hymenoptera, Scelionadae). *Trichogramma and other egg parasites. IInd International Symposium, Guangzhou, INRA, Paris*, pp. 268-273.

Vinson, S. B. (1991). Chemical signals used by parasitoids. *Redia* **74**: 15-42.

Vogt, R. G. (1987). Molecular basis of pheromone reception: its influence on behavior. In: Pheromone Biochemistry. Prestwich, G. D. & Blomquist, G. J. (Eds). Academic press, New York, pp. 385-431.

Waage, J. K. (1978). Arrestment responses of the parasitoid, *Nemeritis canescens*, to a contact chemical produced by its host, *Plodia interpunctella*. *Physiological Entomology* **3**: 135-146.

Waage, J. K. & Hassell, D. P. (1982). Parasitoids as biological control agents. A fundamental approach. *Parasitology* **84**: 241-268.

Waage, J. K. (1986). Family planning in parasitoids: Adaptive patterns of progeny and sex allocation In: Insect Parasitoids. Waage, J. K. & Greathead, D. (Eds). Academic press, London, pp. 63-95.

Wallis, D. (1961). Response of the labellar hairs of the blowfly, *Phormia regina* (Meigen) to protein. *Nature* **191** : 917-918.

Weil, J. H. (1987). Biochimie générale. Masson, Paris, 508 p.

Wellings, P. W. (1991). Host location and oviposition on animals. Reproductive behaviour of insects individuals and populations. W. J. R.-S. Bailey, J.

Weseloh, R. M. & Bartlett, B. R. (1971). Influence of chemical characteristics of the secondary scale host on host selection behavior of the hyper-parasite *Cheiloneurus noxius*. *Annals of the Entomological Society of America* **64** : 1259-1264.

Weseloh, R. M. (1972). Sense organs of the hyperparasite *Cheiloneurus noxius* (Hymenoptera: Encyrtidae) important in Host selection processes. *Annals of the Entomological Society of America* **65**(1) : 41-46.

- Weseloh, R. M.** (1974). Host recognition by the gypsy moth larval parasitoid, *Apanteles melanoscelus*." *Annals of the Entomological Society of America* **67**(4): 584-587.
- Weseloh, R. M.** (1977). Effects on behavior of *Apanteles melanoscelus* females caused by modifications in extraction, storage, and presentation of gypsy moth silk kairomone. *Journal of Chemical Ecology* **3**(6): 723-735.
- Weseloh, R. M.** (1981). Host location by parasitoids. In: *Semiochemicals: their role in Pest Control*. John Wiley, New York, pp. 79-96.
- Weseloh, R. M.** (1988). Host recognition by the gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lep.: lymantridae) Hyperparasite, *Eurytoma appendigaster* (Hym.: Eurytomidae) of cocoons of *Cotesia melanoscela* (Hym.: Braconidae). *Entomophaga* **33**(2): 153-161.
- Whittaker, R. H. & Feeny, P. P.** (1971). Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* **171**: 757-770.
- Wilson, D. D., Ridgway, R. L. & Vinson, S. B.** (1974) Host acceptance and oviposition behavior of the parasitoid *Camponotus sonorensis*. *Annals of the Entomological Society of America* **67** : 271-274.
- Wu, Z. X. & Qin, J.** (1982). Culturing *Trichogramma dendrolimi* in vitro with media devoid of insect materials. *Proceedings of Chinese Academic Science of United State*. National Academic Science Joint Symposium on Biological Control, pp. 431-435.
- Wylie, H.G.** (1965). Discrimination between parasitized and unparasitized housefly pupae by females of *Nasonia vitripennis* (Walk) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Canadian Entomologist* **97**: 279-286.
- Wylie, H.G.** (1971). Oviposition restraint of *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) on parasitized housefly pupae. *Canadian Entomologist* **103**: 1537-1544.
- Xie, Z., Nettles, Jr W. C., Vinson, S. B. & Li, Y.** (1991). Identification of ovipositional stimulants for *Anastatus japonicus*. Pp. 101-104. In: *Trichogramma and other egg parasitoids*. Wajnberg, E. & Vinson, S. B. (Eds). Institut nationale de la recherche agronomique, les colloques 56, Paris.
- Xu, M. & Lewis, R. V.** (1990). Structure of a protein superfiber: Spider dragline silk. *Proceedings of the Natural Academy of Science of USA* **87**: 7120-7124.
- Yamasaki, Y. & Maekawa, K.** (1980). Synthesis of a peptide with a delicious taste. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 93-97.
- Yang, C., Teng, X., Zurovec, M., Scheller, K. & Sehnel, F.** (1998). Characterization of the P25 silk gene and associated insertion elements in *Galleria mellonella*. *Gene* **209**: 157-165.
- Zacharuk, R. Y.** (1980). Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annual Reviews of Entomology* **25**: 27-47.
- Zacharuk, R. Y.** (1985). Antennae and sensilla. In: *Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 9 Behavior. Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. (Eds).

Pergamon press, New York, pp. 1-69.

Zurovec, M., Sehnal, F., Scheller, K. & Kumaran, K. (1992). Silk gland specific cDNAs from *Galleria mellonella* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **22(1)**: 55-67.

Zurovec, M., Vaskova, M., Kodrik, D., Sehnal, F. & Kumaran, A. K. (1995). Light-chain fibroin of *Galleria mellonella* L. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 1-6.

Zurovec, M., Yang, C., Kodrik, D. & Sehnal, F. (1998a). Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. *The Journal of Biological Chemistry* **273(25)**: 15423-15428.

Zurovec, M., Kodrik, D., Yang, C., Sehnal, F. & Scheller, K. (1998b). The P25 component of *Galleria* silk. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 264-270.



ANNEXES

ANNEXE I

CLHP pour la séparation des acides aminés

Les acides aminés pour être détectés en UV doivent être préalablement dérivés par fixation de groupements chromophores. La dérivation Pico-Tag® commercialisée par Waters utilise le phénylisothiocyanate (PITC) comme agent de dérivation. Cette technique a été mise au point par Heirickson & Meredith (1984). Elle aboutit, par réaction du carbone du groupement isothiocyanate sur l'azote, à la formation d'un dérivé (PICT-RCSO) ayant un noyau aromatique et présentant une forte absorption UV à 254 nm.

La dérivation en trois étapes est réalisée en général sur un volume d'extrait d'acides aminés de 25 µl.

- L'échantillon à analyser est évaporé à sec sous pression réduite grâce au procédé Pico-Tag®.
- Le résidu obtenu est repris dans 10 µl d'une solution contenant 40% d'éthanol 95°, 20% de triéthylamine et 40% d'eau. cette solution, après avoir été homogénéisée est évaporée de nouveau à sec.
- Le nouveau résidu est repris par 20 µl de la solution de dérivation et laissé 20 min à température ambiante.

La solution de dérivation contient 70% d'éthanol, 10% d'eau, 10% de PITC et 10% de triéthylamine.

L'échantillon est évaporé à sec et conservé à -20°C. Il sera repris par le diluant Waters (mélange eau/acétonitrile) au moment de l'analyse.

Le système CLHP est constitué d'un chromatographe Waters à deux solvants. La colonne thermostatée à 46 °C pour ces analyses est une C18 Novopak (Waters) de 300 mm de long et de diamètre interne de 3,9 mm. La détection est effectuée par un détecteur UV Waters dont la longueur d'onde est fixée à 254 nm. La séparation est faite en gradient d'élution à partir de deux solvants A et B. Le solvant A est constitué de 2,5% d'acétonitrile et de 97,5% de tampon de sodium 68 mM pH 6,45. Le solvant B est composé de 15% de méthanol, 40% d'eau et 45% d'acétonitrile. Le gradient d'élution est indiqué dans le tableau 21 qui suit :

Eluant	Temps (min)									
	0	13,5	24	30	50	62	62,5	66	67	80
% solvant A	100	97	94	91	66	66	0	0	100	100
% solvant B	0	3	6	9	34	34	100	100	0	0

Tableau 22 : Gradient d'élution

Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min

Les temps de rétention des acides aminés sont déterminés en injectant préalablement un standard constitué de 20 acides aminés.

ANNEXE II

PURIFICATION D'ADN GENOMIQUE.

I. Préparation d'un extrait d'ADN génomique.

- Dans un mortier prérefrigéré à - 80°C, 2 g d'insectes congelés à -80°C sont finement broyés.
- La poudre ainsi obtenue est reprise dans 4 ml de Tris-HCl 100 mM pH 9, EDTA 100 mM et 4 ml de SDS 2% préincubé à 65°C.
- L'ensemble est incubé 1 heure à 65°C.
- Le mélange est ensuite refroidi 5min à température ambiante, 1,02 ml d'acétate de potassium 8 M sont ajoutés puis l'ensemble est incubé 30 min dans la glace fondante.
- Les débris cellulaires, la majorité des protéines (sous forme précipitée) et les fragments de chitine sont ensuite "culottés" par centrifugation 30 min à 15000 g, 4°C.
- Le surnageant est récupéré et les acides nucléiques sont précipités par addition de 3 ml d'isopropanol et une incubation de 15 min à 1 heure dans la glace.
- Après 1 heure de centrifugation à 15000 g, 4°C, le surnageant est décanté, le culot d'acides nucléiques est lavé 2 fois à l'éthanol 70% puis séché à la cloche à vide (15-30 minutes).
- Dissoudre le culot sec dans 1-4 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 , EDTA 100 mM, ajuster à 100 mg/ml en RNAse A (DNases-free) puis incuber une nuit à 37°C.
- Déprotéiniser en ajoutant 1 volume de phénol saturé pH7 et 1/2 volume de chloroforme-alcool isoamylique 24-1 puis agiter 5min à température ambiante.
- Centrifuger 10 min à 5000 rpm, 4°C, puis récupérer le surnageant.
- Ajouter un volume équivalent de chloroforme-alcool isoamylique 24-1 et agiter 5 min à température ambiante.
- Centrifuger 10min à 5000 rpm, 4°C, puis récupérer le surnageant.
- Précipiter les acides nucléiques en ajustant le surnageant à 0,3 M acétate de sodium avec une solution mère 3 M, 1,1 volume d'isopropanol puis en incubant 2 heures au moins à - 20°C (ou 2 volumes d'éthanol, 1 heure à - 80°C).
- Centrifuger 15 min à 10000 rpm (13000-15000 g), 4°C et décanter le culot.
- Laver le culot à l'éthanol 70%.
- Centrifuger 10min à 10000 rpm, 4°C, décanter puis sécher à la cloche à vide (15-30 minutes).
- Dissoudre le culot sec dans 2,5 ml de TE.

II. Purification de l'ADN génomique sur gradient de CsCl-BET.

La purification effectuée ci-avant permet la préparation d'ADN génomique de bonne qualité, tant du point de vue taille que digestibilité par rapport aux enzymes de restriction. Cependant, cet ADN n'est pas dosable aux ultraviolets. La présence de trop nombreuses impuretés biaisent les mesures (oligoribonucléotides, phénol, voire protéines).

- Pour un tube "quick-seal" d'ultracentrifugation de 3,9 ml, dissoudre 3,1 g de CsCl à la solution d'ADN en TE et ajouter 100 µl de BET 10 mg/ml. Introduire la solution dans le tube, compléter avec du TE jusqu'à 3,9 ml

- puis sceller (concentration finale en CsCl = 1,55 mg/ml).
- Centrifuger 5 h 10 min à 100000 rpm, 25°C.
 - Dans le tube ultracentrifugé, le culot est formé par les traces d'ARNs restantes. La bande colorée par le BET correspond à l'ADN génomique. La non saturation en BET de l'ADN peut engendrer la présence d'une ou plusieurs autres bandes dans le tube. Celles-ci correspondent à des fractions d'ADN où le BET est préférentiellement intercalé en quantités différentes. Dans ce cas, prélever l'ensemble du gradient, extraire le BET, précipiter les acides nucléiques et réitérer l'ultracentrifugation en augmentant la quantité de BET dans le tube).
 - Extraire le BET en 2 à 3 étapes avec de l'isopropanol saturé avec une solution de NaCl 5 M.
 - Ajouter 2 volumes d'H₂O ultrapure, 3 volumes d'isopropanol et incubé 2 heures à -20°C, ou 6 volumes d'éthanol absolu et incubé 1 h à -80°C.
 - Centrifuger 15 min à 10000 rpm (15000 g; Sigma 3MK).
 - Reprendre le culot dans 500 µl d'acétate de sodium 0,3 M transférer en tube Eppendorf et reprécipiter l'ADN plasmidique en ajoutant 2,5 volumes d'éthanol absolu puis en incubant au moins 1 heure à -80°C.
 - Centrifuger 15' à 13600 rpm (15000 g; Sigma 202M), laver le culot 2 fois à l'éthanol 70% puis sécher à la cloche à vide (15-30 minutes).
 - Reprendre le culot sec dans 250 à 500 µl de TE puis estimer la concentration sur la dilution d'un aliquote (environ 10 µl dans 1 ml de TE) au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm (1 unité de DO600 = 50 mg/ml d'ADN).

ANNEXE III

PREPARATION DE GELS D'AGAROSE A 0,8 %

Peser 480 mg d'agarose pour préparer 60 ml de gel à 0,8 % et le mettre dans un erlen de 100 ml.

Ajouter 60 ml de tampon d'électrophorèse TBE 1X.

Mettre le mélange agarose-TBE à chauffer jusqu'à ébullition sur un agitateur magnétique.

Laisser refroidir jusqu'à 50°C environ (l'erlen peut être tenu dans la main sans se brûler).

Ajouter 6 µl de bromure d'éthidium BET à 10 µg/ml.

Couler la solution d'agarose refroidie à 50°C sans s'arrêter.

Laisser le gel prendre en masse (15 à 30 min).

Placer le gel dans la mini-cuve et le recouvrir de tampon d'électrophorèse TBE 1X. Ajouter du BET dans la mini-cuve (5 µl dans le compartiment positif) et agiter doucement.

ANNEXE IV

TRANSFERT D'ADN - ARN SUR MEMBRANES

Transfert alcalin d'ADN sur membranes

Hybond N⁺, Appligène ou Biodyne (Amersham)

Placer le gel successivement dans les solutions suivantes :

- 0,2 N HCl, 5 min à 15 min, sous agitation douce (hydrolyse acide partielle d'ADN). Le temps optimal d'incubation est proportionnel à la taille des fragments recherchés,
 - * 5 min : fragments de 500 pb à 2000 pb,
 - * 10 min : fragments de 2000 pb à 5000 pb,
 - * 15 min : fragments supérieurs en taille à 5000 pb.
- Extraire le tampon d'incubation à la trompe à vide puis rincer le gel 1 fois à l'eau ultra pure.
- 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl, 20 min, sous agitation douce (Neutralisation du traitement d'hydrolyse acide et dénaturation des acides nucléiques).

Toutes les opérations de transfert peuvent être effectuées en tampon 0,4 N NaOH pour les membranes HybondN⁺ et Appligène, en 0,25 N NaOH, 1,5 M NaCl pour la membrane Biodyne et s'effectuent avec des **gants propres**.

- Découper la membrane, 10 feuilles de papier Whatman et des feuilles de papier journal à la taille du gel à transférer.
- Préparer le pontage avec 2 feuilles de papier Whatman qui trempent à leurs extrémités dans le tampon de transfert.
- Déposer le gel "traité" sur le pontage.
- Par pression et à l'aide d'une pipette utilisée comme rouleau, chasser les bulles présentes entre le pontage Whatman et le gel.
- Sécher rapidement la surface supérieure du gel par absorption à l'aide d'une feuille de Whatman.
- Déposer la membrane de transfert égouttée sur le gel.
- Par pression et à l'aide d'une pipette utilisée comme rouleau, chasser les bulles présentes entre le gel et la membrane.
- Amorcer le transfert en déposant sur la membrane une feuille de Whatman imbibée de tampon de transfert.
- Par pression et à l'aide d'une pipette utilisée comme rouleau, chasser les bulles présentes entre la membrane et l'amorce en papier Whatman.
- Déposer 8 feuilles supplémentaires de papier Whatman puis 2 à 2,5 cm de papier journal découpé à la taille du gel.
- Couronner d'une plaque de verre et mettre l'ensemble sous pression à l'aide d'un poids (1 kg : gel de 11 x

- 14 cm; 1,5 kg : gel de 18 ou 20 x 22 cm).
- Transférer 4 heures à température ambiante.
 - Démontez le sandwich, repérez l'orientation du filtre sur le gel (coupure du coin en haut et à droite).
 - Rincer le filtre doucement et rapidement en 3XSSC (ce lavage retire les éventuels morceaux d'agarose collés sur le filtre).

Transfert de petits fragments d'ADN (30 à 500 pb).

Ce type de transfert s'effectue généralement à partir d'un gel 3,5 % agarose NuSieve en 1XTAE, 1 mg/ml BET (fragment de 100 pb à 800 pb) ou 4 % agarose NuSieve en 1XTBE, 1 mg/ml BET (fragments de 30 à 400 pb). La membrane utilisée est du HybondN⁺.

Dans ces conditions, les modifications suivantes sont apportées au protocole de transfert alcalin présenté ci-avant :

- pas d'hydrolyse acide en HCl 0,2 N,
- poids sur le transfert : 1 kg pour un gel de 18 à 20 x 22 cm,
- durée : 1 heure 30 min pour un gel 4 % NuSieve, 1XTBE,
2 heures pour un gel 3,5 % NuSieve, 1XTAE.

Transfert d'ARN sur membranes

Hybond C ou C extra

Toutes les opérations de transfert peuvent être effectuées en tampon 10XSSC (1XSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrate trisodique) ou en tampon 10XSSPE (1XSSPE = 0,149 M NaCl, NaH₂PO₄ 0,01 M, EDTA 1 mM, ajusté à pH 7,4 avec NaOH 10 N) et s'effectuent avec des **gants propres**.

- Découper la membrane, 10 feuilles de papier Whatman et des feuilles de papier journal à la taille du gel à transférer.
- Préincuber 1 heure avant le transfert la membrane dans de l'eau DEPC (la nitrocellulose est une matière hydrophobe qui est donc longue à hydrater correctement).
- Préparer le pontage avec 2 feuilles de papier Whatman qui trempent à leurs extrémités dans le tampon de transfert.
- Déposer le gel sur le pontage.
- Par pression et à l'aide d'une pipette utilisée comme rouleau, chasser les bulles présentes entre le pontage Whatman et le gel.
- Sécher rapidement la surface supérieure du gel par absorption à l'aide d'une feuille de Whatman.
- Déposer la membrane de transfert égouttée sur le gel.
- Par pression et à l'aide d'une pipette utilisée comme rouleau, chasser les bulles présentes entre le gel et la membrane.
- Amorcer le transfert en déposant sur la membrane une feuille de Whatman imbibée de tampon de transfert.
- Par pression et à l'aide d'une pipette utilisée comme rouleau, chasser les bulles présentes entre la membrane et l'amorce en papier Whatman.

- Déposer 8 feuilles supplémentaires de papier Whatman puis 2 à 2,5 cm de papier journal découpé à la taille du gel.
- Couronner d'une plaque de verre et mettre l'ensemble sous pression à l'aide d'un poids (1 kg : gel de 11 x 14 cm; 1,5 kg : gel de 18 ou 20 x 22 cm).
- Transférer 4 heures à température ambiante.
- Démontez le sandwich, repérez l'orientation du filtre sur le gel (coupure du coin en haut et à droite).
- Rincer le filtre doucement et rapidement en 3XSSC (ce lavage retire les éventuels morceaux d'agarose collés sur le filtre).
- Cuire le filtre 2 heures à 80°C pour **fixer l'ARN sur la membrane**.
- Conserver le filtre emballé dans du Saran Wrap à température ambiante.

Variante.

Si la taille des ARNs recherchés est supérieure à 2,5 kb, alors une hydrolyse partielle peut être effectuée afin d'obtenir une meilleure qualité de transfert.

Placer le gel successivement dans les solutions suivantes :

- 0,05 N NaOH, 15', sous agitation douce (Hydrolyse alcaline partielle du ARN),
- extraire le tampon d'incubation à la trompe à vide puis rincer le gel 1 fois à l'eau DEPC,
- 20XSSC ou 20XSSPE, 2 fois 15 min, sous agitation douce (Neutralisation à pH 7,4 pour ne pas hydrolyser la nitrocellulose).

ANNEXE V

MARQUAGE RADIOACTIF DE SONDAS ET PURIFICATION

Marquage d'un ADN par « random priming »

I. Réaction de marquage.

Dans un tube Eppendorf, déposer :

- de 25 à 50 ng d'ADN en TE,
- x µl d'eau qui complètent la réaction de synthèse à 25 µl au final.

Dénaturer les acides nucléiques 5 min au bain-marie à 100°C puis 1min dans la glace.

- 2,5 µl de tampon 10X de réaction (contient aussi un mélange d'hexanucléotides).
- 3 µl d'une solution de dCGT, chaque nucléotide étant à 0,5 mM,
- 30 à 50 mCi de dATP α ³²P (10 mCi/ml à 100% d'activité spécifique),
- 1 µl de DNA polymérase de Klenow 1-2 unités/µl (sous-unité polymérase de l'ADN polymérase de Kornberg).

Incuber toute la nuit à 15°C ou 1h 30 à 37°C.

La sonde peut ainsi être conservée à - 20°C jusqu'à sa purification par **filtration sur colonne de Sephadex G 50**.

Marquage d'oligonucléotides

Réaction de marquage.

Dans un tube Eppendorf, déposer :

- 50 pmol d'oligonucléotides en H₂O traitée DEPC,
- 2,5 µl de tampon 10X de réaction,
- 30 à 50 mCi de dATP ν ³²P (10 mCi/ml à 100% d'activité spécifique),
- 1 µl de T4 Kinase polynucléotides (10 unités/µl),
- x µl d'eau qui complètent la réaction de synthèse à 25 µl au final.

Incuber 2h à 37°C.

La sonde peut ainsi être conservée à - 20°C jusqu'à sa purification par **filtration sur colonne de Séphadex G 15**.

**Purification par filtration de l'ADN ou des
oligonucléotides marqués**

Préparer une colonne dans une pipette Pasteur siliconnée courte (13 cm) contenant un peu de laine de verre à son extrémité réduite, avec une solution de billes de Séphadex G50 (pour ADN) ou G15 (pour oligos) (en Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 10 mM).

- Déposer le mélange d'ADN marqué (ou d'oligonucléotides) et de nucléotides libres à la surface de la colonne.
- Eluer 10 fois par fraction de 200 µl de TE.
- Récupérer chaque fraction dans un tube Eppendorf (numéroté de 1 à 10).
- Mesurer la radioactivité présente dans chaque tube avec la sonde Nardeux.
- Le volume exclu contenant l'ADN marqué (ou d'oligonucléotides) est de 0,8 à 1,2 ml (tubes 4 à 6) et celui contenant les nucléotides libres de 1,6 à 2 ml (tubes 8 à 10).
- Réunir les fractions contenant l'ADN marqué (ou les oligonucléotides) et compter une prise aliquote en scintillation liquide.

ANNEXE VI

HYBRIDATION DE MEMBRANES

Procédure

I. Hybridation

La membrane est pré-hybridée en tampon Church à 65°C pendant 1 h (saturation des sites non spécifiques).

La membrane est ensuite hybridée soit avec la sonde ADN $\alpha^{32}\text{P}$, préalablement dénaturée 5 min à 95°C, dans 10 ml de tampon Church, pendant 1 nuit à 65°C, soit avec la sonde oligonucléotides $\nu^{32}\text{P}$ dans 10 ml de tampon Church, pendant 1 nuit au $T_m - 4^\circ\text{C}$.

II. Rincage des membranes

La membrane est lavée avec des solutions de plus en plus stringentes (Solution de 3X SSC, 0,1% SDS jusqu'à une solution de 0,5X SSC, 0,1 % SDS pour les hybridations avec des sondes ADN de taille supérieure à 100 pb et solution de 6X SSC, 0,1% SDS jusqu'à une solution de 5X SSC, 0,1 % SDS pour les hybridations avec des sondes oligonucléotidiques).

Révélation pour les sondes marquées radioactivement

Les membranes sont mises à autoradiographier à - 80°C en présence d'un Film Fugi X-Omat pendant 1 à 12 h selon la radioactivité présente sur les membranes, mesurée avec la sonde Nardeux.

III. Analyse des résultats d'hybridation

Les films d'autoradiographie sont développés et analysés.

Solutions d'hybridation et de lavage

Tampon Church : 0,5 M tampon Na PO₄ pH 7,2; 7% SDS, 1mM EDTA

Solution de lavage 20XSSC :

3 M NaCl; 0,3 M Na₃ citrate, 2 H₂O; ajuster à pH 7 avec HCl 1N.

Tampon TE : 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 à 8; 1 mM EDTA, pH8,0

ANNEXE VII

PURIFICATION D'ARN TOTAUX

Par la méthode Nonidet P40 + Urée 7 M

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Dès que le phénol est ajouté, les manipulations peuvent se faire à température ambiante.

- Les insectes ou les tissus (2g) sont broyés au mortier à - 80°C
- Reprendre la poudre dans 6 ml de NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM, pH 9,0, NP40 0,65 % (solution à 4°C)
- Agiter doucement pour homogénéiser
- Centrifuger 10 min à 15 000 g à 4 °C
- Récupérer le surnageant dans un volume équivalent de 7M Urée, 350 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,2, 10 mM EDTA, 1 % SDS
- Vortexer 2 min à 4°C
- Centrifuger 5 min à 15 000 g à température ambiante (sinon l'urée cristallise)
- Récupérer le surnageant et faire successivement une extraction avec
 - un vol. de phénol,
 - un vol. de phénol/chloroforme-alcool isoamylique (AIA) (vol/vol),
 - un vol. de chloroforme AIA.

- Précipiter les ARN avec un vol d'isopropanol (100 %), 2 h à - 20°C.
- Centrifuger 15 min à 15 000 g à 4°C. Eliminer le surnageant.
- Laver le culot avec un volume d'éthanol 70%. Sécher le culot.
- Reprendre le culot avec 400 µl d'H₂O DEPC.
- Ajuster à 1X tampon DNase et 0,01 U/µl DNase I-RNase free.
- Incuber 1 h à 37°C.
- Faire successivement une extraction avec :
 - un vol de phénol,
 - un vol de phénol/chloroformeAIA (vol/vol),
 - un vol de chloroforme AIA.

- Précipiter les ARNs en ajustant à AcNa 0,3 M, 2,5 vol. d'éthanol, 1 h à - 80°C.
- Centrifuger 15 min à 15 000 g à 4°C. Eliminer le surnageant. Laver 1 fois à l'éthanol 70%.
- Sécher le culot et le reprendre dans 200 µl d'H₂O DEPC.

Par la méthode Guanidine Thiocyanate 4 M

Les insectes ou les tissus (1g) sont broyés pendant 2 à 4 min à l'Ultraturax dans 10 ml d'une solution de guanidine thiocyanate 4 M (w/v), citrate de sodium 25 mM (v/v) pH 7, sarkosyl 0,5 % (w/v) et 0,1 M β -mercaptoéthanol (v/v).

- Ajouter 1ml d'acétate de sodium 2 M (v/v), pH 4 et agiter doucement.
- Ajouter 10 ml de phénol saturé en eau et mélanger fortement.
- Centrifuger 20 min à 10 000 g à 4 °C.
- Ajouter 2 ml de phénol/(chloroforme/AIA) (50/48/2) et mélanger fortement.
- Incuber 15 min à 0°C.
- Centrifuger 20 min à 10 000 g à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse et répéter (5 fois) les extractions successives avec :
 - un vol de phénol,
 - un vol de phénol/chloroformeAIA (vol/vol).

- Précipiter les ARNs avec un vol d'isopropanol (100 %), 2 h à - 20°C.
- Centrifuger 10 min à 10 000 g à 4°C. Eliminer le surnageant.
- Laver le culot avec un volume d'éthanol 70%. Sécher le culot.
- Reprendre le culot avec 400 μ l d'H₂O DEPC.
- Ajuster à 1X tampon DNase et 0,01 U/ μ l DNase I-RNase free.
- Incuber 1 h à 37°C.
- Faire successivement une extraction avec :
 - un vol de phénol,
 - un vol de phénol/chloroformeAIA (vol/vol),
 - un vol de chloroforme AIA.

- Précipiter les ARNs en ajustant à AcNa 0,3 M, 2,5 vol. d'éthanol, 1 h à - 80°C.
- Centrifuger 15 min à 15 000 g à 4°C. Eliminer le surnageant. Laver 1 fois à l'éthanol 70%.

- Sécher le culot et le reprendre dans 200 μ l d'H₂O DEPC.

ANNEXE VIII

SEQUENCAGE DES PROTEINES ET DES PEPTIDES

« Sequencing System model 477 A »

Le séquençage des protéines et des peptides fait appel à la chimie récurrente d'Edman. Cette méthode permet de déterminer la séquence d'un certain nombre d'acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale et elle est maintenant automatisée.

Le séquenceur est constitué de trois parties (Schéma ci-dessous) :

- Partie informatique

Elle permet d'automatiser toute la dégradation d'Edman et la séparation des acides aminés modifiés en CLHP phase inverse.

- Partie chimique par la réaction d'Edman

a) les réactifs (R)

R1 le phénylthiocyanate (PITC) se fixe sur 1 NH₂ libre terminal.

R2 la triméthylamine (TMA) fragilise la liaison peptidique par couplage en condition basique. On obtient un peptide phénylthiocarbonyle (PTC).

R3 l'acide trifluoroacétique (TFA), en milieu anhydre permet le clivage de la liaison peptidique entre l'acide aminé couplé au PITC et l'acide aminé qui le suit. On obtient un nouveau NH₂ libre en position terminale et le composé instable anélinothiazolinone (ATZ).

R4 le TFA aqueux (25 % v/v) permet de stabiliser la molécule ATZ par conversion (isomérisation) en une molécule appelée phénylthiohydantoïne-acide aminé (PTH-aa). Tous les PTH-aa seront ensuite séparés par CLHP selon leur degré d'hydrophobicité.

R5 un mélange standard de 20 acides aminés, sous forme ATZ sont utilisés pour la calibration de la colonne CLHP. Avant chaque séquençage, il subit l'étape de conversion puis il est injecté sur la colonne CLHP pour l'étalonnage.

b) les solvants

L'heptane (**S1**) et l'acétate d'éthyl (**S2**) lavent le filtre (sur lequel a été fixée la protéine) entre les différentes réactions.

Le chlorure de butyle (**S3**) permet le transfert des molécules de la cartouche à la flasque.

L'acétonitrile 20 % (v/v, **S4**) resolubilise les PTH-aa.

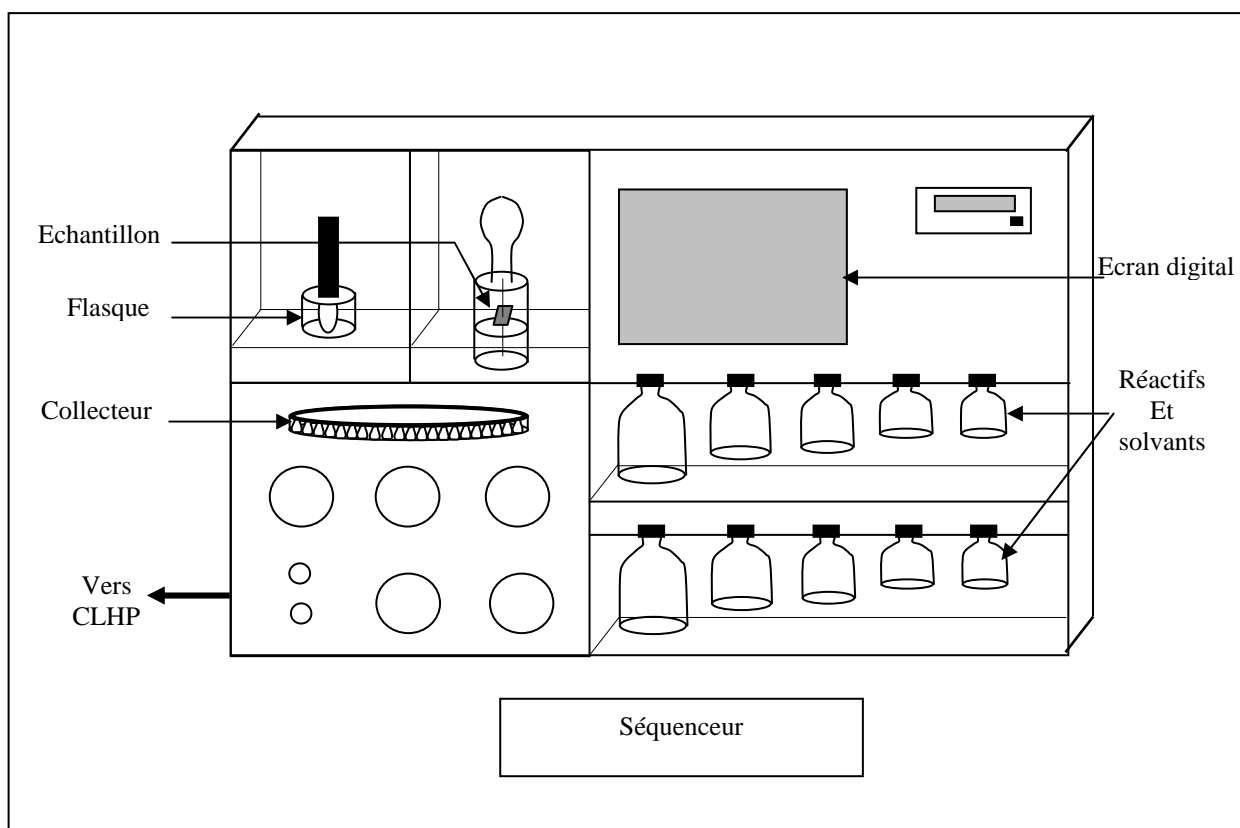
L'acétate-TFA et un mélange isopropanol-acétonitrile sont les tampons d'élution colonne.

c) les étapes (cartouche et flasque)

Huit microlitres de protéines (50 pmole au max) sont déposés sur un filtre de verre traité au biobronne (retient les protéines sur le filtre). La cartouche est maintenue à 48°C. La protéine va subir les réactions de couplage-clivage. Les molécules ATZ ainsi obtenues vont être transférées au niveau de la flasque. Les ATZ sont convertis en PTH-aa dans la flasque maintenue à 64°C.

- Partie chromatographique

Les PTH-aa sont alors séparés sur colonne RP CLHP, de dimension L 22 cm et \varnothing 0,21 cm, en suivant un gradient d'hydrophobicité. La colonne est placée dans un four à 55°C. Les PTH-aa élués suivant un gradient croissant d'acétonitrile seront détectés à 269 nm. La partie polaire du gradient est le tampon acétate dans du TFA et la partie hydrophobe est l'acétonitrile dans l'isopropanol. On obtient une série de chromatogrammes à chaque cycle de la réaction.



ANNEXE IX

DIGESTION ENZYMATIQUE DES PROTEINES DANS LE GEL APRES ELECTROPHORESE

I. Solutions

- Sol A : acétonitrile (ACN) 50 % (v/v) - tampon de la réaction enzymatique 50 %.
- Sol B : tampon de la réaction enzymatique (Tris HCl 100 mM pH 8,3, CaCl₂ 1 mM dans le cas d'une trypsinolyse ou Tris HCl 100 mM pH 8, ACN 10 %, 1 % Triton X100 réduit dans le cas d'endoprotéinase Lys-C).
- Sol C : ACN 60 % (v/v) - TFA 0,1 % (v/v).
- Sol D ACN 70 % (v/v) - TFA 0,1 % (v/v)-Triton X-100 réduit

II. Procédure

- 1 - Découper la bande de gel contenant la protéine (1 × 2 mm si cette bande est importante). La placer dans un tube Eppendorf.
- 2 - Equilibrer les bandes de gel dans la solution A pendant 2 fois 20 min sur un vortex à température ambiante. Lors de cette opération peuvent apparaître des fragments spontanés : il faut conserver ces solutions.
- 3 - Sécher le gel dans un dessiccateur sous vide (le réduire à moitié de sa taille d'origine).
- 4 - Réhydrater le gel avec 10 µl de tampon B. Ajouter 1 à 2 µl de solution enzymatique. Dans le cas d'une trypsinolyse, on ajoute de la trypsin de façon à obtenir un rapport enzyme / substrat variant de 1/10 à 1/200. L'estimation de la quantité de protéines se fait en fonction de la coloration du gel. On continue ensuite à réhydrater le gel en ajoutant des aliquotes de tampon B jusqu'à ce que le gel ait repris sa taille normale.
- 5 - Laisser la réaction enzymatique se faire. Dans le cas d'une trypsinolyse, on laisse la réaction se dérouler toute la nuit à 37°C.
- 6 - Stopper la réaction en ajoutant 0,05 % final de TFA.
- 7 - Prélever le surnageant.
- 8 - Extraire les peptides 2 fois dans 200 µl de solution C pendant 20 min en vortexant. Récupérer l'éluat chaque fois.
- 9 - Dans le cas de peptides très hydrophobes, poursuivre l'élution dans les mêmes conditions en utilisant la solution D.
- 10 - Evaporer les éluats au Speed vac.
- 11 - Purifier les peptides par chromatographie en phase inverse.

ANNEXE X

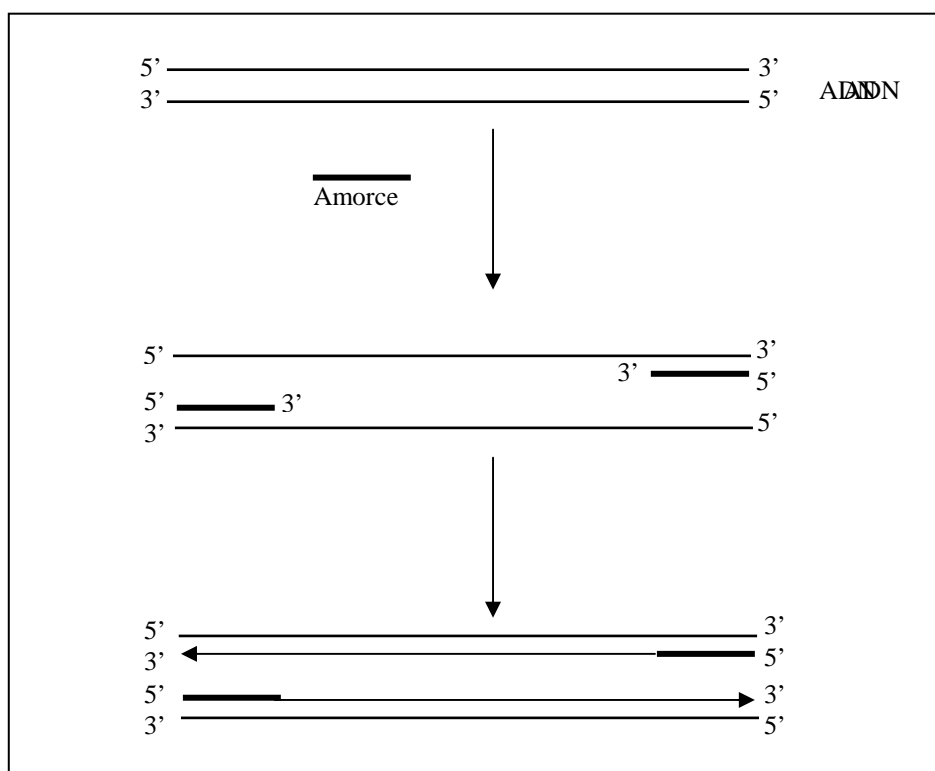
CODE GENETIQUE

Acides aminés			Codons
A	Ala	Alanine	GC(ACGU)
C	Cys	Cystéine	UG(CU)
D	Asp	Acide aspartique	GA(CU)
E	Glu	Acide glutamique	GA(AG)
F	Phe	Phénylalanine	UU(CU)
G	Gly	Glycine	GG(ACGU)
H	His	Histidine	CA(CU)
I	Ile	Isoleucine	AU(ACU)
K	Lys	Lysine	AA(AG)
L	Leu	Leucine	UU(AG) et CU(ACGU)
M	Met	Méthionine	AUG
N	Asn	Asparagine	AA(CU)
P	Pro	Proline	CC(ACGU)
Q	Gln	Glutamine	CA(AG)
R	Arg	Arginine	AG(AG) et CG(ACGU)
S	Ser	Sérine	AG(CU) et UC(ACGU)
T	Thr	Thréonine	AC(ACGU)
V	Val	Valine	GU(ACGU)
W	Trp	Tryptophane	UGG
Y	Tyr	Tyrosine	UA(CU)

ANNEXE XI

PCR

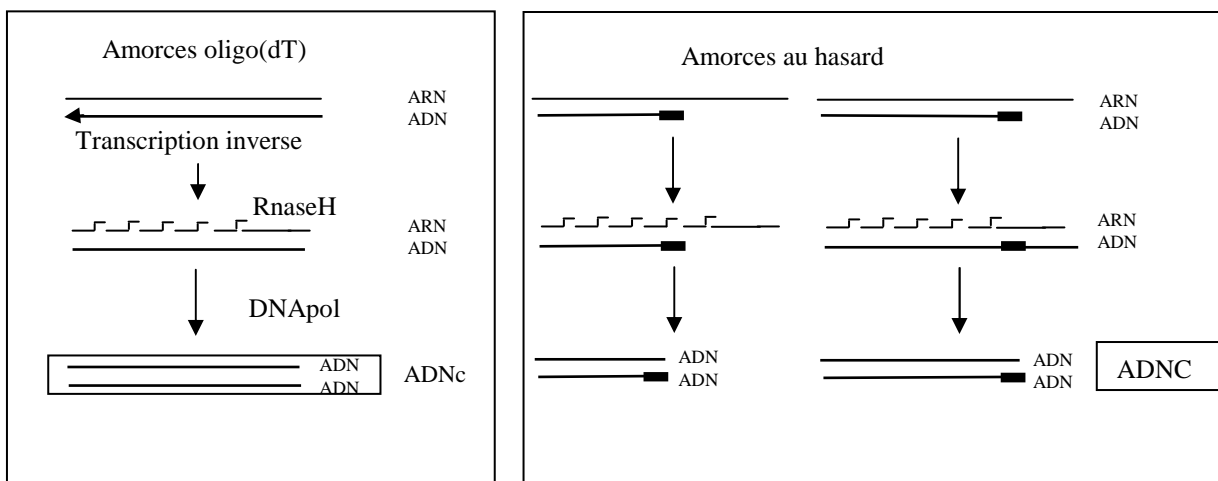
La PCR est une réaction enzymatique cyclique dans laquelle des brins d'ADN sont copiés. Cette méthode utilise une ADN polymérase et deux oligonucléotides amorces pour synthétiser une grande quantité d'un fragment spécifique d'ADN à partir d'une séquence matrice simple brin (**Fig.** ci-dessous). Chaque cycle commence par une étape de dénaturation à haute température afin de rendre l'ADN cible monocaténaire. Celle-ci est suivie par une étape d'hybridation pendant laquelle les amorces s'hybrident sur leur séquence complémentaire de telle façon que leur extrémité 3' OH soient en vis-à-vis. Finalement, chaque amorce est étendue à travers la région cible par l'ADN polymérase. Ces trois étapes constituent un cycle. Les produits des cycles précédents sont utilisés comme matrice pour les cycles suivants ce qui permet une amplification exponentielle du fragment désiré. Après les trois premiers cycles, le produit majoritaire est défini et sa longueur correspond exactement à la somme de la longueur des deux oligonucléotides et de l'ADN cible délimité par ces deux amorces.



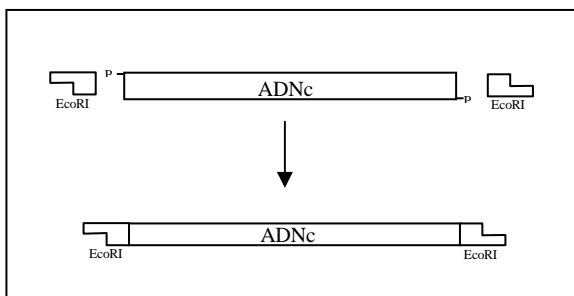
ANNEXE XII

BANQUE D'ADNc (schéma de la procédure)

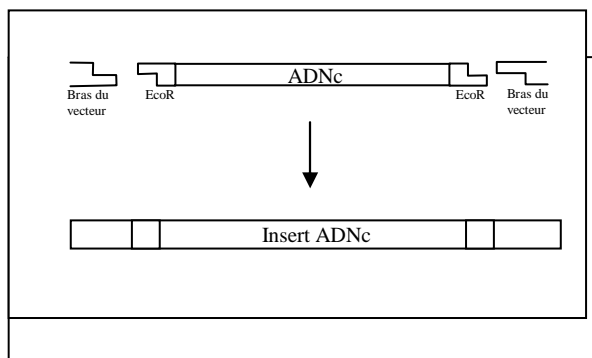
I. Synthèse du premier et deuxième brin d'ADNc



II. Ligation des adaptateurs EcoR I



III. Ligation dans le vecteur λ gt10



ANNEXE XIII

MINIPREPARATIONS D'ADN PHAGIQUE

I. Préparation de cellules réceptrices.

- A partir d'un clone bactérien conservé en 20% glycérol, ensemercer avec une anse 2 ml de milieu LB et laisser croître toute la nuit à 37°C sous une agitation de 250 rpm (bactéries C600hfl pour λ gt10 et 11; K803 pour EMBL 3 et 4; LE392 pour Charron 4A).
- Ensemercer au 1/100^{ème} 250 ml de milieu LB ajusté à 10 mM en MgCl₂ (ou MgSO₄) (LBMg) avec la culture overnight et incuber 2 heures à 37°C sous une agitation de 250 rpm.
- Centrifuger 10 min à 6000 rpm, éliminer le surnageant par décantation et reprendre le culot dans 125 ml de MgCl₂ stérile 10 mM (1/2 du volume de culture). La solution ainsi obtenue aura une absorbance à 600 nm d'environ 2 à 4 unité de DO.
- Les cellules réceptrices ainsi préparées pourront être conservées 1 semaine à 4°C (1 ml = $9,5 \times 10^7$ cellules/ml).

II. Etalement sur boîte de pétri d'un clone phagique en solution.

- Effectuer plusieurs dilutions de la solution de phages (par exemple un clone conservé en 7% DMSO à -80°C) en TM (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM) au 1/10^{ème}, 1/100^{ème}, 1/1000^{ème}, 1/10000^{ème}, 1/100000^{ème} et 1/1000000^{ème}.
- Dans un tube cristal à clip et stérile, mettre 50 μ l de bactéries réceptrices, et 1 μ l de solution de phages dilués. Incuber 15 min à 37°C.
- Faire fondre au bain-marie à 100°C une gélose molle (4 ml d'agarose à 8 g/l en LBMg), puis laisser refroidir à 45°C.
- Une fois l'incubation des phages et des bactéries terminée, ajouter dans le tube les 4 ml de gélose molle thermorégulés à 45°C, puis couler rapidement et en 1 seule fois sur une boîte de pétri en milieu LBMg.
- Incuber toute la nuit à l'étuve (37°C).

III. Culture et purification de l'ADN.

- Dans un tube cristal à clip et stérile, mettre 50 ml de bactéries réceptrices et 3 à 5 plages de lyse. Incuber 15 min à 37°C.
- Ajouter à 50 ml de LBMg les bactéries et les phages préincubés.
- Incuber toute la nuit à 37°C sous une agitation de 250 rpm.
- Centrifuger 15 min à 6000 rpm, 4°C.
- Récupérer le surnageant puis ajouter 25 μ l de DNaseI 1 mg/ml.
- Incuber 30 min à 37°C.
- Précipiter les phages en ajoutant 11 g de PEG6000, 10 ml de NaCl 5 M et en incubant 15 min à 37°C.
- Centrifuger 10 min à 15000 g, 4°C.

- Reprendre le culot dans 3 ml de TM, ajuster à 0,1% SDS, 0,1 M EDTA et 100 mg/ml en Protéinase K (ou en Pronase) puis incuber 15 min à 65°C.
- Ajouter un volume équivalent de phénol saturé pH7, agiter 4 min au vortex (vitesse de rotation : 6), centrifuger 10 min à 15000 g et récupérer la phase aqueuse.
- Extraire les traces de phénol avec un volume équivalent de chloroforme-alcool isoamylique 24/1, 4 min d'agitation au vortex (vitesse de rotation : 6).
- Récupérer le surnageant, ajuster à 0,3 M en acétate de sodium (solution mère 3 M), et précipiter les acides nucléiques en ajoutant 2 à 2,5 volumes d'ethanol absolu (ou 1 volume d'isopropanol) puis en incubant au moins 1 heure à -80°C.
- Centrifuger 15 min à 15000g, décant, laver le culot 1-2 fois avec EtOH 70% et sécher à la cloche à vide (15-30 minutes).
- Dissoudre le culot sec dans 200 µl de TE, ajuster à 100 mg/ml en RNase A (DNases-free) puis incuber toute la nuit à 37°C.
- Ajouter un volume équivalent de phénol saturé pH7, agiter 4 min au vortex (vitesse de rotation : 6), centrifuger 10 min à 15000 g et récupérer la phase aqueuse.
- Extraire les traces de phénol avec un volume équivalent de chloroforme-alcool isoamylique 24/1, 4 min d'agitation au vortex (vitesse de rotation : 6).
- Récupérer le surnageant, ajuster à 0,3 M en acétate de sodium (solution mère 3 M), et précipiter les acides nucléiques en ajoutant 2 à 2,5 volumes d'ethanol absolu (ou 1 volume d'isopropanol) puis en incubant au moins 1 heure à -80°C.
- Centrifuger 15 min à 15000g, décant, laver le culot 1-2 fois avec EtOH 70% et sécher à la cloche à vide (15-30 minutes).
- Dissoudre le culot en TE et conserver à 4°C (la conservation à 4°C évite la fragmentation que produiraient plusieurs congélation-décongélation à - 20°C sur l'ADN phagique).

ANNEXE XIV

CLONAGE ET SEQUENCAGE D'UN FRAGMENT D'ADN

Ligation du plasmide pGEM®-T

Cette ligation sera utilisée pour transformer des bactéries compétentes afin d'obtenir des plasmides recombinants.

Lors d'une ligation, le fragment à insérer doit être apporté en excès de 2 à 5 fois (en nombre de molécules) par rapport au vecteur. La quantité de vecteur à utiliser est de 50 à 100 ng.

	Volume (µl)
Produit PCR (insert)	1
ADN pGEM®-T (50 ng)	1
Tampon de ligation (10X)	1
« T4 DNA Ligase » (3 Weiss U/µl)	1
H ₂ O (qsp 10 µl)	6

Incuber 1 nuit à 4°C.

Sélection des clones bactériens contenant des plasmides recombinants

100 µl de bactéries compétentes (JM 109) déjà aliquotées dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et stockées à - 80°C sont remises en suspension à 4°C dans la glace.

Ajouter **stérilement** l'ADN (10 ng de ligation (pGEM®-T)).

Incuber les cellules 30 min dans la glace (4°C).

Incuber les cellules rapidement 2 min à 42 °C (Choc thermique).

Mettre les cellules 1 min dans la glace.

Ajouter **stérilement** 1 ml de milieu de culture LB.

Mettre en culture pendant 30 min à 1h à 37°C.

Centrifuger les cellules pendant 5 min à 5000 rpm.

Eliminer **stérilement** le surnageant.

Reprendre le culot dans 200 µl de milieu LB, 10µl d'IPTG 400 mM et 20 µl de Xgal 2 %.

Etaler **stérilement** la totalité du volume sur une boîte de pétri contenant du LB agar + ampicilline (50µg/µl).

Mettre à incuber 24 h à 37°C.

Mise en culture des clones bactériens contenant des plasmides recombinants

Préparer 4 tubes de 2,5 ml de LB contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml (solution stock d'ampicilline à 100 mg/ml).

Quatre clones positifs sont mis en culture dans 2,5 ml de LB + ampicilline à 37°C sous agitation constante 250 rpm, pendant 1 nuit.

Extraction de l'ADN plasmidique : minipréparation par lyse alcaline.

Ce type de préparation permet le séquençage de l'ADN plasmidique.

- Récupérer la culture dans un tube Eppendorf de 2,2 ml, et centrifuger 10 min à 6000 rpm, 4°C.
- Eliminer le surnageant par décantation, puis reprendre le culot (= bactéries) dans 250 µl de GET.
- Ajouter 50 µl d'une solution de lysozymes à 10 mg/ml préparée extemporanément en Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM. Incuber 10 min dans la glace.
- Ajouter 500 µl d'une solution fraîche de NaOH 0,2N, 1% SDS.
- Agiter manuellement 15 s puis incuber 10 min dans la glace.
- Ajouter 350 µl d'acétate de Potassium 3M.
- Agiter manuellement 15 s puis incuber 10 min dans la glace. Centrifuger 5 min à 15000g, 4°C.
- Récupérer le surnageant puis précipiter les acides nucléiques en ajoutant 500 µl de propanol-2.
- Centrifuger 10 min à 15000g, 4°C. Décanter le culot puis resuspendre dans 100 µl d'H₂O.
- Ajouter 20 µl de LiCl 5M. Incuber 15 min dans la glace. Centrifuger 5 min à 15000g, 4°C.
- Récupérer le surnageant puis précipiter les acides nucléiques en ajoutant 500 µl d'éthanol absolu.
- Incuber 10 min à -80°C. Centrifuger 5 min à 15000g, 4°C. Décanter le culot puis resuspendre dans 200 µl de TE.

- Ajouter 2 µl de RNaseA 10 mg/ml (DNases-free) et incuber 30 min à 37°C.
- Ajouter 200 µl de phénol saturé pH7.
- Vortexer 2 min (vitesse de rotation : 6) puis centrifuger 5 min à 15000 g.
- Récupérer la phase aqueuse puis extraire les traces de phénol avec 200 µl de chloroforme-alcool isoamylique 24/1, 2 min d'agitation au vortex (vitesse de rotation : 6). Centrifuger 5 min à 15 000 g.
- Récupérer le surnageant. Ajuster à 0,3 M en acétate de sodium (solution mère 3 M), et précipiter les acides nucléiques en ajoutant 600 µl éthanol absolu puis en incubant 30 min à -80°C.
- Centrifuger 15 min à 15000 g, décanter, laver le culot 1-2 fois avec EtOH 70% et sécher à la cloche à vide (15-30 minutes).
- Resuspendre le culot dans 20 µl de TE (pour une culture pendant la nuit de pUC, pGEM-T ou pBSC,

environ 8-10 µg de plasmide sont purifiés.)

Digestion enzymatique des plasmides recombinants

Des digestions EcoR1 sont réalisées pour chacune des minipréparations réalisées auparavant

Digestion des minipréparations d'ADN par *EcoRI*.

	Volume (µl)
ADN des minipreps	2
Tampon de digestion 10X	1,5
<i>EcoRI</i>	1
H2O (qsp 15µl)	11,5

Mélanger par agitation manuelle. Centrifuger. Incuber pendant 1 h à 37°C dans un bain-marie.

Les digestions sont contrôlées sur un gel 0,8% agarose + TAE 1X + BET (A9).

Séquençage sur système Li-COR

L'ADN plasmidique recombinant est séquencé

I. Composés pour l'amplification PCR

	Volume (µl)
ADN 1µg/ µl	1,3
Tampon de digestion 5X	3,4
Primer (T7 ou pRev marqué par 1 molécule fluorescente) 1 pmol / µl	1,3
Enz 3 U / µl	0,67
H2O	5,3
Total	11,97

Prélever 4 × 2,9 µl et ajouter dans chacun des tubes contenant 1,5 µl d'A ou C ou G, ou T + 1 goutte d'huile.

II. Conditions d'amplification PCR

(Amorce T7)		(Amorce pRev)	
Conditions d'amplification		Conditions d'amplification	
Nombres de cycles	Durée, Température	Nombres de cycles	Durée, Température
1	1 min à 94°C	1	1 min à 94°C
	30 s à 94°C		30 s à 94°C
25	15 s à 41°C	30	15 s à 50°C
	1 min à 70°C		1 min à 70°C
	+ 1 s à chaque cycle		+ 1 s à chaque cycle
1	2 min à 70°C	1	2 min à 70°C

III. Préparation du gel de séquence

Gel	L 66 cm
	LongRanger 4,3 %
Epaisseur du gel	0,25 mm
LongRanger 50 %	4,3 ml
Urée	21 g
10X TBE Long Run	5 ml
Eau ultrapure	32 ml
DMSO	500 µl
TEMED	50 µl
10 % APS	350 µl

IV. Conditions de migration

Voltage	2200 V
Courant	37 mA
Puissance	50 W
Température	45°C
Vitesse du scanner	3
Prémigration	45 min
Tampon de migration	1X

Solutions pour les bactéries

Milieu de culture LB

Milieu de **Luria-Broth**: 10 g de tryptone, 5g d'extrait de levure, 5g de NaCl, 0,3 ml de NaOH 1N, qsp 1 L.

LB agar + ampicilline: 15 g agar / 1 l LB, 50 µg/ml d'ampicilline

IPTG: Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (400 mM) est un inducteur non métabolisable de l'opéron lactose, il inactive le répresseur lac codé par le gène lacI.

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (2%) est un substrat chromogénique de la β galactosidase. Cette dernière coupe le lactose en glucose et galactose. X-gal permet de sélectionner les clones bactériens par la couleur des colonies qui sont bleues si elles renferment un vecteur natif Lac Z⁺ ou blanches si elles contiennent un vecteur recombinant Lac Z⁻.

Préparation des cellules compétentes

Travailler stérilement à la flamme.

Incuber 250 µl de cellules stockées à - 80°C avec du glycérol dans 25 ml de milieu LB à 37°C sous agitation constante 250 rpm pendant 2h30. Incuber les cellules 10 min dans la glace. Centrifuger les cellules 5 min 2000 rpm.

Reprendre le culot dans 12,5 ml de MgCl₂ 0,1 M, Vortexer, Incuber 20 min dans la glace, Centrifuger les cellules 5 min à 2000 rpm. Reprendre le culot, doucement à la pipette dans 2,5 ml de CaCl₂ 0,1 M et 20% glycérol.

Reprendre les bactéries très doucement dans cette solution. Incuber 1h dans la glace.

Répartir stérilement 100 µl de cellules par tube Eppendorf stérile. Stocker à - 80°C.

Solutions pour la minipréparation d'ADN plasmidique

- GET: 50 mM glucose

25 mM Tris-HCl pH8

10 mM EDTA

- Lysozyme 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH8

- Solution alcaline-SDS : 0,2N NaOH-1%SDS

- Acétate de potassium : 3 M AcK

1,8 M acide formique (Pm=46,03g et l= 1,22kg).

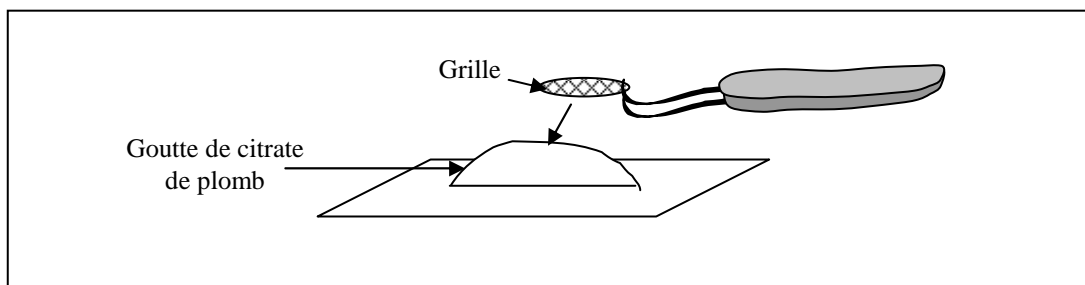
- Chlorure de lithium : 5 M LiCl

50 mM Tris-HCl pH 8.

ANNEXE XV

CONTRASTES DES COUPES FINES POUR LA MICROSCOPIE

- 1 - Bain de 20 min à l'obscurité en salière dans une solution d'acétate d'uranyle (aqueux selon la résine utilisée) préalablement filtré.
- 2 - Rinçage immédiat dans 2 bains d'eau bidistillée successifs en prenant soin de tremper les grilles sur leur tranche (20 passages). Puis absorption des gouttelettes sur papier filtre.
- 3 - Séchage des grilles (face mate vers le haut, ou se trouve les coupes fines) sur papier filtre.
- 4 - Préparation de gouttes de citrate de plomb sur un « portoir » en résine dentaire en milieu saturé en NaOH (grains anhydres, qui permettent de capturer le CO₂ de l'air, pour éviter les précipités sur les coupes).
- 5 - Dépôt 12 à 15 min des grilles sur les gouttes de citrate de plomb, face mate vers le bas :



- 6 - Rinçage rapide dans une solution de NaOH 0,01 N (20 passages successifs en fendant le liquide avec les grilles) puis absorption rapide des gouttelettes sur papier filtre.
- 7 - Rinçage dans 2 bains d'eau bidistillée successifs en fendant le liquide (20 passages) puis séchage sur papier filtre.
- 8 - Chaque grille peut-être observé au microscope électronique à balayage après 2 h environ.

Solutions de citrate de plomb

- 16 ml d'eau bidistillée + 3 ml de citrate trisodique (agiter).
- Ajouter 2 ml de nitrate de plomb (formation d'un précipité – agiter pour obtenir une solution laiteuse).
- Ajouter 4 ml de NaOH 1 N (on obtient une solution limpide).
- Ajouter de l'huile de vaseline (pour séparer la solution du CO₂).

ANNEXE XV

Recognition modalities of a phytophagous, *Acrolepiopsis assectella*, by its parasitoid, *Diadromus pulchellus*: Identification and perception of a polypeptidic signal

The solitary endoparasitoid *Diadromus pulchellus* (Hym.: Ichneumonidae) uses a chemical signal from the silk cocoon to recognize and accept its host pupa, *Acrolepiopsis assectella* (Lep.: Acrolepiidae). A behavioural test enabled us to quantify some behavioural criteria characteristic of host-acceptance. Various extracts from *A. assectella* cocoons deposited on cotton fibre lure and some cocoons were provided to female wasps. The cocoon components which trigger the host-acceptance behaviour were analysed by using various analytical chemistry and biochemistry methods. Biochemical analyses of aqueous extracts of cocoons subsequently tested in behaviour indicate that an extract containing 4 purified glycopolypeptides (90, 86, 78, 70 kDa) act as an acceptance signal. The kairomonal activity was found to be due to the protein moieties. The amino acid composition of these 4 glycopolypeptides (corresponding to 2 polypeptides called B1 and B2) and other 5 major polypeptides from washing cocoon extracts revealed the specificity in composition of each of them. The search of the genes coding for the 2 kairomonal polypeptides (B1 and B2) needed some comparisons of sericin proteinaceous sequences of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* (Lep.) cocoons and the use of amino acid microsequences from the NH₂-end of the 2 purified polypeptides. Some of the oligonucleotides synthesized were used to scan a cDNA bank of *A. assectella* and to perform PCR amplifications. The gene sequences have not been yet obtained. Multiple studies concerning morphology and ultrastructure (electronic microscopy) followed by electrophysiological studies enabled us to determine the function of the sensory organs implicated in the cocoon kairomon perception. Two types of gustatory chemosensory sensilla present on *D. pulchellus* female antennae would be involved in the perception of this proteinaceous kairomonal signal.

Modalités de reconnaissance d'un ravageur, *Acrolepiopsis assectella*, par son parasitoïde, *Diadromus pulchellus* : identification et perception d'un signal polypeptidique

L'endoparasitoïde solitaire *Diadromus pulchellus* (Hym. : Ichneumonidae) utilise un signal chimique issu du cocon de soie pour accepter la chrysalide hôte, *Acrolepiopsis assectella* (Lep. : Acrolepiidae). Un test comportemental a permis de quantifier les critères comportementaux caractéristiques de la phase d'acceptation de l'hôte. Divers extraits de cocons d'*A. assectella* déposés sur leurre en coton et des cocons ont été testés en comportement. Les composés du cocon déclenchant le comportement d'acceptation de l'hôte ont été analysés par diverses méthodes de chimie analytique et de biochimie. L'analyse biochimique d'extraits aqueux de cocons ensuite testés en comportement indique qu'un extrait contenant 4 glycopolypeptides purifiés (90, 86, 78, 70 kDa) agit comme signal d'acceptation. L'information semble portée par la ou les chaînes polypeptidiques. La composition en acides aminés de ces 4 glycopolypeptides (soit 2 polypeptides B1 et B2) et de 5 autres polypeptides majoritaires des extraits de lavages de cocons a montré la spécificité de composition de chacun d'eux.

La recherche des gènes codant pour les 2 polypeptides (B1 et B2) du signal kairomonal a consisté à comparer les séquences protéiques des sérécines des cocons de *Bombyx mori* et *Galleria mellonella* (Lep.) et à utiliser des microséquences en acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale des 2 polypeptides purifiés. Certains des oligonucléotides synthétisés ont servi à cribler des banques d'ADN complémentaires d'*A. assectella* et à faire des amplifications PCR. Les séquences des gènes n'ont pas été obtenues. Des études combinant morphologie et ultrastructure (microscopie électronique) puis électrophysiologie ont permis de déterminer la fonction des organes sensoriels impliqués dans la perception des kairomones du cocon. Sur les antennes des femelles *D. pulchellus*, 2 types de sensilles chimioréceptrices gustatives interviendraient dans la perception de ce signal kairomonal de nature protéique.

Mots clés :

Acceptation de l'hôte, cocon de soie, endoparasitoïde, glycopolypeptides, gustation, kairomone de contact, sélection de l'hôte, sensilles chimioréceptrices, sérécine.

Articles

- » Gauthier, N., Renault, S., Mandon, N., **Bénédet, F.** 2004. [Journal of Insect Physiology](#).
- » **Bénédet, F.**, Leroy, T., Gauthier, N., Thibaudeau, C, Thibout, E., Renault, S. 2002. [Proceedings of the Royal Society of London B](#).
- » Renault, S., Petit, A, **Bénédet, F.**, Bigot, S., Bigot, Y. 2002. [Journal of Insect Physiology](#).
- » Gauthier, N, **Bénédet, F.**, Tricault, Y, Monge, J. P., Huignard, J 2002. [Journal of Insect Behavior](#).
- » **Bénédet, F.**, Bigot, Y., Renault, S., Pouzat, J., Thibout, E., 1999. [Journal of Insect Physiology](#).
- » **Bénédet, F.**, Bigot, Y., Renault, S., Pouzat, J., Thibout, E., 1999. [Annales de la Société Entomologique de France](#).
- » **Bénédet, F.**, Bigot, Y., Pouzat, J., Thibout, E., 1997. Actes des colloques de la SFECA

