



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file / Votre référence

Our file / Notre référence

NOTICE

The quality of this microform is heavily dependent upon the quality of the original thesis submitted for microfilming. Every effort has been made to ensure the highest quality of reproduction possible.

If pages are missing, contact the university which granted the degree.

Some pages may have indistinct print especially if the original pages were typed with a poor typewriter ribbon or if the university sent us an inferior photocopy.

Reproduction in full or in part of this microform is governed by the Canadian Copyright Act, R.S.C. 1970, c. C-30, and subsequent amendments.

AVIS

La qualité de cette microforme dépend grandement de la qualité de la thèse soumise au microfilmage. Nous avons tout fait pour assurer une qualité supérieure de reproduction.

S'il manque des pages, veuillez communiquer avec l'université qui a conféré le grade.

La qualité d'impression de certaines pages peut laisser à désirer, surtout si les pages originales ont été dactylographiées à l'aide d'un ruban usé ou si l'université nous a fait parvenir une photocopie de qualité inférieure.

La reproduction, même partielle, de cette microforme est soumise à la Loi canadienne sur le droit d'auteur, SRC 1970, c. C-30, et ses amendements subséquents.

Canada



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-83808-6

Canada



UNIVERSITÉ D'OTTAWA
UNIVERSITY OF OTTAWA

Pour que tu saches que je me souviens,
Pour que tu saches que je t'aime,
Pour que tu saches que c'est possible.

REMERCIEMENTS

Je désire premièrement remercier mon superviseur, le Dr. J. T. Arnason, qui a su me guider ainsi que me soutenir moralement et financièrement jusqu'à l'accomplissement du présent manuscrit, de même que les membres de mon comité de supervision: Dr. B. J. R. Philogène, Dr. C. Morris et Dr. J. Lambert. En plus de cette équipe, plusieurs personnes ont collaboré à ce projet: Dr. M. Isman de l'Université de Colombie Britannique, Dr. Krishnamurty qui a fourni les graines d'*Azadirachta indica*, les Dr. Atkinson et Kaminsky qui ont extrait, purifié et dihydrogéné la molécule d'azadirachtine, le Dr. Werstiuk qui l'a tritiée et le Dr. Hudon qui a fourni les oeufs d'*O. nubilalis*. A chacun d'entre vous, un sincère merci. Merci au Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (C.R.S.N.G.) et à l'École des Études Supérieures pour le support financier durant ce projet.

Tout travail peut être source d'épanouissement et de satisfaction ou fardeau étouffant et dégradant selon l'atmosphère dans lequel il s'accomplit. J'ai choisi le laboratoire du Dr. J. T. Arnason comme milieu de travail à cause de l'esprit d'entraide et de fraternité qui y règne. Merci à tous les membres du laboratoire: Alok Sen, Robin Marles, France Duval, Diane Gagnon, Claude B-Bernard, Sékou Moussa Kéïta, Bernard Conilh de Beyssac, Richard Aucoin, Mamdouh Abou Zeid, Shawna McKinnon, Mark Lewis et tous les autres. Grace à vous, ma maîtrise a été pour moi source d'épanouissement et de satisfaction. Un merci spécial à Thor, France, Diane, Claude, Richard, Bernard et Kéïta, plus que des amis(es), vous avez été ma famille d'accueil en terre d'exil (!), je vous en suis éternellement reconnaissante.

Merci aux étudiants des autres laboratoires: Scott Reid, Norman Thie, Ruying Feng, Nathalie Bourassa et Leah de Forest. Votre compagnie et votre support ont été appréciés.

Merci à mes amis: Pierre Paquin, Robert Parent, et Geneviève Moreau. Merci aussi à ma famille et à mes proches: Maman, Papa, François, Carole et Pierre, José, Maryse, Hugo, Francis et Mélanie. Merci enfin à Daniel, le dernier mais non le moindre, qui a su par son aide, son support et son amour, me donner le goût, la détermination et le courage de rendre à terme ce projet. Sans vous tous, rien de tout ceci n'aurait été possible. Je m'en souviendrai. Merci.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.	xiii
LISTE DES TABLEAUX.	ix
LISTE DES ANNEXES.	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES.	ix
RÉSUMÉ.	xi
ABSTRACT.	xii
1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE	1
1.1. INTRODUCTION	1
1.1.1. Culture et agriculture	1
1. Généralités	1
2. Histoire du contrôle chimique et détérioration des systèmes agricoles.	2
3. Recherche de nouveaux moyens dans une stratégie de lutte intégrée.	3
1.1.2. Le margousier	5
1.1.3. L'azadirachtine	8
1.1.4. Potentiel d'utilisation de l'azadirachtine et des produits du margousier.	12
1.1.5. Réponse des insectes aux insecticides et aux toxines.	13
1.1.6. L'insecte expérimental	18
1.2. FONDEMENTS DE L'ÉTUDE	21
1.2.1. Hypothèses	22
1.2.2. Objectifs spécifiques	22
2. DISTRIBUTION, EXCRÉTION ET STOCKAGE	23
2.1. INTRODUCTION	23
2.1.1. Généralités	23

2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	25
2.2.1. Produits chimiques	25
2.2.2. Insectes et maintien de la culture	26
2.2.3. Études de croissance et de développement.	27
2.2.4. Effets de l' ¹ H ₂ -AZA appliqué au 3 ^e stade larvaire.	28
2.2.5. Études de distribution par voie orale	28
2.2.6. Études de distribution par voie cuticulaire	30
2.2.7. Transformations des données	31
2.3. RÉSULTATS	32
2.3.1. Pureté de l' ¹ H ₂ -AZA et de l' ³ H ₂ -AZA.	32
2.3.2. Effet de l' ¹ H ₂ -AZA sur la croissance et le développement d' <i>O.</i> <i>nubilalis</i>	32
2.3.3. Effet de l' ¹ H ₂ -AZA appliqué au 3 ^e stade larvaire.	35
2.3.4. Études de distribution de l' ³ H ₂ -AZA administrée oralement à <i>O.</i> <i>nubilalis</i>	37
2.3.5. Études de distribution de l' ³ H ₂ -AZA administrée sur la cuticule à <i>O.</i> <i>nubilalis</i>	44
2.4. DISCUSSION	51
2.4.1. Croissance et développement	51
2.4.2. Étude préliminaire. Effet de l' ¹ H ₂ - AZA administrée au 3 ^{ième} stade larvaire.	53

2.4.3.	Distribution de l' ³ H ₂ -AZA chez <i>O. nubilalis</i> après application par voie orale	55
2.4.4.	Distribution de l' ³ H ₂ -AZA chez <i>O. nubilalis</i> après application cuticulaire	59
3.	MÉTABOLISME ET SYNERGISME	63
3.1.	INTRODUCTION	63
3.1.1.	Généralités	63
3.2.	MATÉRIEL ET MÉTHODE	67
3.2.1.	Effet du dillapiol conjugué à l'azadirachtine sur la croissance et le développement d' <i>O. nubilalis</i>	67
3.2.2.	Effet du butoxyde de pipéronyl, du phénobarbitol et de l'H ₂ -AZA sur la croissance des chenilles de 3 ^e stade d' <i>O. nubilalis</i>	69
3.2.3.	Détermination du meilleur rapport H ₂ -AZA:DIL	69
3.3.	RÉSULTATS	71
3.3.1.	Effet du DIL et de l'H ₂ -AZA sur la croissance et le développement d' <i>O. nubilalis</i>	71
3.3.2.	Effet du butoxyde de pipéronyl, du phénobarbitol et de l'H ₂ -AZA sur la croissance d' <i>O. nubilalis</i>	74
3.3.3.	Meilleur rapport DIL:H ₂ -AZA	76

3.4. DISCUSSION	79
3.4.1. Effet sur la croissance et le développement d' <i>O. nubilalis</i> du DIL et de l'H ₂ -AZA.	79
3.4.2. Effet du butoxyde de pipéronyl, du phénobarbitol et de l'H ₂ -AZA sur la croissance d' <i>O. nubilalis</i>	79
3.4.3. Meilleur rapport DIL:H ₂ -AZA.	80
 4. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	 81
 RÉFÉRENCES	 84
 ANNEXES	 98

LISTE DES FIGURES

1.	Quelques triterpénoïdes et leurs dérivés d' <i>Azadirachta indica</i>	8
2.	Structure chimique de l'azadirachtine.	10
3.	Structure chimique de l'azadirachtine dihydrogénée.	11
4.	Représentation schématique du système enzymatique monooxygénase à plusieurs substrats.	17
5.	L'insecte expérimental, <i>O. nubilalis</i>	19
6.	Tracé de l' $^1\text{H}_2$ -AZA au HPLC et fraction de l' $^3\text{H}_2$ -AZA.	34
7.	Croissance d' <i>O. nubilalis</i> traité à l' $^1\text{H}_2$ -AZA.	35
8.	Poids d' <i>O. nubilalis</i> du 3 ^{ème} au 5 ^{ème} stade traité à l' $^1\text{H}_2$ -AZA.	37
9.	Distribution après traitement oral.	40
10.	Distribution après 72 heures de traitement oral.	41
11.	Distribution dans les fèces après traitement oral.	43
12.	Rinçage de la cuticule	46
13.	Distribution après traitement sur la cuticule	47
14.	Distribution après 72 heures du traitement sur la cuticule.	49
15.	Distribution dans les fèces après traitement sur la cuticule.	51
16.	Structure chimique du butoxyde de pipéronyl et du dillapiol.	66
17.	Croissance d' <i>O. nubilalis</i> traité à l' $^1\text{H}_2$ -AZA et au DIL.	73
18.	Interaction entre l' $^1\text{H}_2$ -AZA et le DIL selon l'ANOVA à deux critères de classification.	76
19.	Poids d' <i>O. nubilalis</i> traité au butoxyde de pipéronyl, au phénobarbitol et à l' $^1\text{H}_2$ -AZA.	78

20. Poids d' <i>O. nubilalis</i> traité avec différents rapports H ₂ -AZA:DIL.	79
---	----

LISTE DES TABLEAUX

1. Temps pour la croissance d' <i>O. nubilalis</i> traité à l'H ₂ -AZA.	39
2. Résultats des tests de comparaisons multiples (STK et Tukey) pour l'interaction H ₂ -AZA et DIL. . . .	74

ANNEXES

1. Nourriture pour la culture d'*O. nubilalis*
2. Observations sur la croissance d'*O. nubilalis* traité à l'H₂-AZA
3. Composition du tampon phosphate
4. Transformation de Taylor
5. DPM pour les fèces lors des traitements oral et cuticulaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

- AD=Digestibilité Approximative
 AZA=Azadirachtine
 DDT=DichloroDiphényltrichloroéthane
 DIL=Dillapiol
 DIMBOA=2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
 DMSO=Diméthyl Sulfoxyde
 DPM=Dégradations Par Minute
 ECD=Efficacité de Conversion de la nourriture Digérée
 ECI=Efficacité de Conversion de la nourriture Ingérée
 EtOH=Ethanol
 FAB=Bombardement rapide d'atomes (Fast Atom Bombardment)
 H₂-AZA=Azadirachtine Dihydrogénée
³H₂-AZA=Azadirachtine Dihydrogénée Tritiée

NADPH=nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
RMN=Résonance de Masse Nucléaire
PPM=Partie Par Million
PSMO=Monooxygénase à Plusieurs Substrats
TLC=Chromatographie sur Couche Mince

RÉSUMÉ

Des études toxicocinétiques et synergiques sur l'azadirachtine dihydrogénée (H_2 -AZA) ont été effectuées chez la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner, à l'aide d'un traceur radioactif tritié. L'azadirachtine, un triterpénoïde extrait de l'arbre *Azadirachta indica*, est reconnue pour ses propriétés antiappétantes et régulatrices de la croissance chez plusieurs espèces d'insectes.

Les résultats de cette étude ont montré que: (1) L' H_2 -AZA diminue la croissance et altère le développement de la pyrale du maïs; (2) le traceur est éliminé par les fèces entre 12 et 24 heures après le traitement par voie orale ou par voie cuticulaire; (3) l'estomac, la carcasse et les corps gras présentent la plus grande accumulation de traceur pour le traitement par voie orale; l'estomac et la carcasse présentent la plus grande accumulation de traceur pour le traitement par voie cuticulaire; (4) la pénétration du traceur dans la cuticule de l'insecte est rapide: elle prend place dans les premières 12 heures après l'application; et (5) le dillapiol et le butoxyde de pipéronyl, des inhibiteurs des enzymes monooxygénase à plusieurs substrats, augmentent la toxicité de l' H_2 -AZA chez *O. nubilalis*.

Les résultats de cette étude permettent de mieux comprendre d'une part, comment *O. nubilalis* réagit à l'introduction de cette substance dans son organisme, et d'autre part, comment la molécule d'azadirachtine agit chez l'insecte.

ABSTRACT

Toxicokinetic and synergistic studies were conducted with dihydro-azadirachtin (H_2 -AZA) and a tritiated tracer on the European corn borer (ECB), *Ostrinia nubilalis* Hüber. Azadirachtin, a triterpenoid extracted from the Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss, has been recognized for years for its antifeedant and growth regulation properties on different insect species.

The results have shown that: (1) H_2 -AZA reduces the growth and affects the development of the ECB; (2) the elimination of the tracer within the feces takes between 12 to 24 hours following an oral or topical treatment; (3) the gut, the carcass and the fat bodies are subject to the highest accumulation of tracer for an oral treatment; the gut and the carcass present the highest accumulation of tracer for a topical treatment; (4) the penetration of tracer in the cuticle takes place rapidly, within the first 12 hours after topical treatment; and (5) dillapiol and piperonyl butoxyde, two polysubstrate monooxygenase (PSMO) inhibitors, increase the toxicity of H_2 -AZA for the ECB.

This study contributes to the understanding of how *O. nubilalis* reacts to the introduction of a substance like azadirachtin within its body and of how this molecule acts on the insect.

1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE

1.1. INTRODUCTION

1.1.1. Culture et agriculture

1. Généralités

La protection des cultures contre les dommages causés par les insectes phytophages est un des plus grands défis à relever. A cette fin, les insecticides synthétiques ont rendu d'immenses services pendant plusieurs années. Leur utilisation systématique est par contre remise en cause depuis quelques décennies déjà, parce que ces produits sont le plus souvent persistants et non-spécifiques et qu'ils engendrent ainsi plusieurs conséquences néfastes sur les écosystèmes et sur le bien-être des organismes qui y vivent. Une prise en charge plus globale des systèmes agricoles peut mener au développement de stratégies différentes et moins dommageables pour lutter contre les insectes ravageurs de cultures. L'utilisation d'insecticides d'origine végétale est un des moyens envisagés parce que ces substances sont souvent moins persistantes et ont un spectre d'action plus limité que les insecticides conventionnels. Elles font fréquemment intervenir, chez les organismes visés, des mécanismes de défense particuliers, que ce soit au niveau comportemental, physiologique ou biochimique. A ce titre, l'azadirachtine, une substance secondaire extraite d'*Azadirachta indica* A. Juss, est un des insecticides botaniques les plus prometteurs. Cette recherche vise à mieux comprendre l'action de l'azadirachtine chez un insecte phytophage ainsi qu'à éclaircir les mécanismes

utilisés par l'insecte pour faire face à la présence de telles substances dans son organisme.

2. Histoire du contrôle chimique et détérioration des systèmes agricoles.

Pour fournir à la demande alimentaire toujours croissante, tout en restant économiquement viables, les pratiques culturales ont dû être modifiées considérablement. Avant 1939, soit avant la 2^e guerre mondiale et l'avènement du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), les insecticides étaient utilisés à plus petite échelle et leurs impacts peu connus (McEwen et Stephenson, 1979). La protection encourue par le DDT jusqu'au début des années 70 a entraîné la prolifération de substances toutes plus efficaces les unes que les autres. Avec les années, les monocultures à grande échelle et l'utilisation massive de pesticides organiques synthétiques sont devenus les principaux piliers des systèmes agricoles et en même temps, les raisons majeures de leur détérioration et de leur déséquilibre (Sharma, 1982; Ahmed, 1986).

Cette façon de faire a en effet créé des écosystèmes idéaux à l'introduction de pestes qui trouvent nourriture et abris en abondance et à bon compte sans qu'elles aient besoin de le rechercher (Strong et al., 1984).

Malgré que ces substances amènent une protection très efficace contre les insectes ravageurs, qu'elles permettent une qualité esthétique des produits difficilement imaginable autrement et qu'elles soient relativement simples à utiliser, leurs désavantages outrepassent en général largement leurs bienfaits.

A peu d'exception près, les insecticides organiques synthétiques, ont généralement un point en commun: ils agissent sur le système nerveux des insectes. Bien que très efficace, ce mode d'action a le grand désavantage d'affecter tous les autres membres du règne animal qui possèdent le même système de transmission nerveuse (McEwen et Stephenson, 1979). La destruction des insectes prédateurs et des parasites naturels ainsi que d'autres insectes non nuisibles laisse une niche écologique libre à l'implantation de nouvelles pestes. Les endroits non traités adjacents aux grandes cultures voient apparaître une dispersion plus étendue des insectes nuisibles. Les phénomènes de développement de la résistance chez les insectes se multiplient à un point tel que plus de 500 espèces d'insectes et de mites sont maintenant résistantes à tout insecticide connu (Georghiou, 1990).

Ces substances sont souvent persistantes et se retrouvent dans les sols, les eaux avoisinantes et s'accumulent dans tous les organismes de la chaîne alimentaire et des écosystèmes touchés. Les plantes traitées sont parfois elle-mêmes intoxiquées (Warthen, 1979; Attri, 1982; Sharma, 1982; Ahmed, 1986).

Les pertes économiques causées par les insectes en agriculture sont encore énormes, et ce, malgré l'application de ces insecticides fortement efficaces et très coûteux (Rembold, 1989). A plus long terme, les conséquences sur nos écosystèmes et sur la santé animale et humaine sont difficilement estimables.

3. Recherche de nouveaux moyens dans une stratégie de lutte intégrée.

Les effets et les propriétés négatifs des insecticides conventionnels ont amené les chercheurs, depuis les dernières années, à réévaluer les programmes de contrôle des insectes ravageurs de cultures et à rechercher des moyens moins dispendieux et plus sécuritaires pour l'environnement.

Le développement de l'agriculture biologique, la rotation des cultures, les bi- et pluricultures, le développement de cultivars plus résistants à l'attaque des insectes phytophages, font partie des nouveaux moyens de lutte intégrée et ont permis depuis plusieurs années déjà, d'obtenir une amélioration considérable de la santé de nos écosystèmes agricoles. Le contrôle des populations d'insectes ravageurs à des niveaux économiquement acceptables plutôt que l'élimination totale de celles-ci, fait aussi partie des nouvelles conceptions envisagées (Sharma, 1982).

Depuis une vingtaine d'années déjà, de nouvelles substances, ayant des modes d'action différents et parfois plus subtils que les insecticides synthétiques conventionnels, ont commencé à être utilisées. Produits mimant les hormones juvéniles, phéromones, régulateurs de l'oviposition, toutes ces substances agissent en dérangeant des processus vitaux plus particuliers aux insectes (McEwen et Stephenson, 1979). Certaines de ces substances sont des composés secondaires de plantes et sont souvent moins persistantes. Elles ont un spectre d'action moins étendu, principalement à cause de leur mode d'action différent, laissant le plus souvent indifférents, prédateurs naturels ou espèces non visées. Le vaste domaine des relations plantes-insectes s'est

énormément développé ces dernières années et les connaissances acquises ont permis de mettre en lumière certaines interactions coévolutives entre les substances secondaires des plantes et les insectes (Harborne, 1988). L'utilisation de ces substances dans le contrôle des insectes phytophages n'est pas nouvelle mais était beaucoup plus importante avant l'avènement du DDT et la gamme d'insecticides qui ont suivi. La pyrethrine, la nicotine et la roténone en sont des exemples bien connus et sont encore utilisés aujourd'hui à plus petite échelle (McEwen et Stephenson, 1979; Sharma, 1982; Cardellina, 1988; Elakovich, 1988; Cutler, 1988).

1.1.2. Le margousier

Azadirachta indica A. Juss (Méliacées) a suscité l'intérêt d'un grand nombre de chercheurs à travers le monde depuis plusieurs années (Attri, 1982; Schmutterer, 1990; Schmutterer, 1988; Champagne et al., 1989; Rembold, 1989; Warthen, 1989). L'abondante littérature sur les propriétés antiappétantes et régulatrices de croissance de différentes parties de cet arbre sur un grand nombre d'insectes nuisibles, témoigne de l'espoir qu'il suscite en tant que moyen de contrôle efficace dans le cadre d'un programme de lutte intégrée des populations d'insectes ravageurs de cultures.

C'est un arbre originaire d'Asie du Sud (Indes et Birmanie) qu'on retrouve aussi au Pakistan, au Sri Lanka, en Indonésie, en Thaïlande, en Afrique de l'est, en Asie du sud-est, en Australie, aux Iles Fidji et en Mauritanie. Il a été introduit en Floride, en Amérique du sud, en Amérique centrale et dans les Antilles ainsi que dans d'autres régions des tropiques où le climat est chaud et humide (Hoddy, 1986; Jacobson, 1986). Il peut atteindre 12 à 18 mètres de hauteur avec un diamètre maximal du tronc de 1.8 mètres. Il croît

dans les sols pauvres et secs où les précipitations annuelles sont de 400 à 800 mm et où il y a une saison sèche prolongée. Il ne tolère pas le froid excessif ou le gel (Warthen, 1979). C'est un arbre décidu qui croît rapidement et dont les fruits sont produits en panicules tombantes habituellement une fois par année, parfois deux. Ces fruits sont ovales et mesurent 1.4 à 2.4 cm de long et ont, lorsqu'épluchés, une pulpe jaune et sucrée qui enferme une graine brune protégée par une enveloppe blanche et dure. Les fleurs sont aromatiques, petites et blanches (Schmutterer, 1990).

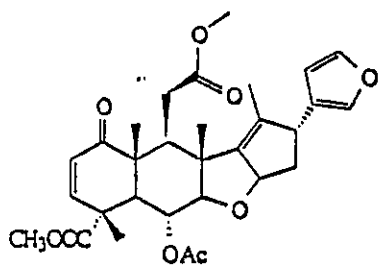
Dans la tradition indienne, le margousier est surnommé "le dispensaire du village" parce qu'il est utilisé à plusieurs fins. Les feuilles sont utilisées pour protéger les tissus de laine et les semences entreposées contre les insectes ainsi que pour le traitement de la jaunisse. On extrait de son écorce une huile avec laquelle on fait des savons et du dentifrice et on se sert des résidus de cette extraction pour fertiliser certaines cultures et nourrir le bétail et les volailles. Depuis des siècles, les Indiens boivent des infusions de fleurs et de feuilles de margousier sans aucun problème. Déjà en 1937, des scientifiques Indiens avaient découvert que la vaporisation des cultures avec un extrait des feuilles du margousier, prévenait la dévastation par les locustes. Depuis 1960, les milieux scientifiques à travers le monde ont développé un intérêt croissant pour les propriétés de cet arbre, intérêt démontré par les symposiums internationaux consacrés uniquement à la recherche concernant le margousier (Koul et al., 1990).

Plusieurs substances ont été extraites et identifiées à partir d'extrait des feuilles, de l'écorce ou des graines du margousier. La plupart sont des triterpénoïdes tétracycliques ou leurs dérivés et ont une activité biologique chez différents organismes (figure 1) (Koul et al., 1990; Van der

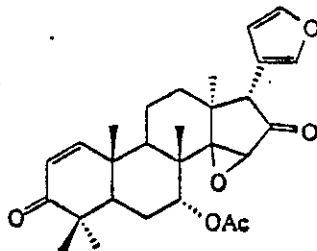
Nat et al., 1991). L'azadirachtine est jusqu'à maintenant reconnue comme étant la plus active de toutes ces substances (Isman et al., 1990a; Schmutterer, 1990; Saxena, 1989).

FIGURE 1

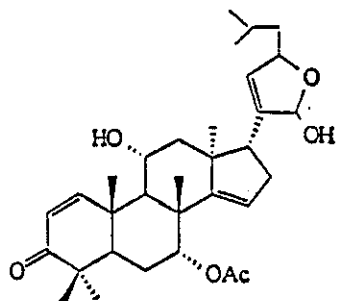
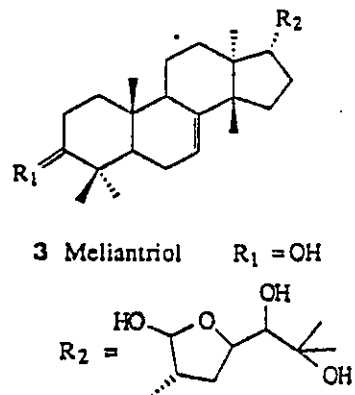
Quelques triterpénoïdes et leurs dérivés d'*Azadirachta indica*.
d'après Koul et al., 1990.



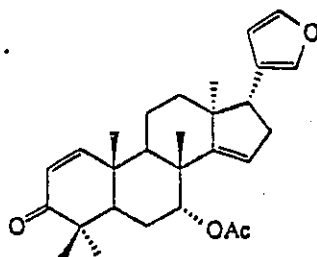
1 Nimbin



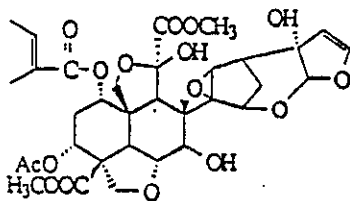
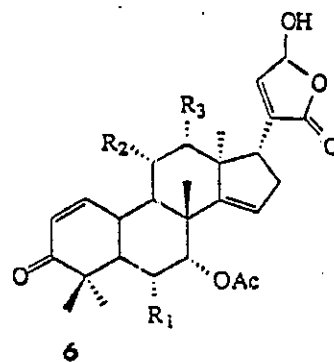
2 Nimbinin



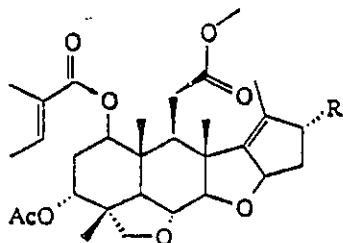
4 Azadirachtol



5 Azadirone

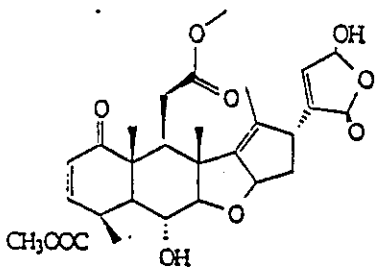


7 Azadirachtin

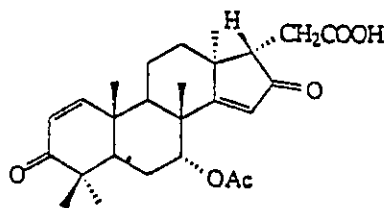


8a Salannin $R =$

8b Salannolide $R =$



9 Desacetylnimbinolide



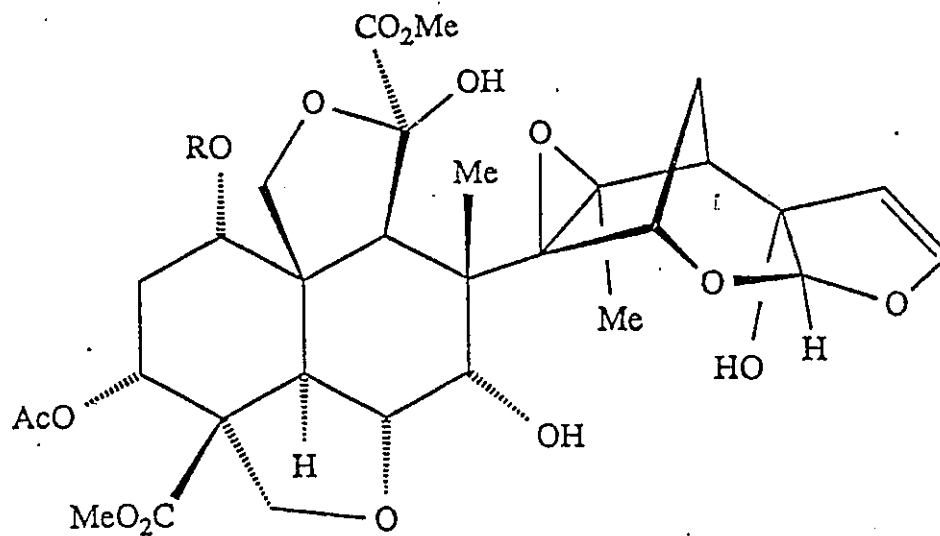
10 Nimolicinoic acid

1.1.3. L'azadirachtine

L'azadirachtine est un tétranortriterpénoïde qui a été isolé pour la première fois des graines du margousier par Butterworth et Morgan en 1968 et est considérée comme étant responsable de la régulation de la croissance et des propriétés antiappétantes (Blaney et al., 1990; Schoonhoven, 1980; 1982; Simmonds et Blaney, 1983). Sa structure moléculaire a été tout d'abord élucidée par Zanno et al. en 1975, et sa structure plus ou moins définitive, assignée par Bilton et al. en 1985 (voir aussi Bilton et al., 1987) (figure 2). Plusieurs isomères de l'azadirachtine ont été identifiés et quantifiés par chromatographie à haute pression (Rembold et al., 1984) et possèdent des propriétés qui leurs sont propres. Certaines altérations chimiques de la molécule ont été réussies; L'hydrogénation du double lien 22,23- engendre une molécule très stable avec une activité biologique similaire à celle de la molécule originale (figure 3) (Rembold et al., 1983; Morgan, 1982; Rembold et al., 1984; Yamasaki et Klocke, 1987; Barnby et al., 1989a). Certains chercheurs ont tenté de synthétiser l'azadirachtine ou des analogues ayant les mêmes propriétés biologiques (Ley et al., 1987), mais la structure hautement complexe de la molécule rend cette entreprise très difficile. Les groupements hydroxyles et le groupe tigloyl semblent nécessaires pour une activité maximale de la molécule lors de l'ingestion par l'insecte (Rembold et al., 1984; Yamasaki et Klocke, 1987; Simmonds et al., 1990). Rembold (1989) a aussi montré que le groupement époxyde est critique pour l'activité d'inhibition de la croissance.

FIGURE 2

Structure chimique de l'azadirachtine.



AZADIRACHTIN

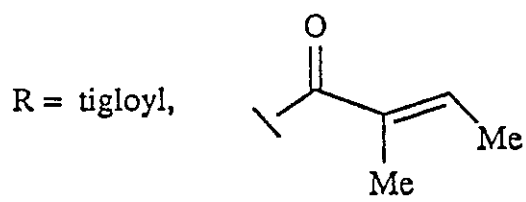
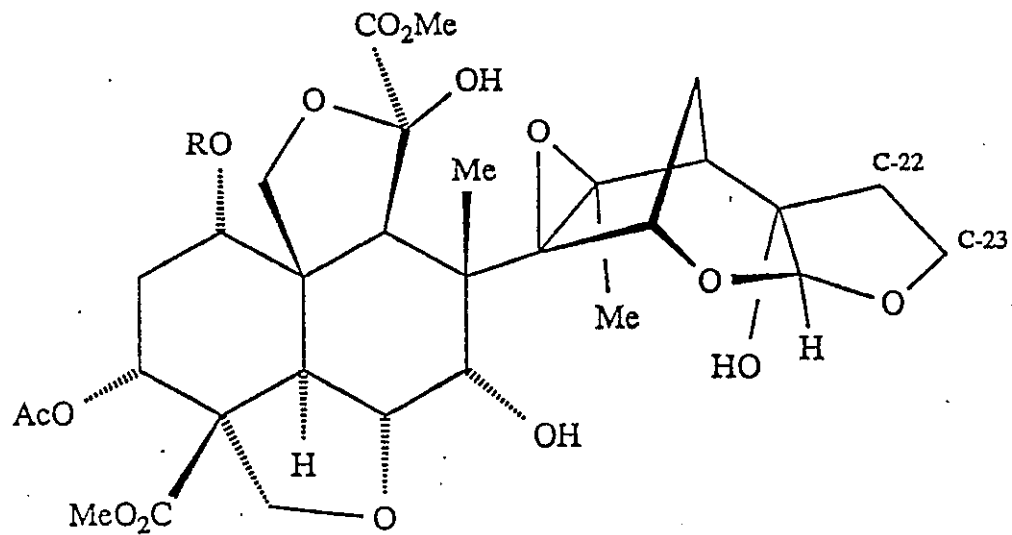
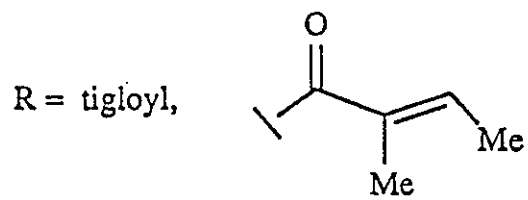


FIGURE 3

Structure chimique de l'azadirachtine dihydrogénée.



DIHYDROAZADIRACHTIN



Les effets les mieux définis de l'azadirachtine sur les insectes ont été rapportés comme étant: le délai et/ou l'inhibition de la mue au cours des stades successifs de développement, la modification du processus de mue et le délai, la modification ou l'inhibition du développement ovarien (Warthen, 1979; Attri, 1982; Kubo et Klocke, 1982; Schmutterer, 1988; Rembold, 1989). Même si on a montré que certains produits du margousier ont des effets sur des acariens, des nématodes et des virus, l'azadirachtine est considérée jusqu'à maintenant sans danger pour les animaux homéothermes (Warthen, 1979; Warthen, 1989; Schmutterer, 1990).

Plusieurs recherches ont été effectuées pour tenter d'expliquer le mode d'action de l'azadirachtine. L'hypothèse la plus plausible pour le moment est que l'azadirachtine interfère avec la régulation neuroendocrinienne des niveaux d'hormones juvéniles et de mue. L'azadirachtine inhibe *in vitro* le relâchement de l'ecdysone du complexe glandulaire cérébral annulaire (brain-ring gland complex). La biosynthèse d'ecdysone dans la glande ne semble cependant pas affectée (Koolman et al., 1988). D'autres prétendent plutôt qu'un effet de l'azadirachtine directement sur l'estomac résulterait en cette inhibition du relâchement de l'ecdysone parce que l'estomac empoisonné serait incapable de se développer suffisamment pour que la mue s'effectue avec succès (Mordue et al., 1985; Nijhout, 1981). Un estomac normal et fonctionnel est en effet essentiel pour tous les aspects de l'alimentation et de la nutrition et aussi pour enclencher le système endocrinien afin que la mue s'effectue normalement. On a aussi montré que l'azadirachtine a un effet immédiat sur le taux de division cellulaire (blocage) en inhibant la synthèse d'ARN moléculaire (Fritzsche et Cleffmann, 1987). Schmutterer (1988) rapporte une inhibition de la synthèse de chitine. Il

n'est, par contre, pas encore clair lesquels de ces effets sont directs ou indirects (Rembold, 1989).

1.1.4. Potentiel d'utilisation de l'azadirachtine et des produits du margousier.

Malgré la structure complexe de l'azadirachtine, rendant difficile, mais non impossible, la synthèse de composés analogues à des fins commerciales (Ley et al., 1989; Warthen, 1989), les qualités de cette molécule et des différents produits du margousier, valent la peine d'être considérées.

Parce que son mode d'action est différent et qu'elle agit comme un antiappétant, l'azadirachtine possède un spectre d'action beaucoup plus limité et ne détruit pas systématiquement tous les organismes présents (prédateurs et parasites naturels) (Schmutterer, 1990). De plus, parce que les extraits du margousier contiennent plusieurs substances ayant une activité biologique, la vitesse d'évolution de la résistance ainsi que les chances de voir se développer des problèmes de résistance croisée avec les neurotoxines peuvent être réduites considérablement (Völlinger, 1986).

L'azadirachtine se dégrade aussi rapidement sous exposition aux rayons ultra-violetts (Stokes et Redfern, 1982), ce qui diminue de beaucoup les possibilités d'intoxication des écosystèmes touchés et des organismes qui y vivent. L'azadirachtine est tout aussi simple à utiliser que les insecticides conventionnels et il est possible qu'elle ait une activité systémique dans la plante traitée, ce qui pourrait prévenir les applications répétées (Gill et Lewis 1971; Osman et Port, 1990). En effet, des plants de maïs traités par le sol ont vu leur niveau de dommage diminué substantiellement (Xie et al., 1991).

L'azadirachtine a surtout un rôle dans une stratégie de lutte intégrée car elle ne remplacera jamais à elle seule un insecticide organique synthétique (Schmutterer, 1990).

L'utilisation d'azadirachtine et des produits du margousier comporte par contre quelques désavantages.

En effet, à moins que l'azadirachtine ait une activité systémique dans les plantes traitées, la protection des cultures demeure imparfaite parce qu'il est difficile d'atteindre toutes les parties de la plante par vaporisation seulement. Ainsi, l'application d'azadirachtine ne résulterait pas en la mortalité systématique des insectes ravageurs visés mais plutôt, en une diminution des dommages causés. A ce titre, les attentes, et des cultivateurs à ce qu'un produit détruise tout insecte, et des consommateurs à ce que la qualité esthétique des produits soit parfaite, sont plus ou moins satisfaites. De plus, la biodégradabilité de l'azadirachtine, qualité d'une part, peut devenir un désavantage, d'autre part, si les applications doivent se faire plus nombreuses. Finalement, les coûts associés à la recherche sont tout aussi importants que pour les insecticides conventionnels (Mulkern et Mongolkiti, 1975; Radwanski, 1977; Warthen, 1979; Ahmed, 1986; Mansour et al., 1987; Schmutterer, 1988; Champagne et al., 1989; Rembold, 1989; Warthen, 1989).

1.1.5. Réponse des insectes aux insecticides et aux toxines.

S'il est important de comprendre le mode d'action d'un composé tel l'azadirachtine chez un insecte phytophage, il l'est tout autant de découvrir comment l'insecte réagit à l'introduction de telles substances dans son organisme.

Il existe différentes stratégies employées par les insectes phytophages pour franchir les barrières chimiques que

constituent les composés secondaires de plantes ou une toxine étrangère quelconque.

Le produit peut être stocké sous forme non-altérée, là où il ne dérangera pas les processus métaboliques de base, ou bien il peut être excrété sous forme non-altérée, directement dans les fèces ou l'urine. Les études toxicocinétiques cherchent à décrire le mouvement d'un produit chimique à partir du point d'entrée dans le corps jusqu'à ce que le composé parent et/ou ses métabolites aient été excrétés (Soderlund, 1979).

Lorsqu'il y a altération biochimique (détoxication), le produit est soit excrété, soit stocké sous forme altérée. C'est une stratégie importante employée par les insectes phytophages pour éviter l'intoxication par les différentes substances étrangères présentes aussi bien chez leur plantes hôtes que dans leur environnement (Millburn, 1978; Brattsten, 1979; Rosenthal et Janzen, 1979; Harborne, 1988).

Le système monooxygénase à plusieurs substrats (PSMO) est le mécanisme enzymatique le plus important, reconnu dans la détoxication des insecticides par les insectes (figure 4). Il est largement distribué chez les organismes et est connu pour son rôle dans la dégradation primaire des drogues, des pesticides et d'autres composés synthétiques. Ces enzymes sont attachés au réticulum endoplasmique des cellules en association avec une chaîne de transport d'électron, qui libère un réducteur du NADPH à l'oxydase terminale, le cytochrome P-450 (Brodie et al., 1958; Mannering, 1971; Ullrich, 1976; Nakatsugawa et Morelli, 1976; Peterson et Guengerich, 1988). Les PSMO sont localisés chez les insectes surtout dans l'estomac, les corps gras et les tubules de Malpighie (Parke, 1968; Brattsten et al., 1980). La première fonction de ce système est la conversion de composés lipophiles en métabolites plus polaires lors de l'étape I du

métabolisme (Brattsten, 1979; Agosin, 1985; Hodgson, 1985; Ahmad et al, 1986).

FIGURE 4

Représentation schématique du système enzymatique
mono-oxygénase à plusieurs substrats (PSMO),
d'après Hodgson (1985) et Iyengar (1988).

On sépare en effet le métabolisme des substances étrangères en deux étapes distinctes impliquant des systèmes enzymatiques relativement non-spécifiques. Dans l'étape I, un groupe polaire est ajouté à la molécule étrangère par catalyse à l'aide des monooxygénases microsomales. La molécule devient ainsi prête à être excrétée par l'organisme ou alors se retrouve dans l'étape II. Lors de cette deuxième étape, la molécule altérée est conjuguée à un substrat endogène pour former un produit soluble dans l'eau et est alors excrétée directement (Brattsen, 1979).

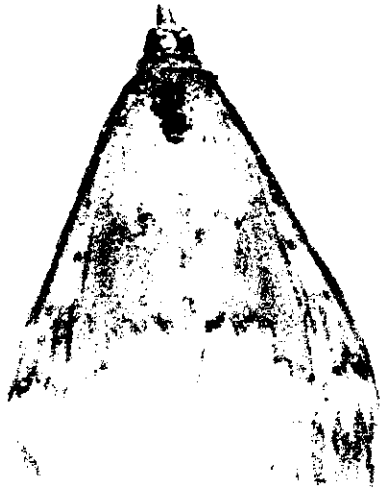
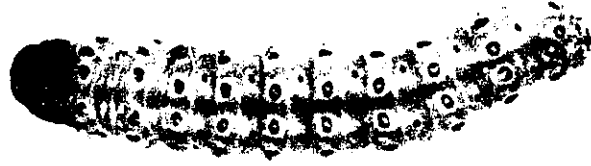
Pour vérifier si un produit toxique quelconque est métabolisé par les PSMO, on utilise en général des produits qui inhibent ou activent leur activité enzymatique, par exemple le butoxyde de pipéronyl et le phénobarbital. Ces substances représentent des outils pratiques pour déterminer les caractéristiques pharmacologiques et toxicologiques d'un produit (Brattsten et al., 1977; B-Bernard et Philogène, 1992).

1.1.6. L'insecte expérimental

La pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae), (figure 5) est l'un des insectes ravageurs du maïs (*Zea mays* L.) les plus importants en Amérique du nord comme en Europe (Hudon et Leroux, 1986; Hudon et al., 1989). Elle a été introduite d'Europe centrale et du sud vers les années 20 dans des embarquements de balais de maïs et sa répartition géographique s'est étendue rapidement puisqu'on la retrouve aujourd'hui dans 40 états Américains et 8 provinces Canadiennes, des Maritimes jusqu'en Alberta. La variété de l'est, présente deux générations par année avec diapause facultative et est polyphage tandis que plus à l'ouest, la variété n'a qu'une seule génération par année et est limitée principalement au maïs (Hudon et Leroux, 1986).

FIGURE 5

La pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner,
chenille, chrysalide, mâle et femelle (cm)
(d'après Campos, 1988; photographie P. Brunon).



Zea mays L. est de loin la plante hôte la plus importante pour cet insecte en Amérique du nord. Cependant, la pyrale du maïs est remarquablement polyphage et peut attaquer presque n'importe quelle herbacée robuste sauvage ou cultivée ayant une tige suffisamment grande pour que la chenille y entre (Hudon et Leroux, 1986; Hudon et al., 1989).

Sur le maïs, la chenille passe l'hiver en état de diapause dans les tiges ou les pédoncules du maïs. Au printemps, il y a formation d'un cocon renfermant la chrysalide et ensuite transformation en papillon. Peu après l'émergence des adultes, l'accouplement a lieu et la femelle dépose ses oeufs sous les feuilles de la plante. Pour la variété bivoltine, le cycle se répète encore une fois. Il y a 5 stades larvaires qui se nourrissent de différentes parties des plantes comme les feuilles, les panicules, les épis et les tiges. Pour le maïs, les chenilles de ce lépidoptère minent la tige ou le pédoncule de l'épi, entraînant des pertes de poids en grains pouvant atteindre 50% (Hudon et Leroux, 1986; Hudon et al., 1989).

Pour tenter de contrôler la pyrale du maïs, plusieurs moyens ont déjà été utilisés. On a entre autre essayé d'introduire certains ennemis naturels d'*O. nubilalis* (parasitoïde, prédateurs, bactéries, etc) mais aucune tentative n'a fourni jusqu'à maintenant un niveau de contrôle suffisant en absence d'insecticide. On connaît depuis longtemps l'efficacité de certaines pratiques culturales comme le hachage, l'enfouissement et le brûlage des chaumes de maïs dans les champs où hiverne la pyrale. La culture intercalée de maïs avec du trèfle rouge réduit considérablement les dommages causés par *O. nubilalis* (Lambert et al., 1987). Tout le domaine de recherche de génie génétique a aussi et est encore largement exploré et on y fonde beaucoup d'espoir. En 60 ans, on est parvenu au développement de génotypes de maïs

présentant des degrés satisfaisants de résistance pour la première génération de la pyrale et pour la variété univoltine mais ce, surtout pour le maïs de grain. Les niveaux de DIMBOA (un acide hydroxamique) dans le maïs sont fortement corrélés avec la résistance de la première génération d'*O. nubilalis* (Campos et al., 1989). Par contre, la plupart des génotypes restent encore susceptibles à la seconde génération d'*O. nubilalis*. Il n'y a donc pas encore de moyens aussi efficaces de contrôler la pyrale du maïs que l'utilisation des insecticides de synthèse, particulièrement pour le maïs sucré qu'il soit pour le marché frais ou pour la transformation (Hudon et al., 1989).

1.2. FONDEMENTS DE L'ÉTUDE

Des études ont démontré les propriétés antiappétantes et insecticides de l'azadirachtine et de produits du margousier sur *O. nubilalis* (Arnason et al., 1985; Gagnon, 1991; Meisner et al., 1985). L'azadirachtine a sévèrement réduit la croissance des chenilles à 1 et 10 ppm dans un régime méridique et a éventuellement causé 100% et 90% de mortalité à 10 et à 1 ppm respectivement. Les indices nutritionnels (AD, ECI, et ECD) ont indiqué que l'interférence de l'azadirachtine avec le métabolisme de la pyrale du maïs interviendrait après la digestion. De plus, ces mêmes indices n'ont pas révélé de tolérance chez les chenilles. L'azadirachtine n'a pas bloqué la mue de la pyrale du maïs comme elle le fait chez d'autres insectes. Il a aussi été démontré que le parasitoïde *Diadegma terebrans* de la pyrale du maïs, même s'il est affecté par l'azadirachtine, n'est pas complètement éliminé, lui permettant de poursuivre son action à la génération suivante. Des études sur le terrain au cours de trois étés consécutifs permettent d'envisager de bons résultats dans le contrôle de la pyrale du maïs avec différentes formulations d'extraits de margousier (Gagnon, 1991).

Malgré l'abondance des travaux sur l'azadirachtine, on est encore peu renseigné sur son mode d'action, son cheminement et son métabolisme dans l'insecte ainsi que sur les sites de concentrations après l'absorption (Rembold et al., 1983; Barnby et al., 1989b; Garcia et al., 1989). Élargir nos connaissances sur la toxicocinétique et le métabolisme de l'azadirachtine est donc nécessaire et peut être très utile pour le développement d'une nouvelle génération d'insecticides.

En plus de ces propriétés insecticides, les caractéristiques du margousier font que celui-ci pourrait représenter une solution intéressante aux problèmes aigus des pays en voie de désertification. Comme c'est une ressource naturelle renouvelable produisant une biomasse utilisable abondante, sa propagation et son exploitation économique pourraient être bénéfiques particulièrement aux pays en voie de développement (Philogène et al., 1987; Isman et al., 1990b).

1.2.1. Hypothèses

1. L'intérêt de l'azadirachtine comme moyen de contrôle d'insectes nuisibles tient en ce que la molécule et/ou ses métabolites ne se limite(nt) pas à des tissus particuliers chez *O. nubilalis*.
2. Les insectes phytophages tels *O. nubilalis* peuvent s'adapter à un produit toxique tel l'azadirachtine par l'excrétion, le stockage et/ou le métabolisme.
3. Certaines substances peuvent augmenter les effets toxiques de l'azadirachtine chez un insecte phytophage tel *O. nubilalis*.

1.2.2. Objectifs spécifiques

1. Déterminer la distribution de l'azadirachtine chez *O. nubilalis* (toxicocinétique).
2. Déterminer la vitesse d'excrétion de l'azadirachtine et/ou les endroits de stockage de la molécule chez *O. nubilalis*.
3. Étudier le métabolisme *in vivo* de l'azadirachtine chez *O. nubilalis*.
4. Trouver le meilleur rapport de synergisme dillapiol:azadirachtine chez *O. nubilalis*.

2. DISTRIBUTION, EXCRÉTION ET STOCKAGE

2.1. INTRODUCTION

2.1.1. Généralités

En dépit de toute l'information disponible sur l'azadirachtine et de façon générale sur les produits d'*A. indica* depuis les dernières années, les connaissances sur la distribution interne et le devenir de l'azadirachtine dans l'insecte sont encore fragmentaires tout autant que le sont les connaissances sur les processus physiologiques fondamentaux impliqués dans l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion de composés secondaires des plantes chez les insectes. La recherche dans ce domaine n'est devenue possible que récemment avec l'apparition de techniques de chromatographie extrêmement sensibles et, pour ce qui est de l'azadirachtine, avec la disponibilité de la molécule radioactive.

Chez *Locusta migratoria* L., l' $^3\text{H}_2$ -AZA a été rapidement excrétée dans les premières douze heures après une injection dans l'hémolymphe à travers l'abdomen, mais une quantité importante a été retenue dans différents tissus sous sa forme chimique originale (Rembold et al., 1986; Rembold et al., 1988).

Chez *Heliothis virescens* Fabr., 50% de la radioactivité totale recouvrable a été trouvée dans les fèces entre 24 et 72 heures après une injection orale et en moins d'une heure pour une injection directe dans l'hémocoèle. Cependant, 25% de la radioactivité totale recouvrable a été détectée dans le corps de l'insecte 72 heures après l'injection, suggérant que l'azadirachtine ou bien des métabolites de l'azadirachtine,

pourraient se lier à certains tissus dans le corps de l'insecte (Barnby et al., 1989b).

Lors d'une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire, les résultats de la croissance et du développement ont montré que la pyrale du maïs *O. nubilalis*, est fortement susceptible à l'introduction d'azadirachtine pure dans sa diète (Arnason et al., 1985). Les calculs d'indices nutritionnels ont suggéré un effet de l'azadirachtine possiblement après la digestion.

La présente section cherche à comprendre l'absorption, la distribution et l'excrétion du dérivé marqué d'azadirachtine chez *O. nubilalis* lorsque celui-ci est ingéré dans la nourriture ainsi que lorsqu'il est appliqué directement sur la cuticule. Cela permettra d'augmenter notre compréhension des mécanismes impliqués dans la susceptibilité de la pyrale du maïs à l'azadirachtine ainsi que de l'action de tel composés de plantes chez un insecte herbivore.

2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.2.1. Produits chimiques

Les graines séchées d'*Azadirachta indica* ont été fournies par le Dr. Krishnamurty de New Delhi, en Inde. L'azadirachtine (AZA) a été extraite des graines par notre équipe (J. Kaminski et J. Atkinson, département de Chimie) selon la procédure utilisée par Nakanishi (1975). Le composé pur a alors été hydrogéné selon la procédure de réduction de Butterworth et al., (1972) pour obtenir l'azadirachtine 22-23 dihydrogénée (H₂-AZA). L'azadirachtine dihydrogénée-tritiée (³H₂-AZA) a été préparée par Dr. Werstiuk en réduisant l'AZA avec du tritium généré à partir du réacteur de l'Université McMaster (Ontario). Environ 40 mg d'³H₂-AZA (2.0 Curie) ont été expédiés. Le matériel a été dilué avec du méthanol, séparé dans plusieurs fioles de 7 ml et gardé à l'obscurité à -80°C pour minimiser toute dégradation.

J. Kaminski a confirmé l'identité de l'AZA et de l'H₂-AZA par spectroscopie (FAB et RMN). Le spectre de masse du produit a amené un ion parent de m/z = 721 en utilisant la technique de bombardement rapide d'atomes (FAB).

La pureté de l'H₂-AZA a ensuite été vérifiée à l'aide d'un appareil de chromatographie à haute pression liquide (HPLC) (Perkin-Elmer) en injectant 25 µl d'une solution à 100 µg/ml dans une colonne à phase inverse de 25 cm ultrasphère-ODS (5µm) éluée isocratiquement avec le système de solvant méthanol:eau (60:40/ v:v). La pureté et l'identité de l'³H₂-AZA ont été déterminées par HPLC en injectant 25 µl d'une solution contenant environ 480 000 dpm du produit tritié et 2.5 µg d'H₂-AZA dans le même système de solvant que ci-dessus. Des fractions ont été collectées toutes les 30 secondes pendant 10 minutes pour un total de 3 injections. Les fioles

de 7 ml contenant les fractions ont été remplies avec du liquide à scintillation (EX-Scintran, BDH Chemicals Ltd.) et analysées avec un compteur à scintillation liquide (LSC) (Packard 2000 CA Tri-Carb) à l'aide d'une courbe de quench appropriée. Un graphique de la quantité de radioactivité pour chaque fraction collectée pendant la période de temps a été effectué en superposition avec le chromatogramme de l' $^3\text{H}_2$ -AZA pour permettre la comparaison des temps de rétention respectifs.

Avant chaque expérience avec l' $^3\text{H}_2$ -AZA, la nature chimique du produit a été vérifiée par chromatographie sur couche mince (TLC). Le matériel tritié était appliqué avec l' $^3\text{H}_2$ -AZA sur un chromatogramme de 100 μm d'épaisseur (Kodak #13181, gel de silice avec indicateur fluorescent). Le système de solvant utilisé était Hexane:Acétate d'éthyle:Méthanol (3:1:0,1/v:v) et amenait un R_f de 0,64. Après visualisation de l' $^3\text{H}_2$ -AZA, des bandes de 5 mm étaient coupées et placées dans des fioles à scintillation de 7 ml avec du liquide à scintillation et subséquemment analysées par LSC. La quantité maximale de radioactivité était retrouvée à la distance de migration correspondant au R_f de l' $^3\text{H}_2$ -AZA.

2.2.2. Insectes et maintenance de la culture

Les oeufs d'*O. nubilalis* ont été originellement fournis par M. Hudon de la station de recherche d'Agriculture Canada à St-Jean, Québec. La culture a été maintenue dans nos laboratoires selon le protocole décrit par Guthrie et al. (1971) dans un environnement contrôlé à 25°C pour 16 heures d'éclairage (100 W/m²) et à 19°C pour 8 heures de noirceur avec une humidité relative constante de 85%. Les chenilles de début du 3^{ème} stade larvaire étaient sélectionnées de la culture selon la largeur de l'enveloppe céphalique (environ

0.8 mm) et la longueur de leur corps (de 3.2 à 4.6 mm approximativement) (Hudon et Leroux, 1986). Les chenilles de début de 5^{ème} stade larvaire étaient sélectionnées de la culture en isolant dans des récipients des insectes au 4^{ème} stade avancé (capsule céphalique d'environ 1.5 mm de large et 10 mm de longueur du corps), facilement détectable par une fente médiane dans l'enveloppe céphalique. Environ 12 heures plus tard, les chenilles ayant mué étaient au début du 5^{ème} stade.

2.2.3. Études de croissance et de développement.

De l'H₂-AZA, dissoute dans de l'éthanol pur à 95%, a été incorporée à de la nourriture fraîchement préparée avant que celle-ci ne se solidifie, soit à une température d'environ 40°C. La nourriture (annexe 1) a été préparée selon le protocole décrit par Guthrie et al. (1971) à l'exception qu'elle ne contenait pas de granules de maïs afin de conserver une texture uniforme et de permettre une meilleure homogénéisation de l'H₂-AZA. La concentration finale d'éthanol dans la diète était moins de 1% pour toutes les concentrations utilisées incluant le groupe témoin. La quantité appropriée d'une solution à 0.1 mg/ml d'H₂-AZA était placée dans un récipient de verre et mélangée rapidement et vigoureusement avec la nourriture préparée. Le mélange était ensuite versé dans des moules de 1 cm³ jusqu'à refroidissement complet. La nourriture était conservée au réfrigérateur pour une période maximale de 7 jours.

Pour chaque concentration d'H₂-AZA (0, 0.1, 1.0, 2.0), des oeufs au stade de la tête noire ont été déposés sur des cubes de nourriture placés dans un contenant de verre. Lorsque les chenilles étaient âgées de huit jours, elles ont été pesées et placées individuellement selon le traitement

approprié sur un cube de diète d'environ 2 g dans des fioles de verre bouchées avec une boule de coton. Vingt chenilles pour chaque concentration ont été utilisées. Les fioles ont été gardées dans les conditions environnementales décrites à la section 2.2.2.. Le poids et la mortalité ont été notés à intervalle régulier durant la croissance et ce, jusqu'au stade adulte.

2.2.4. Effets de l' H_2 -AZA appliqué au 3^e stade larvaire.

Afin de déterminer la meilleure concentration d' H_2 -AZA à utiliser pour les expériences de distribution, des observations ont été effectuées sur des chenilles d'*O. nubilalis* du 3^{ième} au 5^{ième} stade larvaire plus particulièrement, ainsi que sur les stades subséquents. Selon les études antérieures (Arnason et al., 1985), il était réaliste de croire que la concentration idéale se situerait autour de 1 ppm. Vingt chenilles de 3^{ième} stade ont été pesées et par la suite, traitées sur de la nourriture telle que décrite précédemment (section 2.2.3) contenant soit 1 ppm d' H_2 -AZA ou moins de 1% d'éthanol à 95% (témoin). Le poids a été mesuré tous les quatre jours et le temps nécessaire pour passer d'un stade larvaire à un autre stade (larvaire, chrysalide ou adulte) a été noté. Les insectes ont été gardés dans les mêmes conditions environnementales que celles décrites à la section 2.2.2. Certaines observations sur la croissance et le développement ont aussi été notées (Annexe 2).

2.2.5. Études de distribution par voie orale

Des chenilles ont été utilisées à leur premier jour du 5^{ième} stade larvaire pour étudier la distribution après-traitement du matériel radioactif. Les chenilles n'ont pas été nourries pendant 12 heures avant le début de l'expérience

pour éviter, en autant que possible, les effets antiappétants de l'azadirachtine. La diète traitée contenait 1 ppm d' $^3\text{H}_2$ -AZA (environ 650 000 dpm/g diète) (2.1 Ci/mme). La concentration d'azadirachtine dans la diète a été déterminée à partir d'études préliminaires (voir 2.2.4.). La concentration choisie a produit des effets significatifs (diminution de 30% du poids) sur la croissance pour la pyrale du maïs comparativement au témoin tout en évitant une mortalité élevée. Les chenilles traitées ont été tenues individuellement dans des fioles de verre fermées avec une boule de coton et ont été placées avec une quantité appropriée de nourriture traitée jusqu'à l'analyse.

Au temps spécifique après-traitement (0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, et 72 heures), les chenilles ont été tuées par congélation avec de l'azote liquide. Vingt-quatre chenilles ont été analysées par traitement et deux chenilles ont été placées ensemble pour assurer une détection suffisante du composé marqué (12 réplifications de 2 chenilles chacune).

Chaque chenille a été épinglée sur un filtre de verre (Whatman GF/C) au-dessus d'un morceau de papier ciré dans un cabaret à dissection. Une incision le long de la ligne midorsale de la chenille a permis de récolter l'hémolymphe sur le papier filtre. Un montant approprié de tampon phosphate (Annexe 3) a été utilisé pour nettoyer autant que possible l'hémolymphe du corps de l'insecte et ce liquide a aussi été récolté sur le papier filtre. Le papier filtre et le papier ciré ont été retirés et le papier filtre placé dans une fiole à scintillation liquide de 7 ml en verre. Par la suite, les tubules de Malpighie, les corps gras, l'estomac moyen (vidé de son contenu) et la carcasse restante ont été séparés et placés dans des fioles à scintillation. Afin de solubiliser les différents tissus, du Protosol (NEN) a été ajouté à ceux-ci et

les fioles ont été chauffées à 55°C jusqu'à ce que la solubilisation soit complète. Le liquide à scintillation a été ajouté aux fioles et les échantillons ont été analysés pour la distribution du composé marqué à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (TRI-CARB, Modèle 2000CA). Des corrections pour le quench ont été effectuées pour tous les tissus.

2.2.6. Études de distribution par voie cuticulaire

Des chenilles au début du dernier stade larvaire ont aussi été utilisées pour étudier la distribution de l'³H₂-AZA à l'intérieur du corps d'*O. nubilalis*. Les chenilles ont été légèrement anesthésiées avec du dioxyde de carbone (CO₂) et traitées sur le dorsum avec 2 µl d'une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) contenant 0.1 µg d'³H₂-AZA (environ 260 000 dpm) (0.84 Ci/mme). Les insectes ont été maintenus individuellement sur de la nourriture non-traitée dans des fioles à scintillation liquide de 20 ml fermées avec une boule de coton et ce, jusqu'au temps d'échantillonnage. Après les périodes d'exposition requises (0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures), chaque chenille a été rincée avec 3 ml d'acétone après que les fèces aient été retirés. La solution de rinçage constituait la quantité de radioactivité externe. Cinq chenilles ont été utilisées pour chaque période de temps. Les chenilles ont été subséquemment analysées tel que décrit à la section 2.2.5.. Les méthodes utilisées pour les études de distribution par voie orale (section 2.2.5.) et par voie cuticulaire (section 2.2.6.) ont été adaptées des méthodes décrites par Iyengar (1988) et Campos (1989).

2.2.7. Transformations des données

Les données obtenues en dpm ont été transformées en équivalent d' H_2 -AZA selon la relation entre la quantité d' H_2 -AZA pure et la quantité de radioactivité dans les solutions utilisées pour exprimer de façon plus réaliste la quantité retrouvée dans l'insecte. Lorsqu'il était plus logique de le faire, les résultats ont été présentés en pourcentage de radioactivité sur le total retrouvé et les quantités d'équivalent H_2 -AZA correspondantes ont alors été placées en annexe (annexe 5).

2.3. RÉSULTATS

2.3.1. Pureté de l' H_2 -AZA et de l' 3H_2 -AZA.

Afin de vérifier la pureté de l'azadirachtine utilisée, des analyses de chromatographie ont été effectuées. La figure 6 montre deux pics dans le chromatogramme: le premier, à 2.36 minutes, indique l'absorption du solvant et le second, à 4.85 minutes, indique l'absorption de l' H_2 -AZA. Après l'injection de 3H_2 -AZA, les collections de fractions provenant de la colonne et l'analyse de radioactivité de chacune des fractions, ont été représentées par l'histogramme sur la même figure; le pourcentage maximal de DPM a été détecté entre 4.5 et 5.5 minutes, soit un intervalle à l'intérieur duquel est inclus le temps de rétention de l' H_2 -AZA.

2.3.2. Effet de l' H_2 -AZA sur la croissance et le développement d'*O. nubilalis*.

Afin d'établir les effets de l' H_2 -AZA sur le cycle vital complet d'*O. nubilalis*, les insectes ont été traités à partir des oeufs jusqu'au stade adulte et leurs poids ont été notés à intervalle régulier. Sur la figure 7, on peut voir la diminution du poids au cours des stades larvaires lorsque la concentration d' H_2 -AZA augmente. A 16 jours, les chenilles du groupe témoin pèsent 2 fois plus que les chenilles traitées avec 0.1 ppm d' H_2 -AZA et près de 4 fois plus que celles traitées avec 1.0 ppm d' H_2 -AZA. Les chenilles traitées avec 2 ppm d' H_2 -AZA ont eu une croissance négligeable et sont mortes sans avoir dépassé le 3^{ème} stade larvaire.

FIGURE 6

Tracé de $1'H_2$ -AZA au HPLC et fractions de $1'^3H_2$ -AZA.

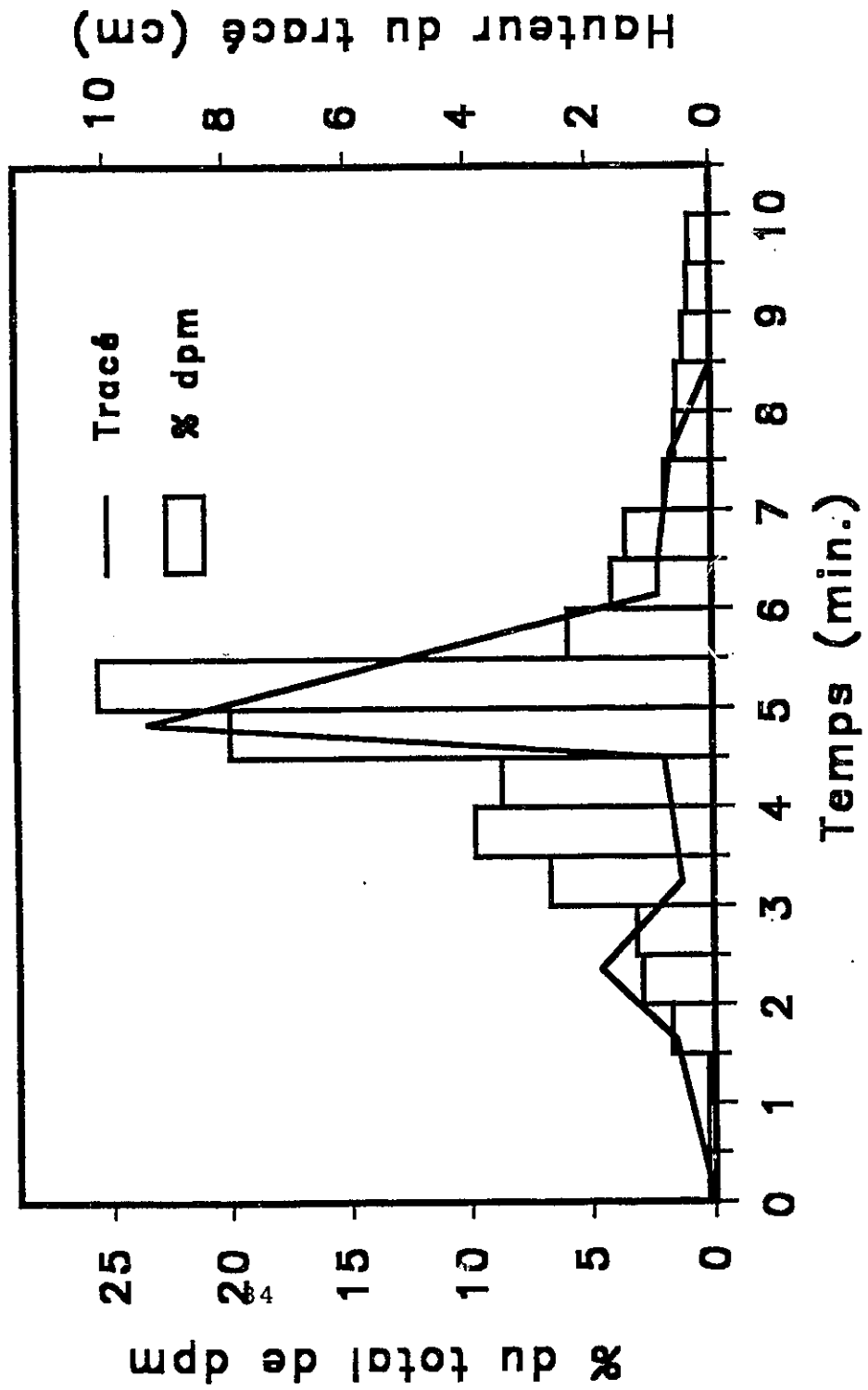
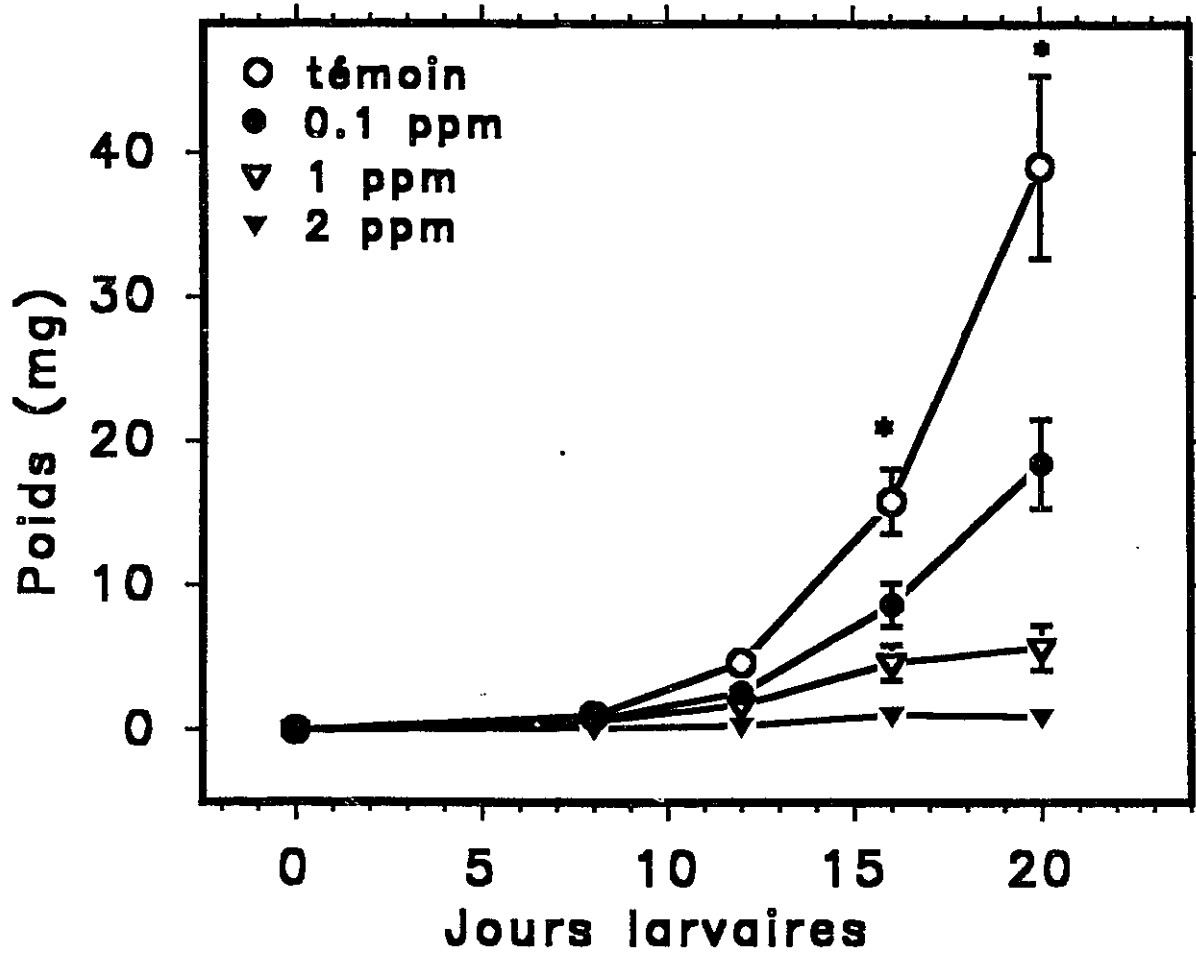


FIGURE 7

Croissance des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traitées par voie orale avec de l' H_2 -AZA. *: Significativement différent selon l'ANOVA ($F=12.88$ et 13.55 respectivement pour 16 et 20 jours, $\alpha=0.05$). Les barres représentent les erreurs-types.



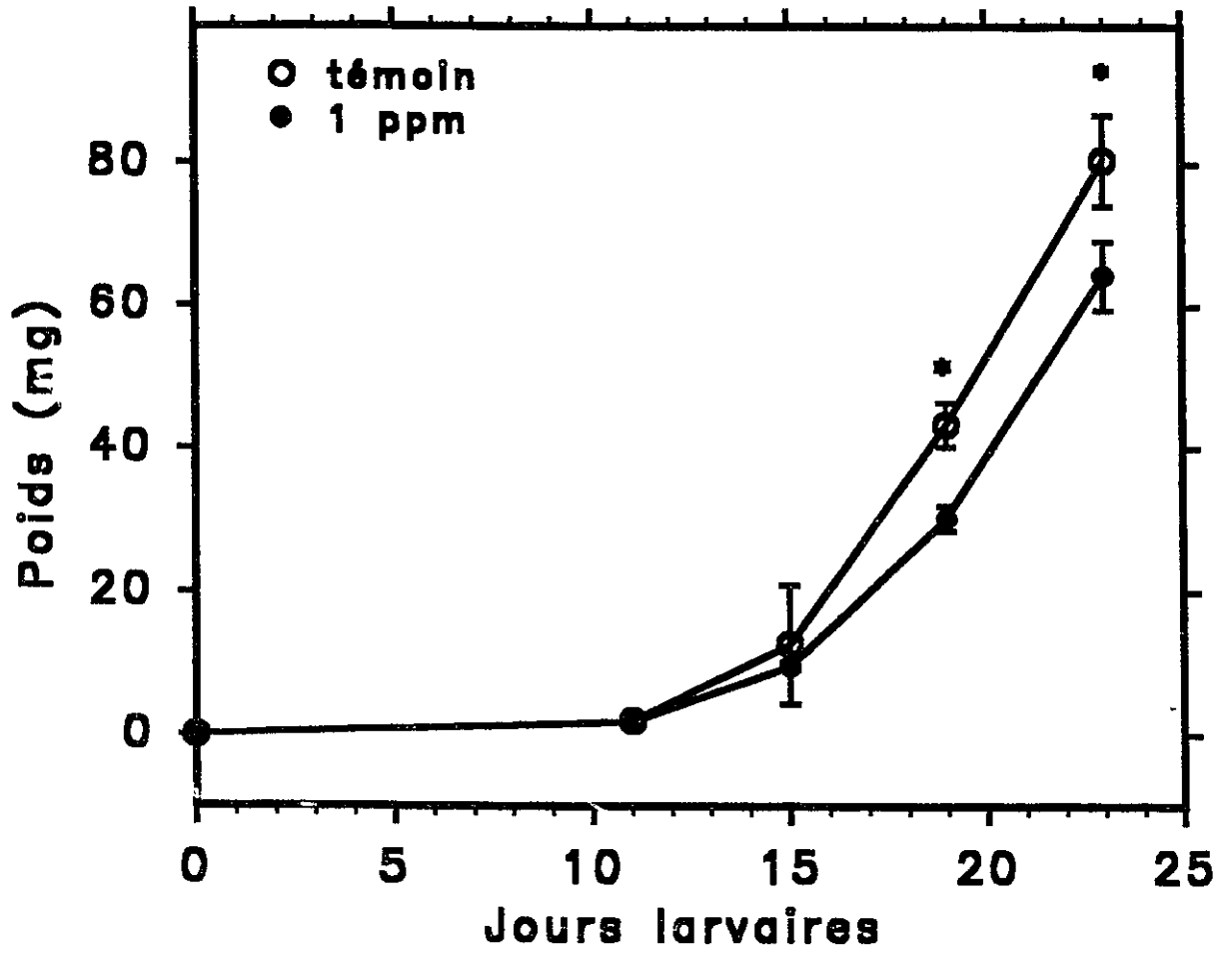
L'analyse statistique a été effectuée sur les données transformées en logarithme en base 10 pour respecter les conditions d'application de l'analyse de variance, mais, sont présentées en données non transformées, pour simplifier l'interprétation des résultats. L'analyse de variance s'est avérée significative sur la différence de poids des chenilles à 16 et à 20 jours ($F=12.88$ et 13.55 respectivement, $\alpha=0.05$). D'autres effets, semblables à ceux observés à la section suivante (voir l'annexe 2) ont été notés mais sont difficilement mesurables: malformations des chrysalides, difficulté à former le cocon ainsi que mortalité élevée des chenilles traitées.

2.3.3. Effet de l' H_2 -AZA appliqué au 3^e stade larvaire.

Afin de déterminer les effets de la concentration d'azadirachtine choisie pour l'étude de distribution, les chenilles d'*O. nubilalis* ont été traitées avec de l' H_2 -AZA du 3^{ème} au 5^{ème} stade larvaire. Le poids des chenilles traitées avec 1 ppm d' H_2 -AZA a diminué d'environ 30% comparativement aux poids des chenilles témoins (figure 8), et ce, du 19^{ème} jour larvaire jusqu'à la fin du 5^{ème} stade. L'analyse statistique a été effectuée sur les données transformées en logarithme en base 10 pour respecter les conditions d'application de l'analyse de variance, mais, sont présentées en données non transformées, pour simplifier l'interprétation des résultats. L'analyse de variance s'est avérée significative pour le poids des chenilles à 19 et à 23 jours ($F=10.57$ et 9.13 respectivement, $\alpha=0.05$).

FIGURE 8

Effet de l' H_2 -AZA sur le poids des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner du 3^{ième} au 5^{ième} stade. *: significativement différent selon l'ANOVA (F=10.57 et 9.13 respectivement, $\alpha=0.05$). Les barres représentent les erreurs-types.



Le temps nécessaire pour parvenir du 3^{ème} stade larvaire jusqu'aux stades ultérieurs de croissance est présenté dans le tableau 1. Des différences significatives apparaissent pour le 5^{ème} stade larvaire et pour le stade pré-chrysalide: dans les deux cas, la période de temps nécessaire est plus longue (Kruskall-Wallis=10.08 et 8.83 respectivement pour le stade 5 et pré-chrysalide, $\alpha=0.05$).

D'autres effets (voir l'annexe 2) ont été observés: malformation et non-émergence des chrysalides, difficulté à former la chrysalide et mortalité élevée lors du passage du 5^{ème} stade larvaire à la formation de la chrysalide. Aucun imago n'a été formé dans le groupe traité.

2.3.4. Études de distribution de l'³H₂-AZA administrée oralement à *O. nubilalis*.

La distribution du traceur radioactif chez *O. nubilalis* a été déterminée 1, 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures après l'administration par voie orale afin de mieux comprendre le mouvement de la molécule dans l'insecte et afin de savoir si elle s'accumule à certains endroits. Les résultats sont exprimés en équivalent d'³H₂-AZA et chaque point représente la moyenne de 12 réplifications de 2 chenilles chacune.

Le traceur a été trouvé en quantité variable dans tous les tissus analysés (estomac, corps gras, tubules de Malpighie et carcasse) ainsi que dans l'hémolymphe et les fèces (figure 9, 10 et 11). L'³H₂-AZA, présente dans la nourriture des

TABLEAU 1

Périodes de temps nécessaires pour parvenir aux différents stades de croissance d'*Ostrinia nubilalis* Hübner lorsque traité par voie orale avec de l' H_2 -AZA.
*: significativement différent selon Kruskal-Wallis=10.08 et 8.83 respectivement pour le 5^{ème} stade et le stade précédent la pupaison avec $\alpha=0.05$.

Temps du 3 ^{ème} stade larvaire au stade indiqué (moyenne de jours, (erreur-type), [n])		
Stade	Témoin	Traitement
4	3.85 (0.59) [20]	4.05 (0.51) [20]
5	7.63 (1.74) [19]	8.95 * (8.95) [19]
pré-chrysalide	13.50 (2.74) [14]	16.20 * (2.70) [10]
chrysalide	17.07 (3.83) [14]	—
adulte	22.73 (0.50) [11]	—

FIGURE 9

Quantité d'équivalent H₂-AZA retrouvée dans l'estomac, l'hémolymphe, les corps gras, les tubules de Malpighie et la carcasse d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traité par voie orale avec l'³H₂-AZA (1 ppm ou approximativement 650 000 dpm/g nourriture). Les barres représentent les erreurs-types.

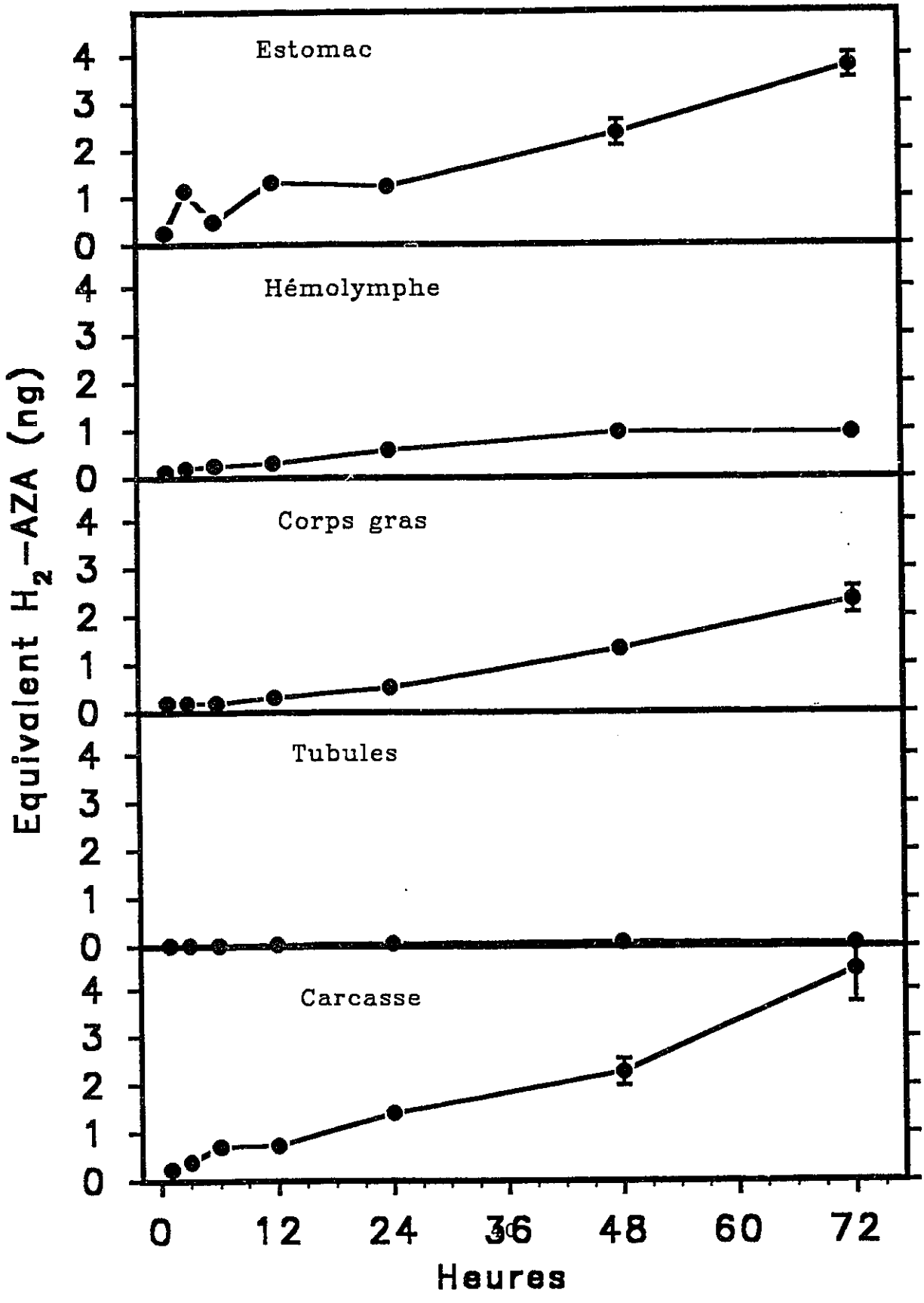
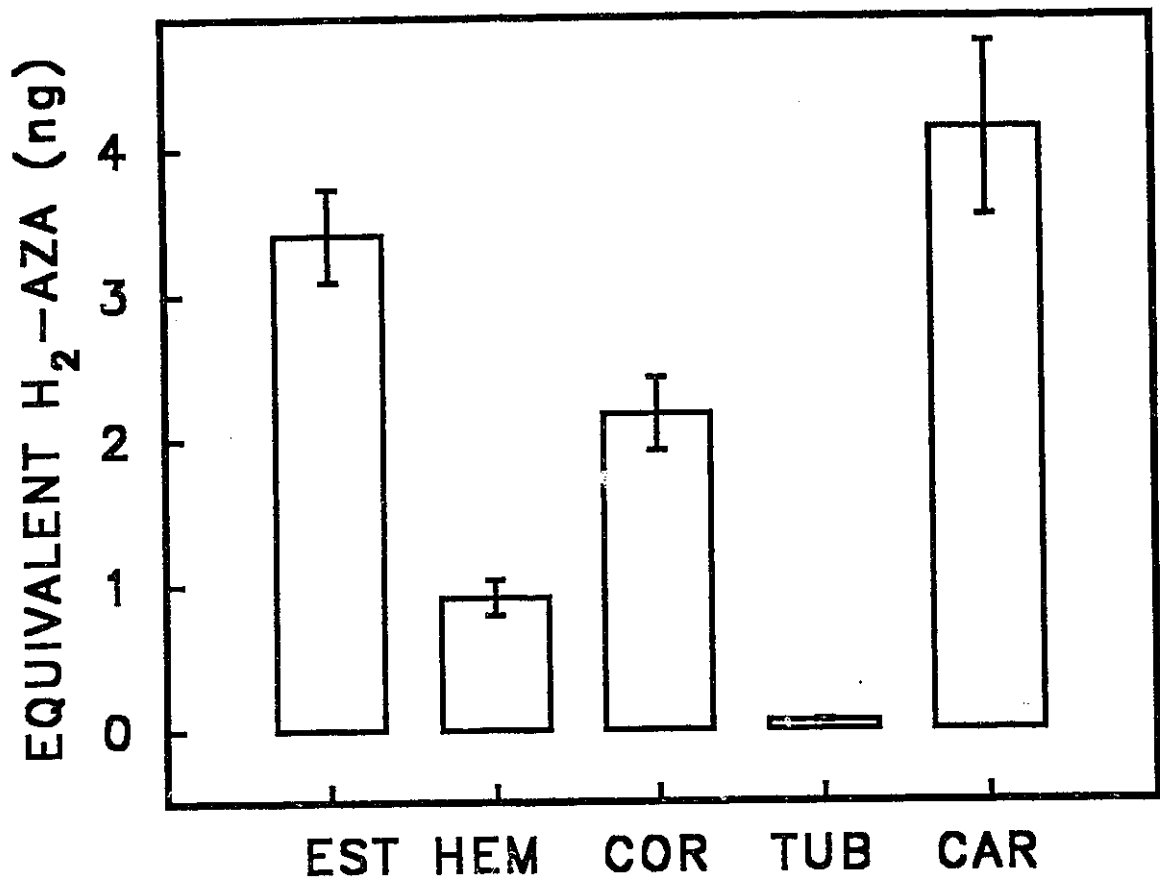


FIGURE 10

Quantité d'équivalent H_2 -AZA retrouvée dans l'estomac (EST), l'hémolymphe (HEM), les corps gras (COR), les tubules de Malpighie (TUB) et la carcasse (CAR) d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traité par voie orale durant 72 heures avec l' 3H_2 -AZA (1 ppm ou approximativement 650 000 dpm/g nourriture. Les barres représentent les erreurs-types.

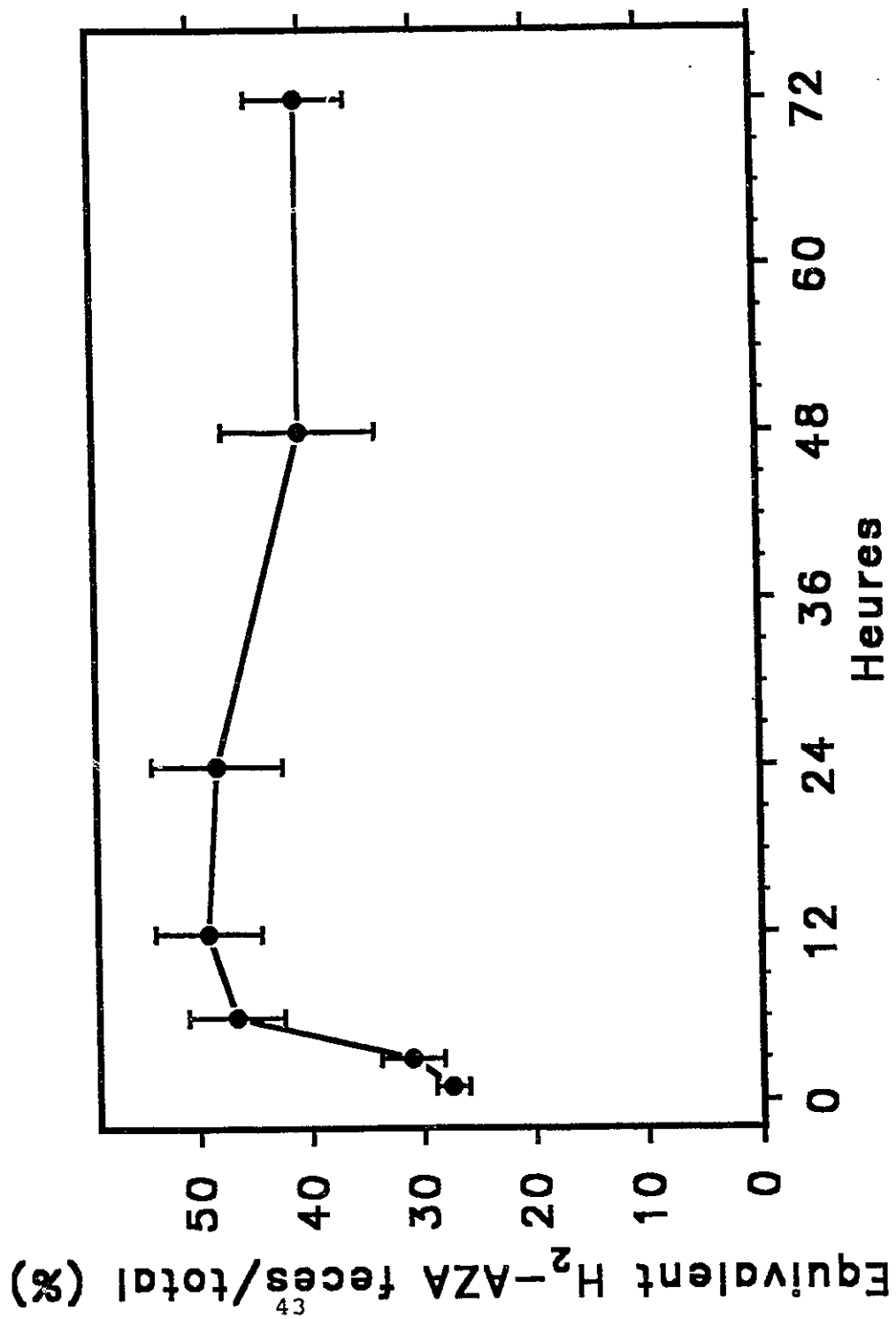


chenilles de 5^{ème} stade, se retrouve dans le contenu gastrique après ingestion par l'insecte. A partir de ce point, il n'est plus possible de savoir s'il s'agit de l'H₂-AZA sous sa forme originale ou bien d'un métabolite. Des études de chromatographie permettraient de le dire. La quantité de traceur retrouvée dans les tissus gastriques augmente de 0.26 ± 0.03 ng à 1.23 ± 0.10 ng de 1 à 24 heure. De 24 à 72 heures, cette quantité fait plus que tripler pour atteindre 3.76 ± 0.26 ng. La quantité de traceur retrouvée dans l'hémolymphe augmente progressivement entre 1 et 48 heures, passant de 0.12 ± 0.02 ng à 0.94 ± 0.14 ng, et suggère une absorption continue du produit vers la circulation systémique de l'insecte. Après 48 heures, cette quantité reste stable autour de 0.90 ng. L'absorption la plus rapide du produit dans l'hémolymphe s'effectue entre 12 et 48 heures après le traitement d'*O. nubilalis*.

Le traceur est également retrouvé dans les corps gras où il semble s'accumuler progressivement. D'abord lente entre 1 et 24 heures, l'accumulation s'effectue plus rapidement entre 24 et 72 heures passant de 0.52 ± 0.06 ng à 2.32 ± 0.28 ng en 48 heures. La carcasse présente également ce type de distribution. Il y a tout d'abord accumulation progressive entre 1 et 48 heures, la quantité de traceur passant de 0.24 ± 0.03 ng à 2.27 ± 0.28 ng, et cette quantité double de 48 à 72 heures avec 4.42 ± 0.69 ng d'équivalent H₂-AZA.

FIGURE 11

Proportion d'équivalent H₂-AZA retrouvée dans les fèces des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traitées par voie orale avec l'³H₂-AZA (1 ppm ou approximativement 650 000 dpm/g diète). Les barres représentent les erreurs-types.



La présence du produit marqué a aussi été observée dans les tubules de Malpighie mais en quantité très faible, augmentant progressivement de 0.01 ± 0.001 ng après 1 heure à 0.09 ± 0.01 ng après 48 heures d'alimentation. De 48 à 72 heures, la quantité de traceur diminue jusqu'à 0.06 ± 0.001 ng.

La figure 10 présente un histogramme qui permet de mieux visualiser la quantité d'équivalent H_2 -AZA retrouvée dans les différents tissus et dans l'hémolymphe à la fin de l'expérience, soit après 72 heures d'alimentation continue sur la nourriture traitée. La carcasse a la quantité de traceur la plus élevée avec 4.42 ± 0.7 ng d'équivalent H_2 -AZA. L'estomac et les corps gras suivent ensuite avec 3.76 ± 0.26 ng et 2.32 ± 0.28 ng respectivement. L'hémolymphe présente quant à elle une quantité appréciable du traceur avec 0.92 ± 0.14 ng d'équivalent H_2 -AZA. La présence du traceur dans les tubules de Malpighie est négligeable après 72 heures comparativement aux autres tissus avec 0.06 ± 0.01 ng d'équivalent H_2 -AZA seulement.

La quantité de traceur retrouvée dans les fèces d'*O. nubilalis* est exprimée en fonction du total retrouvé dans tous les tissus (figure 11). Puisque la disponibilité en nourriture traitée est continue, cette figure représente mieux la proportion du produit excrété en fonction du temps. Déjà après 1 heure d'alimentation, 27.4 ± 1.4 % de la quantité totale de traceur retrouvé est présent dans les fèces. A partir de 6 heures, la proportion reste à peu près stable jusqu'à 72 heures autour de 45%.

2.3.5. Études de distribution de l'³H₂-AZA administrée sur la cuticule à *O. nubilalis*.

La distribution du traceur radioactif chez *O. nubilalis* a aussi été observée 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures après l'application d'une dose unique sur la cuticule. La figure 12 représente la quantité d'H₂-AZA retrouvée sur la cuticule (rinçage de méthanol) après différentes périodes post-traitement. Elle indique la pénétration du produit dans la cuticule de l'insecte et on peut observer que celle-ci survient rapidement, soit environ entre 0 et 12 heures après l'application.

La figure 13 représente la quantité de traceur en fonction du temps d'administration pour chacun des tissus analysés et pour l'hémolymphe. La quantité retrouvée dans l'hémolymphe augmente brusquement de 0.125 ± 0.04 ng à 0.404 ± 0.3 ng d'équivalent H₂-AZA durant les premières 6 heures après le traitement, indiquant qu'il y a absorption du produit de la cuticule vers la circulation systémique. Après 6 heures, la chute est tout aussi brusque puisque la quantité retrouvée n'est plus que de 0.036 ± 0.01 ng d'équivalent H₂-AZA après 12 heures. Ensuite, la quantité de traceur retrouvée dans l'hémolymphe reste à un très bas niveau, autour de 0.01 à 0.03 ng d'équivalent H₂-AZA.

On peut observer une augmentation progressive du traceur dans les parois de l'estomac. Passant de 0.119 ± 0.05 à 0.633 ± 0.1 ng d'équivalent H₂-AZA, la pente de la figure est constante au cours du temps pour toute la durée de l'expérience, à la seule exception d'une légère augmentation

FIGURE 12

Quantité d'équivalent H₂-AZA retrouvée dans les rinçages de la cuticule des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traitées sur la cuticule avec l'³H₂-AZA (approximativement 260 000 dpm). Les barres représentent les erreurs-types.

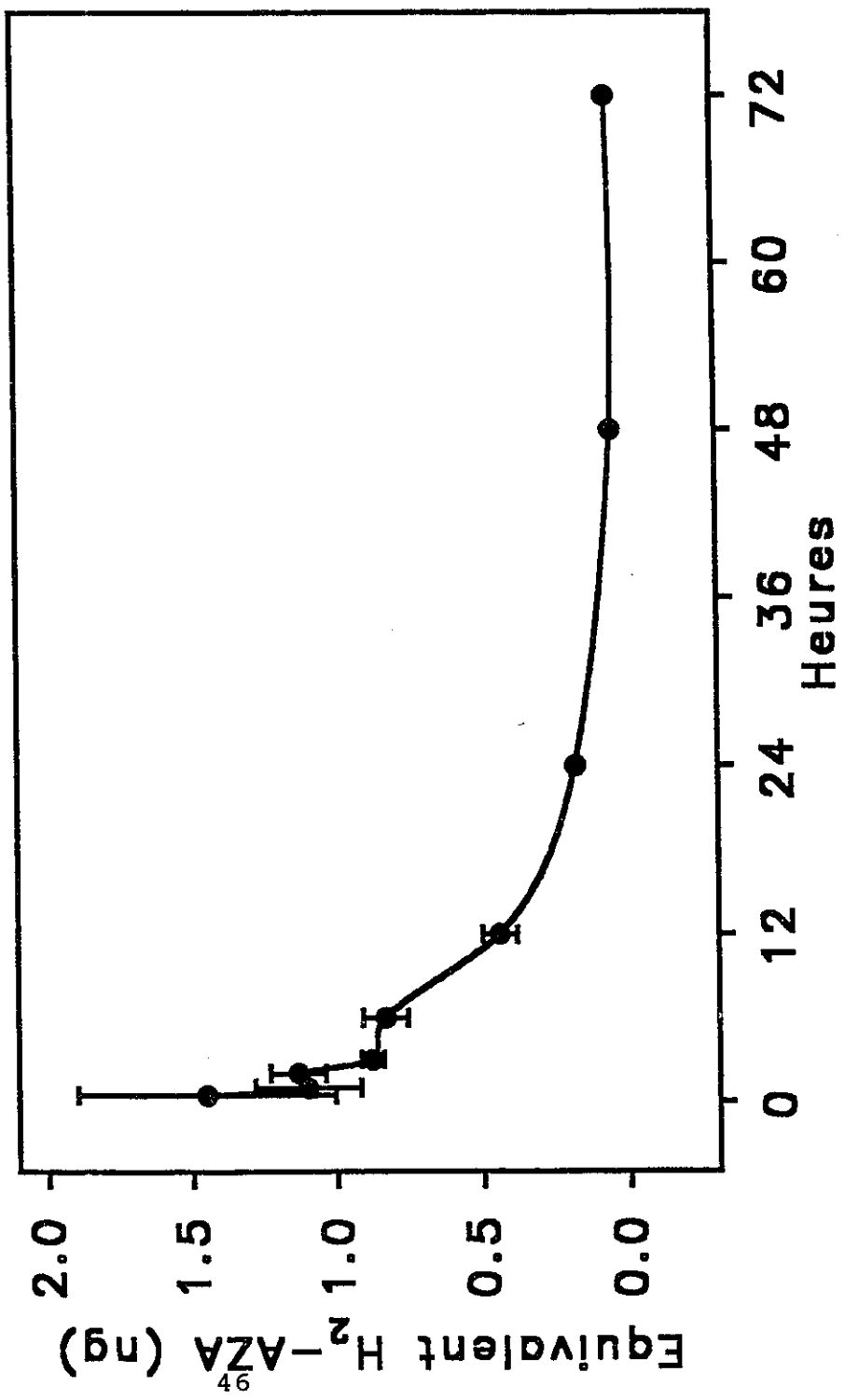
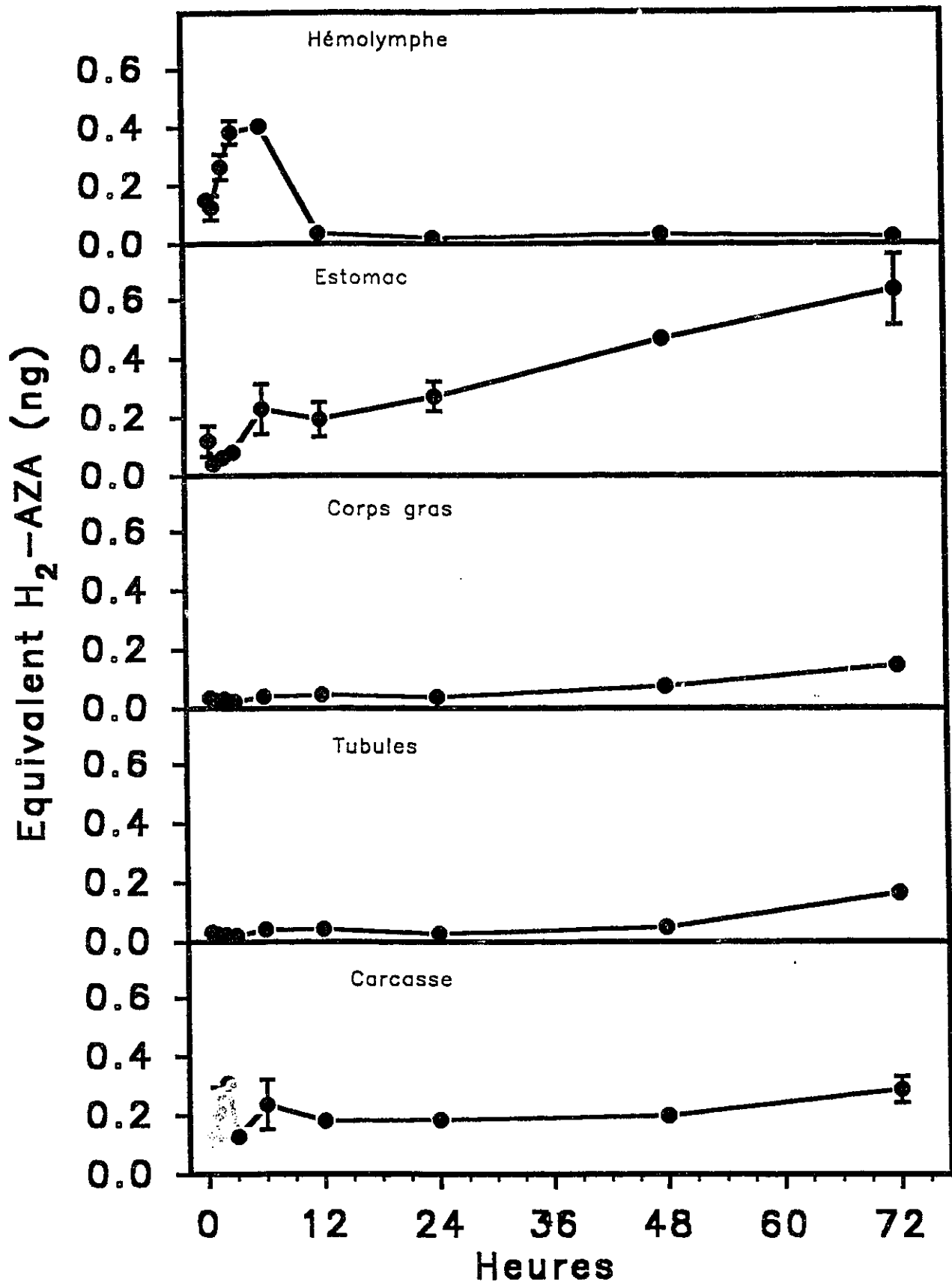


FIGURE 13

Quantité d'équivalent H₂-AZA retrouvée dans l'hémolymphe, l'estomac, les corps gras, les tubules de Malpighie et la carcasse des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traitées sur la cuticule avec l'³H₂-AZA (approximativement 260 000 dpm). Les barres représentent les erreurs-types.



autour de 6 heures, correspondant probablement au pic de l'hémolymphe. Il y a donc passage du traceur de l'hémolymphe vers les parois de l'estomac.

La distribution du traceur dans les corps gras est similaire à celle précédemment décrite pour l'estomac. L'augmentation est par contre ici un peu moins constante. De 0.5 à 24 heures, la quantité retrouvée est négligeable, entre 0.0228 ± 0.003 et 0.0461 ± 0.003 ng d'équivalent H_2 -AZA, alors qu'elle double à 48 heures et double encore à 72 heures avec un total final de 0.1461 ± 0.02 ng.

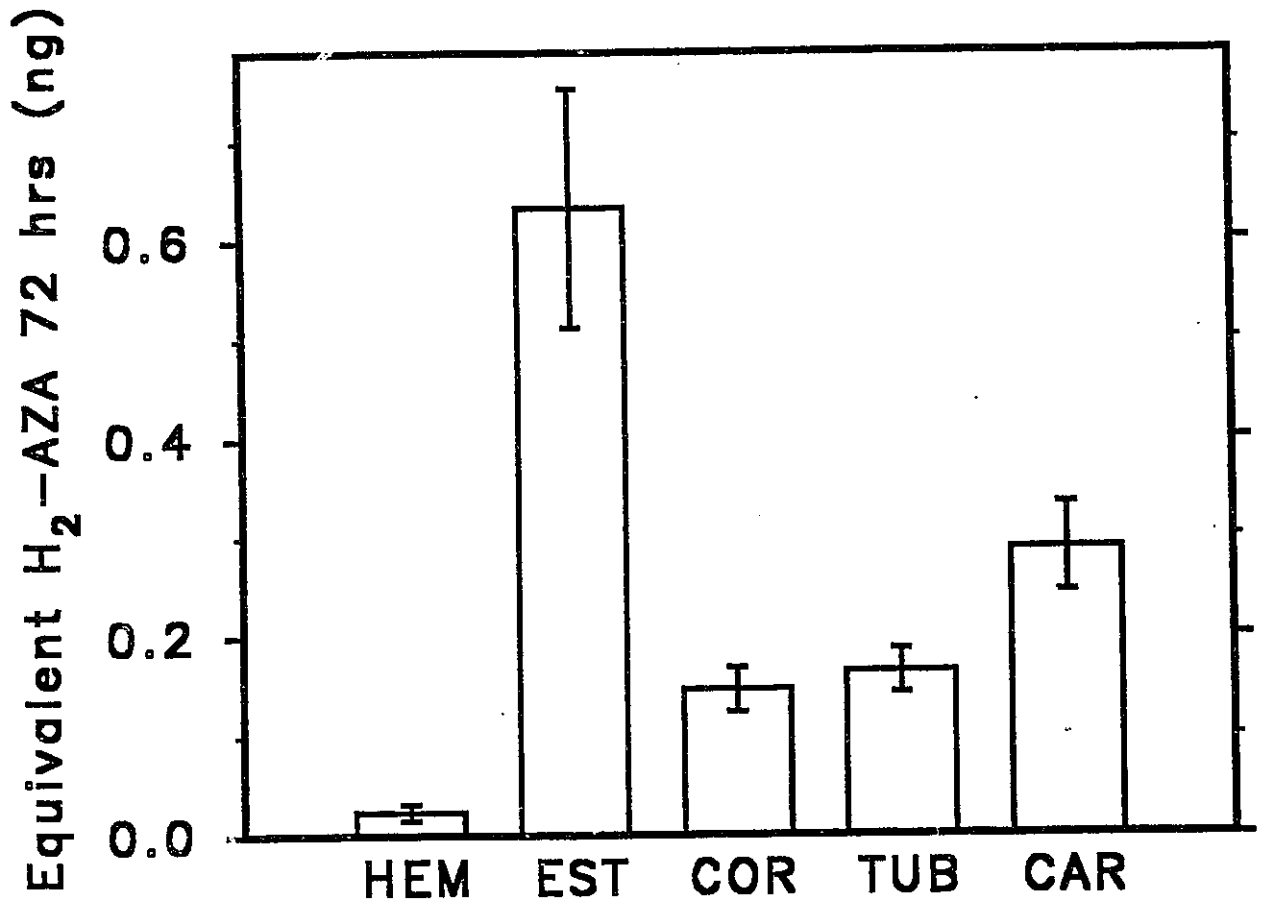
La quantité de traceur retrouvée dans les tubules de Malpighie varient de 0.0316 ± 0.002 à 0.0502 ± 0.02 ng entre 0.5 et 48 heures pour passer à 0.1646 ± 0.02 ng entre 48 et 72 heures.

Dans la carcasse, la quantité d'équivalent d' H_2 -AZA retrouvée est très variable et semble difficilement fiable.

La figure 14 indique mieux, tout comme la figure 10 de la section précédente, ce qui se passe après un temps fixe, soit après 72 heures d'application sur la cuticule, dans les différents tissus et dans l'hémolymphe de l'insecte. On peut observer que c'est l'estomac qui contient le plus de traceur avec 0.633 ± 0.1 ng. La carcasse, les tubules de Malpighie et les corps gras contiennent environ la même quantité soit entre 0.1461 ± 0.02 ng et 0.2886 ± 0.4 ng. Après 72 heures, la quantité présente dans l'hémolymphe est négligeable comparativement aux autres tissus.

FIGURE 14

Quantité d'équivalent H_2 -AZA retrouvée dans l'hémolymphe (HEM), l'estomac (EST), les corps gras (COR), les tubules de Malpighie (TUB) et la carcasse (CAR) des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner après 72 heures d'un traitement sur la cuticule avec $1^{3}H_2$ -AZA (approximativement 260 000 dpm). Les barres représentent les erreurs-types.

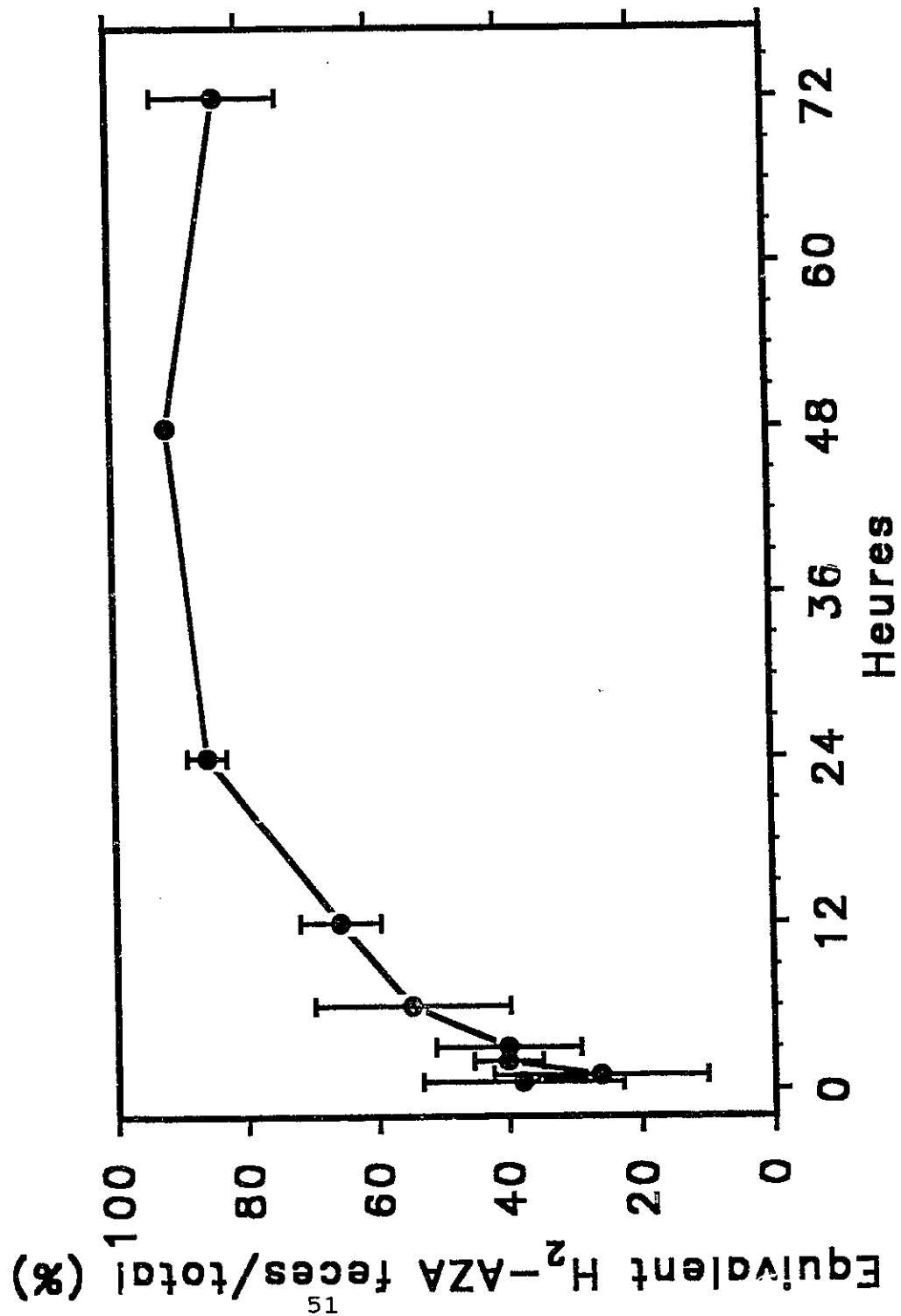


La figure 15 indique la proportion du traceur retrouvée dans les fèces par rapport au total retrouvé dans les tissus de l'insecte. C'est donc une mesure de l'excrétion du produit en fonction du temps. Il y a $37.88 \pm 1.5\%$ du total qui est éliminé après 0.5 heures seulement. Après 24 heures, on peut observer une élimination plus substantielle, de $85.82 \pm 3\%$. Par la suite, le pourcentage reste à peu près constant jusqu'à 72 heures.

L'expérience complète de distribution de l' $^3\text{H}_2$ -AZA après application sur la cuticule a été répétée une deuxième fois et des résultats très similaires ont été obtenus. La seule différence notable a été observée au niveau de la période après laquelle le traceur est retrouvé dans l'hémolymphe. En effet, la quantité maximale d'équivalent d' H_2 -AZA a plutôt été observée entre 12 et 24 heures comparativement à 6 heures ici.

FIGURE 15

Proportion d'équivalent H₂-AZA retrouvée dans les fèces des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traitées sur la cuticule avec l'³H₂-AZA (approximativement 260 000 dpm). Les barres représentent les erreurs-types.



2.4. DISCUSSION

2.4.1. Croissance et développement

Pour évaluer la toxicité d'un produit chez un insecte, l'un des moyens utilisés est d'inclure celui-ci dans son alimentation et de mesurer les effets sur différents paramètres de croissance et de développement (Berenbaum, 1986). L'H₂-AZA, introduite dans un régime méridique, a réduit considérablement la croissance d'*O. nubilalis* pendant la totalité des différents stades larvaires de l'insecte (figure 7). Arnason et al. (1985) avaient déjà observé des effets très similaires avec l'azadirachtine pure. Une diminution de l'efficacité de conversion de la nourriture plutôt que des changements de la digestibilité, avaient alors suggéré que la réduction de la croissance était due à des effets toxiques. Alors qu'un effet antiappétant important est observé lorsqu'on présente l'azadirachtine sur des rondelles de feuilles de maïs, l'indice de consommation ne change pas lorsque l'azadirachtine est administrée dans un régime méridique (Arnason et al., 1985). Des études électrophysiologiques ont montré que ce régime, à base d'agar-agar, masquerait l'effet antiappétant de l'azadirachtine (Canney et Gardner, 1988). L'H₂-AZA possède les mêmes propriétés toxiques que l'azadirachtine pure (Barnby et al., 1989a; Rembold, 1984; Yamasaki et Klocke, 1987; Rembold, 1989). La réduction de poids des insectes traités à 0.1 ppm n'avait, par contre, pas été observée précédemment par Arnason et al. (1985). Cependant, l'H₂-AZA, en étant plus stable que la molécule pure, il est possible qu'elle garde son activité biologique plus longtemps (Barnby et al., 1989a).

La croissance des chenilles de 5^{ème} stade d'*H. virescens* Fabr. (Noctuidae), un insecte polyphage, a été diminuée à des

concentrations d'azadirachtine allant de 0.03125 ppm à 10.0 ppm administrées dans un régime méridique (Barnby et Klocke, 1987). Des doses de 0.5 µg/g à 10 µg/g, injectées à des chenilles de 5^{ème} stade de *Manduca sexta* L. (Sphingidae), un insecte oligophage, ont réduit leur poids significativement (Schlüter et al., 1985). Ces résultats se comparent avec ceux obtenus lors de la présente étude.

Les observations qualitatives de symptômes toxicologiques sont elles aussi importantes. Elles peuvent donner des informations précieuses sur le site d'empoisonnement, le mécanisme d'action et les réponses défensives de l'animal à un produit toxique. Il faut par contre être prudent dans les interprétations parce que la cause de la mort ne représente pas nécessairement le mode d'action d'un insecticide ou d'un produit toxique (Matsumura, 1975).

Dans cette perspective, les effets de l'H₂-AZA sur le développement des stades larvaires et des stades subséquents d'*O. nubilalis* pourraient être expliqués par une interférence de la molécule avec la régulation neuroendocrinienne des titres d'hormones juvéniles tel que démontré pour l'AZA (Rembold, 1989; Rembold et al., 1989; Rembold, 1987; Rembold et al., 1986; Rembold et al., 1983; Koolman et al., 1988; Bidmon et al., 1987). L'azadirachtine inhibe en effet *in vitro* le relâchement d'ecdysone du complexe glandulaire cérébral annulaire (Brain ring gland complex). L'effet est dû à l'inhibition de la sécrétion et non pas à un effet sur la biosynthèse de l'hormone dans la glande (Koolman et al., 1988). Il n'est, par contre, pas encore élucidé à savoir si cet effet sur l'inhibition de la sécrétion est direct ou indirect (Rembold, 1989).

La mortalité des chenilles, les malformations des chrysalides et des adultes, ainsi que le retard à passer au

5^{ème} stade et au stade chrysalide observés ici (annexe 2; tableau 1), pourraient être le résultat de dérangements des processus hormonaux qui règlent ces phénomènes de croissance et de développement.

Gagnon (1991) a observé une élongation de la période larvaire chez *O. nubilalis* traité avec des extraits de margousier, une difficulté à former les chrysalides ainsi qu'une diminution du poids des chrysalides. Schlüter et al. (1985) ont observé ces phénomènes chez *M. sexta*, dont le développement larvaire était incomplet, le plus souvent avec des malformations des chrysalides. Barnby et Klocke (1987) ont observé aussi des malformations chez les adultes de *H. virescens* ainsi qu'une inhibition de la pupaison lorsque des doses plus fortes d'azadirachtine (5 et 10 µg) étaient injectées dans la cavité orale. Bidmon et al. (1986) suggèrent que l'azadirachtine agit sur le développement des disques imaginaires qui sont à l'origine des organes mal formés. En effet, grâce à des injections combinées d'azadirachtine et de colchicine, Schlüter (1987) observe que la mitose dans le disque épidermique imaginal des ailes des larves de 4^{ème} stade de *Epilachna varivestis* Mulsant (Coccinellidae) est affectée à partir de la métaphase et pour les phases suivantes. Un mécanisme similaire pourrait expliquer les malformations observées chez *O. nubilalis*.

2.4.2. Étude préliminaire. Effet de l'H₂-AZA administrée au 3^{ème} stade larvaire.

L'expérience a été effectuée afin de s'assurer que la concentration choisie pour les études de distribution causait un effet mesurable chez les insectes traités sans résulter en une trop forte mortalité. Chez les insectes, les premiers stades sont généralement plus sensibles à un produit toxique

que ne le sont les stades plus avancés. L'administration d'H₂-AZA à des chenilles d'*O. nubilalis* de 3^{ème} stade, nous donne de meilleures indications sur les effets du produit pour les stades plus avancés. Une diminution de 30% du poids comparativement au témoin a été considérée comme suffisamment importante (figure 8).

L'augmentation de la période de temps nécessaire pour atteindre le 5^{ème} stade larvaire et, par le fait même, le stade pré-chrysalide (tableau 1), est possiblement due à la diminution du poids des chenilles. En effet, la croissance est un des facteurs qui détermine le moment de la mue chez la plupart des insectes (Wigglesworth, 1984).

Bidmon et al. (1986) ont noté un délai pour atteindre le 3^{ème} stade larvaire lorsque des larves de *C. vicina* (Diptera) étaient injectées avec de l'azadirachtine. Ici encore, la diminution du poids ainsi que l'interférence avec le système hormonal des larves sont des explications proposées. Ces auteurs suggèrent également que la diminution du poids des pupes pourrait être due à la perte d'eau. La cuticule des chrysalides ne protégerait pas contre l'évaporation d'eau chez les insectes traités. Peut-être que les malformations observées chez les chrysalides d'*O. nubilalis* et la mortalité élevée des chenilles de 5^e stade larvaire sont causées par une trop grande évaporation de l'eau du corps de l'insecte.

Comparativement, l'introduction dans un régime méridique de MBOA et de DIMBOA (6-methoxybenzoazolinone et 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoaxazin-3-one respectivement), des produits secondaires dérivés de *Zea mays*, a augmenté le temps nécessaire à la pupaison et à l'émergence des adultes chez *O. nubilalis* (Campos et al., 1988; Campos et al., 1989). Le poids des chenilles de dernier stade n'était par contre pas affecté.

2.4.3. Distribution de l'³H₂-AZA chez *O. nubilalis* après application par voie orale

Les sections précédentes ont permis de montrer les effets toxiques de l'³H₂-AZA chez *O. nubilalis*. Le marquage radioactif de la molécule a pour but de localiser un site sensible dans l'insecte et de suggérer une voie d'accès à ce site. De plus, la toxicité d'un produit est déterminée par des barrières de pénétration (le produit ne peut pas entrer) ou par des barrières de détoxification (le produit est détoxiqué si vite qu'il n'atteint pas le site d'action sous sa forme toxique) (Renwick, 1989).

Le traceur, après avoir été ingéré dans la nourriture traitée peut emprunter principalement deux voies. Il peut traverser les membranes péritrophiques et gastriques et se retrouver dans l'hémolymphe pour la distribution dans les tissus (absorption) puis être excrété, ou encore, passer de l'estomac à l'intestin et être rejeté directement dans les fèces.

L'absorption décrit le processus impliqué dans le transfert d'un produit toxique, du site d'administration, à la circulation systémique. Afin d'entrer dans l'organisme et d'atteindre un organe cible, tout matériel doit pénétrer une ou plusieurs membrane(s) vivante(s) (Jernelöv et al., 1978). L'absorption à travers la paroi gastrique est largement déterminée par le pH de la lumière de l'estomac et la solubilité dans les lipides de la molécule toxique (Hayes, 1989). La solubilité dans les lipides est en effet reconnue comme étant le facteur principal qui gouverne le transport et la distribution des drogues dans les systèmes biologiques (Kubinyi, 1979).

Plusieurs études sur les relations entre la structure et l'activité de l'azadirachtine, ont montré que le groupement

chimique tigloyl (figure 2 et 3), un groupe lipophile, est essentiel à l'activité biologique de l'azadirachtine. Il a été suggéré que ce groupement aide dans les phénomènes de transport (Yamasaki et Klocke, 1987; Simmonds et al., 1990) permettant ainsi à la molécule ou à son ou ses métabolite(s) de passer à travers l'estomac et de se retrouver dans la circulation générale de l'insecte.

D'autres facteurs tels la microflore intestinale, les enzymes hydrolytiques, la qualité et la quantité de nourriture ingérée simultanément ainsi que d'autres activités métaboliques, peuvent également affecter la quantité de toxine qui atteint la circulation générale après administration orale (Turunen, 1985; Hayes, 1989).

Une quantité appréciable du traceur s'est fixée aux parois stomacales de l'insecte (figure 9 et 10). Celles-ci sont un site important d'enzymes de détoxification, les PSMO (enzymes monooxygénase à plusieurs substrats) (Brattsten, 1979), qui effectuent la transformation de composés lipophiles en métabolites plus polaires et donc plus faciles à excréter. La molécule d'azadirachtine possède plusieurs liaisons chimiques pouvant être brisées par ces enzymes: une liaison 5 O-méthyle (O-déméthylases), 4 liaisons ester (estérases) et un groupe époxyde (oxydase) reconnu comme étant très réactif (Yamasaki et Klocke, 1987; Simmonds et al., 1990). La grande quantité de traceur retrouvée dans l'estomac indique probablement que l'H₂-AZA est un substrat pour les enzymes de ce tissu.

Il est aussi possible que la molécule se lie aux protéines structurales de la paroi gastrique. En effet, Yamasaki et Klocke (1987), ont observé qu'en plus du site lipophile tigloyl, les groupements hydroxyles (hydrophiles) sont nécessaires à l'activité biologique de l'azadirachtine.

Dans les tubules de Malpighie, Rembold (1987) rapporte que l'azadirachtine se lie sélectivement aux membranes des tubules dans la région basale des cellules et sur la membrane nucléaire. Ces sites pourraient être le lieu de récepteurs spécifiques à l'azadirachtine, responsables de la mise en route du système endocrinien et amenant les perturbations morphologiques et comportementales observées. De tels récepteurs pourraient également être localisés au niveau des membranes stomacales.

Mordue et al. (1985) pensent que l'effet antiappétant ainsi que l'inhibition de la mue observés chez *L. migratoria* sont causés par les effets de l'azadirachtine directement sur l'estomac. Cela pourrait aussi expliquer la grande quantité retrouvée dans ce tissu chez *O. nubilalis*. Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré une réduction substantielle du taux de passage de la nourriture à travers l'estomac ainsi qu'une diminution de la fréquence des contractions de l'estomac (Mordue et al., 1985). L'intégrité de la paroi stomacale est nécessaire non seulement à la nutrition, mais aussi à une mue réussie: l'insecte doit avaler de l'air et distendre son estomac pour briser et se débarrasser de l'ancienne cuticule (Nijhout, 1981). L'azadirachtine inhibe *in vitro* la proctoline, un neurotransmetteur qui cause une contraction lente et progressive des muscles longitudinaux de l'estomac (Mordue et Plane, 1988). L'estomac empoisonné par l'azadirachtine est ainsi incapable de se distendre suffisamment pour que la mue s'effectue avec succès.

Après son passage à travers les parois de l'estomac, le traceur se retrouve dans l'hémolymphe (figures 9 et 10). De là, il est distribué à travers le corps de l'insecte. Les composés fortement liés aux protéines plasmatiques se retrouvent en grande concentration dans le plasma alors que les composés avec une grande affinité pour les tissus (comme

les protéines ou les graisses) y sont présents à très faible concentration (Hayes, 1989). Dans le cas de la molécule d' H_2H -AZA ou d'un métabolite, le groupement tigloyl pourrait favoriser la liaison aux tissus riches en lipides.

Les corps gras, en particulier, sont un site de séquestration et/ou de détoxification de produits toxiques (Duffey, 1980; Brattsten, 1979; Brattsten, 1986). L' H_2 -AZA (ou un métabolite) est peut être détoxiquée par les enzymes de détoxification des corps gras puisqu'une quantité importante de traceur y est retrouvée (figures 9 et 10). Ces tissus sont en effet riches en mitochondries et en PSMO. Il serait plutôt surprenant que l'azadirachtine y soit mise en réserve mais cela demeure une possibilité.

La carcasse contient la cuticule, le système respiratoire, ainsi que des ganglions et des nerfs. Il est difficile de tirer des conclusions intéressantes à partir de la quantité de traceur retrouvée dans la carcasse (figures 9 et 10) parce qu'une grande partie de ce traceur peut être due à la contamination lors des dissections.

Les tubules de Malpighie contiennent peu de traceur (figures 9 et 10), ce qui suggère que chez *O. nubilalis* l'excrétion de l' H_2 -AZA ou d'un métabolite ne passe pas par ces organes, contrairement à ce que Rembold et al. (1988) ont observé pour *L. migratoria*.

On retrouve dans les fèces une grande quantité du traceur (figure 11). Il est donc fort possible qu'une partie de l'azadirachtine, présente dans le contenu gastrique, soit rejetée directement dans les fèces. Cela pourrait être expliqué par la rapidité du transit intestinal (6 heures). Cependant, les fèces, lors de cette expérience, ont pu être contaminés avec la diète traitée lors du prélèvement des

spécimens. Les résultats apportés par l'application d' $^3\text{H}_2$ -AZA sur la cuticule a permis d'éviter cet écueil.

2.4.4. Distribution de l' $^3\text{H}_2$ -AZA chez *O. nubilalis* après application cuticulaire

L'application sur la cuticule permet de suivre le devenir d'une seule dose d'azadirachtine après que celle-ci ait pénétré à travers la cuticule et permet la comparaison des deux voies d'application.

La pénétration du traceur à travers la cuticule d'*O. nubilalis* se fait dans les premières heures après le traitement (0 à 3 heures) et est presque complétée après 12 heures (figure 12). Le taux de pénétration d'un insecticide à travers l'intégument des insectes dépend de la solubilité dans les lipides (Olson et O'Brien, 1963). Les composés plus hydrophiles pénètrent la cuticule des insectes plus rapidement que les composés lipophiles. Par contre, il est impératif qu'un composé soit suffisamment lipophile pour se dissoudre dans la couche lipidique externe de la cuticule mais suffisamment hydrophile pour se déplacer à l'intérieur des couches internes plus polaires de la cuticule et de là, à l'hémolymphe (Welling et Paterson, 1985). Le déclin rapide de la dose d' $^3\text{H}_2$ -AZA dans les comptes des rinçages de méthanol, indicateur de la rapidité de pénétration du traceur, peut être la conséquence de la polarité de la molécule. D'autre part, le solvant utilisé lors de l'application peut aussi affecter la pénétration (Lewis, 1980). En règle générale, la pénétration est caractérisée par 3 phases: une phase initiale très rapide dans laquelle environ 40% de la dose appliquée sur la cuticule n'est plus recouvrable par rinçage externe, suivie d'une deuxième phase dans laquelle le taux de pénétration diminue graduellement. Finalement, il y a une troisième phase

dans laquelle le taux de pénétration est proportionnel à la quantité restée sur la cuticule (Welling et Paterson, 1985). L' $^3\text{H}_2$ -AZA traverse la cuticule d'*O. nubilalis* de façon comparable à d'autres molécules. Par exemple, lorsque 83,3 ng/mg d'insecte de MBOA est appliqué localement sur l'insecte, seulement 13,8% de l'isotope ^3H était présent sur la surface de la cuticule 6 heures après l'application, ce qui montre que ce composé est rapidement absorbé. L'élimination du composé dans les fèces au 5^{ème} stade larvaire était aussi rapide, atteignant 82% en 24 heures (Campos et al., 1988).

En 72 heures, approximativement 90% de la radioactivité totale était éliminée dans les fèces (figure 15). La plupart de l'excrétion apparaît entre 48 et 72 heures. Les résultats sont similaires à ceux d'études précédentes pour d'autres insectes. Barnby et al. (1989b) ont observé plus de 50% de la radioactivité dans les fèces, une heure seulement après une injection dans l'hémocoèle d' $^3\text{H}_2$ -AZA. Après 72 heures, plus de 25% de la radioactivité était encore présente dans le corps d'*H. virescens*, suggérant que la molécule pourrait être liée à des protéines. Selon ces auteurs, cela pourrait expliquer qu'une seule dose d'azadirachtine puisse affecter la croissance et le développement chez plusieurs espèces d'insectes. La présence d' $^3\text{H}_2$ -AZA non métabolisée dans les fèces des chenilles injectées directement dans l'hémocoèle (Barnby et al., 1989b) suggère également que la molécule pourrait, soit être excrétée par les tubules de Malpighie sans être altérée, ou soit traverser la paroi de l'estomac à partir de l'hémolymphe pour se retrouver dans les fèces. Rembold et al. (1986) ont observé 68 à 82% de la radioactivité dans les fèces de *L. migratoria* après 12 heures de traitement à l' $^3\text{H}_2$ -AZA. Une quantité importante a par contre été retrouvée dans les tubules de Malpighie chez cet insecte, suggérant que la

molécule est excrétée par ces organes qui la convertirait peut-être en un métabolite plus polaire. Garcia et al. (1989) ont aussi trouvé une quantité importante du traceur dans les tubules de Malpighie, même 10 jours après l'application. Seulement 50% de la radioactivité a été excrétée durant cette même période, suggérant qu'une quantité importante reste fixée dans le corps de l'insecte.

Les figures 13 et 14 montrent la distribution du traceur pour les tissus et l'hémolymphe d'*O. nubilalis*. L'augmentation caractéristique observée dans l'hémolymphe reflète la cinétique de la pénétration cuticulaire. Le composé s'accumule rapidement dans l'hémolymphe durant les deux premières phases, atteint un plateau à la troisième phase, et puis, disparaît graduellement de l'insecte. De même, Garcia et al. (1989) observent une augmentation rapide entre 12 à 24 heures après l'alimentation de *Rhodnius prolixus* sur de l' $^3\text{H}_2$ -AZA, suivie d'un déclin graduel.

C'est l'estomac qui semble retenir le plus de traceur. Rembold et al. (1986) y ont aussi observé une grande quantité. Cette observation, jointe au fait que l'on retrouve une grande quantité de traceur dans les fèces sans en retrouver dans les tubules de Malpighie, suggèrent la fixation de l' $^3\text{H}_2$ -AZA ou d'un métabolite aux parois stomacales à partir de l'hémolymphe. Les corps gras, la carcasse et les tubules de Malpighie présentent des niveaux très faibles de tritium. L'application locale confirme donc le rôle minime chez *O. nubilalis* des tubules de Malpighie dans l'élimination de l'azadirachtine. Rembold et al. (1988) observent d'ailleurs qu'il n'y a pas de métabolisation par les tubules de Malpighie chez *L. migratoria*.

En conclusion, les résultats combinés de l'administration dans l'alimentation et sur la cuticule d' $^3\text{H}_2$ -AZA, indiquent

que la carcasse, l'estomac et les corps gras sont les sites principaux où se retrouve le traceur chez *O. nubilalis*. La présence d'enzymes PSMO dans ces tissus (estomac et corps gras) en est possiblement la cause mais des expériences supplémentaires *in vitro* nous permettraient de trancher plus définitivement cette question. Le traceur a été retrouvé dans les fèces rapidement lors des deux méthodes d'administration. Les tubules de Malpighie ne semblent pas être impliqués dans l'élimination de la molécule du corps de l'insecte. Lors de l'application sur la cuticule, la pénétration et la distribution du traceur dans l'hémolymphe se fait plus rapidement. Des études de chromatographie nous permettraient de savoir lequel, du composé parent ou d'un de ses métabolites, est retrouvé dans les différents tissus et les fèces analysés.

3. MÉTABOLISME ET SYNERGISME

3.1. INTRODUCTION

3.1.1. Généralités

Les problèmes de la résistance aux insecticides sont influencés, entre autre, par la vitesse à laquelle une molécule toxique est détoxiquée par l'insecte. Le rôle des enzymes monooxygénases à plusieurs substrats (PSMO) est bien reconnu dans la détoxification de plusieurs substances toxiques. Deux aspects de ce système font qu'il est particulièrement intéressant en tant que mécanisme de détoxification, soit son manque de spécificité en terme de substrat, ainsi que la facilité avec laquelle son taux de réaction peut être accéléré en réponse à un stress chimique (Hodgson, 1985).

Pour démontrer que les PSMO sont impliqués dans le métabolisme d'une substance toxique, on utilise en général des produits inhibiteurs ou activateurs du système enzymatique. On mesure ensuite l'effet, soit directement par la mesure de l'activité enzymatique, soit indirectement, par la mesure des changements de différents paramètres vitaux qui expriment la toxicité chez les organismes mis en présence des deux agents ensemble. En effet, un inhibiteur par exemple, en réduisant l'activité ou la quantité d'enzymes présentes, retarde le taux auquel d'autres substances allélochimiques peuvent être éliminées par l'organisme et ainsi augmente la toxicité ou prolonge le temps d'action de ces substances. Les inhibiteurs des PSMO les plus actifs et les plus souvent utilisés, contiennent un groupe méthylendioxyphényl (MDP) dans leur structure (Casida, 1970; Franklin, 1976; Wilkinson, 1976, Anders,

1968). L'inhibiteur le mieux connu et le plus utilisé des PSMO est le butoxyde de pipéronyl (figure 16).

En plus d'être un outil des plus utiles pour comprendre comment un insecte arrive à se débarrasser d'un produit toxique tel l'azadirachtine, ces inhibiteurs offrent un moyen concret pour augmenter l'efficacité de tels produits.

Il a été démontré que le dillapiol inhibe l'activité des PSMO *in vitro* chez *O. nubilalis* (Bernard et al., 1989). Le dillapiol est une substance d'origine végétale retrouvée dans certaines plantes de la famille des Pipéracées (piments et aneth par exemple) (Awasthi et Mukerjee, 1977; Bernard, 1988; Bernard et al., 1989). C'est un néo-lignan (figure 16), un type de composés naturels dont on a tiré les synergistes d'insecticides les plus efficaces tel le butoxyde de pipéronyl.

Lange (1984) a montré que le butoxyde de pipéronyl augmente l'efficacité d'extraits de margousier chez les chenilles de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera) et de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera). Le butoxyde de pipéronyl est aujourd'hui suspecté d'être carcinogène (El-Sebae, 1980) et la recherche de synergistes moins dangereux est en ce sens appropriée.

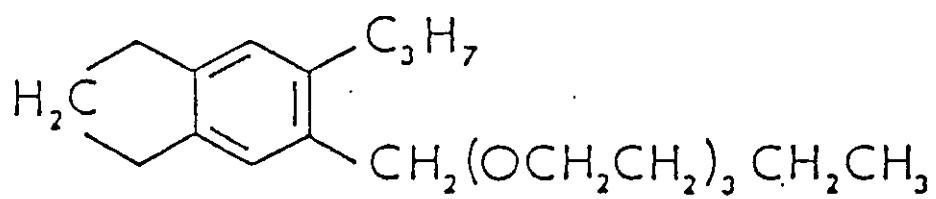
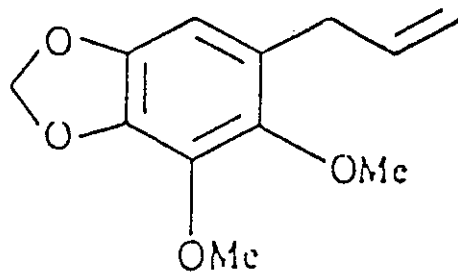
Dans ce contexte, la présente étude cherche à déterminer si le métabolisme normal de l'azadirachtine chez *O. nubilalis* est affecté lorsque l'on bloque les PSMO avec du dillapiol. Dans l'affirmative, on aurait de bonnes raisons de croire que l'azadirachtine est métabolisée par les PSMO. Les résultats permettront d'évaluer les possibilités synergistiques entre ces deux produits d'origine végétale et de mieux comprendre comment

FIGURE 16

Structure chimique du butoxyde de pipéronyl et du dillapiol d'après B-Bernard et Philogène, 1992 et B-Bernard, 1989.

Dillapiol

$M_r = 222$



Piperonyl butoxide

un insecte phytophage comme *O. nubilalis* réagit à
l'introduction de telles substances dans son organisme.

3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.2.1. Effet du dillapiol conjugué à l'azadirachtine sur la croissance et le développement d'*O. nubilalis*.

L'H₂-AZA et le dillapiol (DIL) ont été dissous dans de l'éthanol à 95% et incorporés à de la nourriture fraîchement préparée avant que celle-ci ne se solidifie, soit autour de 400 C. La nourriture a été préparée selon le protocole décrit par Guthrie et al. (1971). La concentration d'H₂-AZA choisie n'a pas causé d'effet antiappétant évident chez l'insecte, tout en ayant un certain effet sur son développement (voir section 2.3.3). Un ppm d'H₂-AZA contre 5 ppm de DIL ont été utilisés dans le traitement et les témoins respectifs.

Quatre masses d'oeufs (environ 20 à 30 oeufs par masse) d'*O. nubilalis* ont été déposés sur de la nourriture traitée dans quatre contenants différents selon le traitement. Au huitième jour larvaire, vingt chenilles ont été choisies aléatoirement dans chacun des traitements, pesées et placées individuellement dans une fiole avec un cube de nourriture du traitement approprié. Les fioles ont été recouvertes d'une boule de coton et disposées dans un cabaret dans le même incubateur (voir section 2.2.2). Le poids de chaque chenille a été mesuré à intervalle régulier jusqu'à la fin du cinquième stade et le cabaret contenant les fioles était disposé différemment dans l'incubateur après chaque pesée pour éviter un effet de l'incubateur.

L'analyse des données a consisté en une comparaison des poids moyens entre les quatre traitements pour la dernière pesée du stade larvaire, soit une analyse de variance. L'analyse de variance à deux critères de classification nous permet de considérer les effets de deux facteurs discontinus

simultanément (H₂-AZA et DIL) sur une variable d'intérêt, la variable dépendante (poids). L'analyse est de type I puisque les deux facteurs sont fixes. L'ANOVA à deux critères de classification a testé l'interaction entre les deux critères, à savoir si l'effet des deux facteurs pris ensemble est plus grand que la somme des effets des deux facteurs pris séparément (effet de synergisme). La méthode présume que chacun des deux facteurs contribue au poids pour une certaine quantité sans s'influencer l'un et l'autre. On teste donc comment les résultats s'accordent ou non avec cette présomption (Sokal et Rohlf, 1981; Zar, 1984).

Le fichier de données initial a été transformé pour permettre de distinguer les deux facteurs de classification parmi les quatre traitements effectués. La valeur 1 a été assignée pour un facteur si celui-ci était présent dans le traitement et la valeur 0 s'il était absent. Le fichier a donc été organisé ainsi, avec vingt répliquations pour chaque traitement:

	traitement	DIL	H ₂ -AZA	poids moyen
(DIL)	1	1	0	0.101
(H ₂ -AZA)	2	0	1	0.054
(DIL*H ₂ -AZA)	3	1	1	0.056
(EtOH)	4	0	0	0.099

Finalement, la valeur 0 a été attribuée arbitrairement aux poids des chenilles qui sont mortes lors de l'étude. C'était la seule façon de rendre visible l'effet du traitement dans les données. Les conditions implicites à l'analyse de variance ont été respectées en stabilisant la variance par la loi de puissance de Taylor (1961) (voir annexe 4). La transformation des valeurs s'est effectuée selon la relation $Y' = Y^{0.680}$. Le test compare la variabilité

des observations à l'intérieur d'un groupe avec la variabilité des moyennes entre les groupes. Trois hypothèses peuvent être testées simultanément: le poids ne varie pas avec ou sans AZA, avec ou sans DIL, ou peu importe le traitement. Pour savoir laquelle ou lesquelles des combinaisons entre les deux facteurs est (sont) significativement différente(s) des autres, un test de comparaison multiple a été effectué (Student-Newman-Keuls et Tukey).

3.2.2. Effet du butoxyde de pipéronyl et du phénobarbitol donnés conjointement avec l'H₂-AZA sur la croissance des chenilles de 3^e stade d'*O. nubilalis*.

Des chenilles du début du 3^e stade ont été nourries avec de la nourriture contenant 1 ppm d'H₂-AZA et soit 50 ppm de butoxyde de pipéronyl ou 50 ppm de phénobarbitol. Les produits ont été dissous dans l'éthanol 95%. La quantité d'éthanol dans la diète ne dépassait pas 1%. Vingt insectes par traitement ont été choisis aléatoirement de la culture permanente et pesés à intervalle régulier jusqu'à la période précédant la pupaison. Les insectes ont été gardés sous incubation dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 2.2.2.. Les résultats ont été soumis à une analyse de variance et à des tests de comparaisons multiples (Student-Newman-Keuls et Tukey).

3.2.3. Détermination du meilleur rapport H₂-AZA:DIL

Afin de déterminer le rapport H₂-AZA:DIL ayant un effet maximal sur la croissance d'*O. nubilalis*, différentes concentrations des deux produits ont été dissoutes dans l'éthanol à 95% et incorporées à de la nourriture

fraîchement préparée. La concentration d'éthanol dans la nourriture ne dépassait pas 1%. Vingt chenilles de 3^e stade ont été choisies aléatoirement et nourries pendant 6 jours. Leurs poids ont été mesurés au début et à la fin de cette période. Les insectes étaient gardés dans des fioles individuelles dans les conditions d'incubation décrites à la section 2.2.2.. Les résultats ont été soumis à une analyse de variance et à des tests de comparaisons multiples (Student-Newman-Keuls et Tukey).

3.3. RÉSULTATS

3.3.1. Effet du DIL et de l'H₂-AZA sur la croissance et le développement d'*O. nubilalis*.

La figure 17 présente la croissance d'*O. nubilalis* au cours de son développement larvaire lorsque l'insecte a été nourri avec du DIL et de l'H₂-AZA. Les mesures n'ont été prises que jusqu'au 14^e jour larvaire seulement parce que au-delà, la mortalité des chenilles était trop grande. L'analyse de variance a été effectuée sur ce 14^e jour. La valeur de la statistique F obtenue pour le modèle général d'analyse de variance est de 18.87 avec une probabilité associée de 0.0001. Ceci nous indique clairement que les poids ne sont pas tous les mêmes selon le traitement. Le test de comparaisons multiples permet de mieux comprendre d'où vient la variabilité (tableau 2). En effet, les tests de SNK et Tukey indiquent que les traitements DIL et éthanol ne sont pas différents; le DIL ne présente donc pas de toxicité en soi à la concentration utilisée. L'H₂-AZA a un effet à la concentration utilisée puisque ce traitement est différent du témoin avec l'éthanol seulement. Le traitement H₂-AZA*DIL est aussi significativement différent du traitement H₂-AZA et du traitement éthanol, indiquant un effet plus grand de ce traitement que pour celui de l'H₂-AZA seulement. La figure 18 permet de mieux visualiser les effets des facteurs DIL et H₂-AZA et surtout de leur interaction sur le poids des chenilles. Les intervalles de confiance à 95% sur les moyennes y sont représentés.

FIGURE 17

Croissance des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traitées par voie orale avec de l' $^3\text{H}_2$ -AZA (1 ppm) et du DIL (5 ppm). Les barres représentent les erreurs-types.

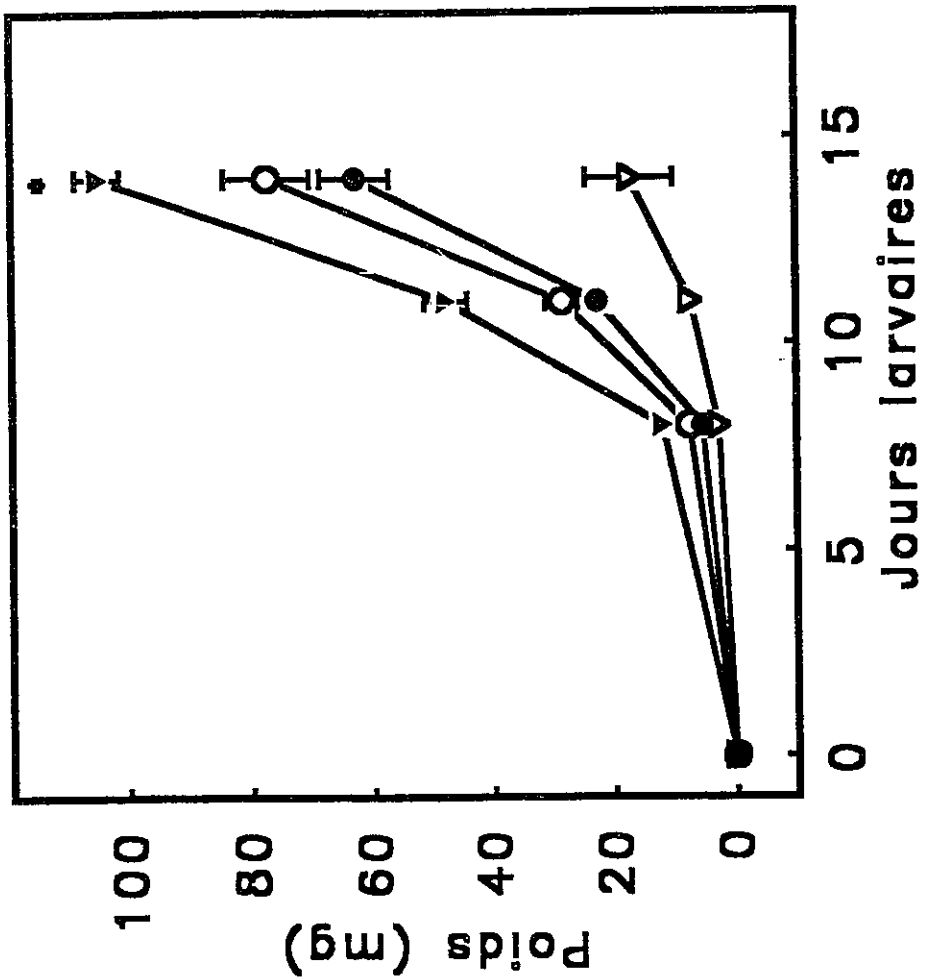
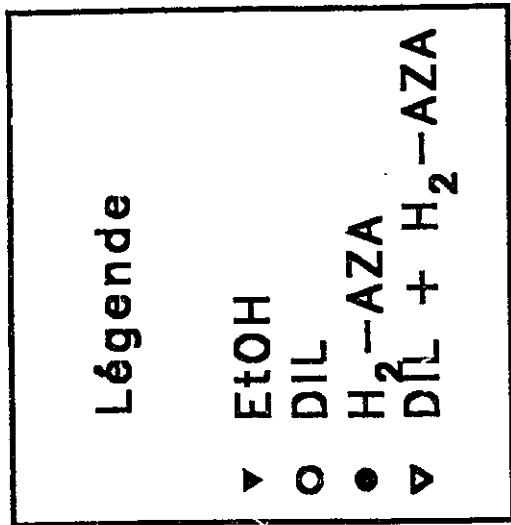


TABLEAU 2

Résultats des tests de comparaisons multiples selon Student-Newman-Keuls et Tukey pour l'interaction entre les facteurs H₂-AZA (1 ppm) et DIL (5 ppm) sur le poids des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner.

Traitement	Poids moyen (mg)	Classement selon SNK et Tukey
EtOH	170.8	A
DIL	168.5	A
AZA	111.3	B
DIL*AZA	28.3	C

On peut observer qu'en absence d'H₂-AZA dans la nourriture (AZA 0), le poids des chenilles change très peu, qu'il y ait ou non du DIL (DIL 1 et DIL 0). Par contre, lorsque l'H₂-AZA est présente (AZA 1), l'effet sur le poids est beaucoup plus grand lorsqu'il y a aussi du DIL (DIL 1) que lorsqu'il n'y en a pas (DIL 0). Il y a donc une interaction entre le DIL et l'H₂-AZA. Le DIL augmente la toxicité de l'H₂-AZA en diminuant le poids des chenilles de cinquième stade larvaire d'*O. nubilalis*.

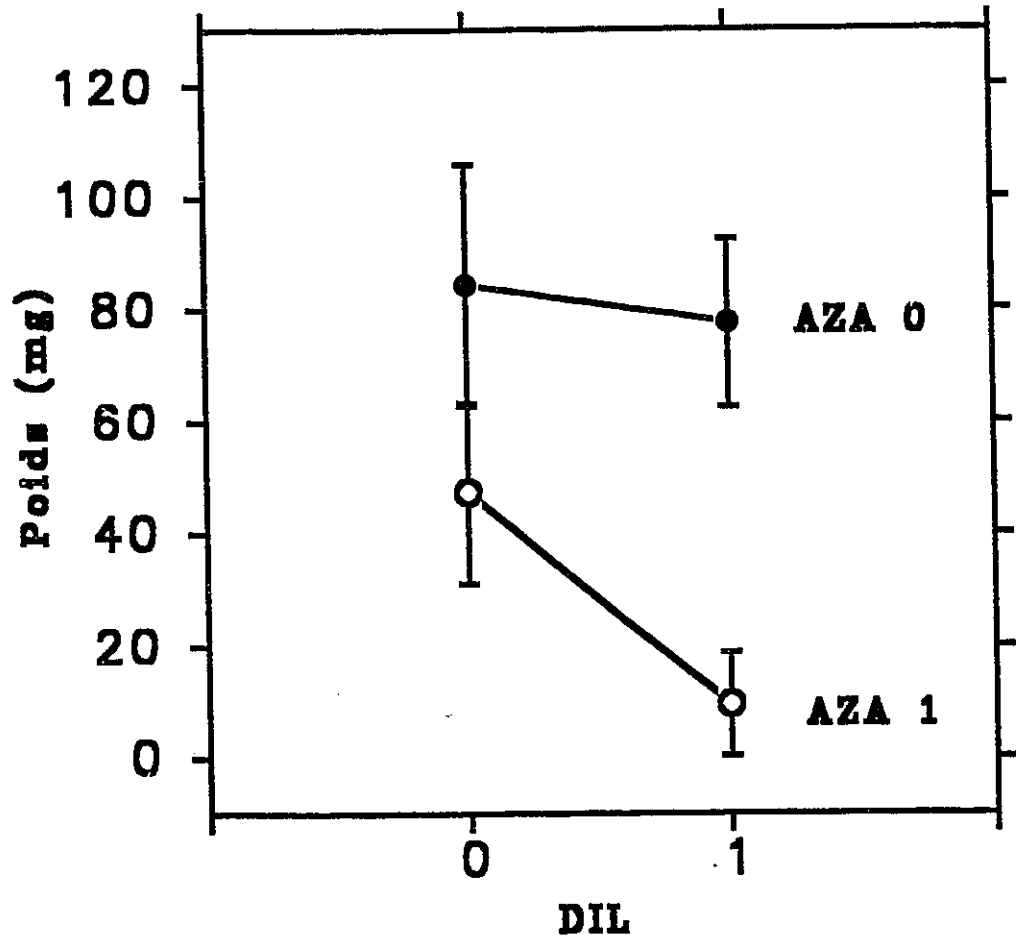
3.3.2. Effet du butoxyde de pipéronyl, du phénobarbitol et de l'H₂-AZA sur la croissance d'*O. nubilalis*.

Le butoxyde de pipéronyl et le phénobarbitol sont respectivement reconnus comme étant un inhibiteur et un activateur des PSMO et sont généralement utilisés pour montrer l'implication de ce système enzymatique dans la détoxification d'un produit toxique (Casida, 1970; Sun et Johnson, 1960).

La figure 19 présente la différence de poids entre le 1^{er} et le dernier jour du traitement pour les chenilles d'*O. nubilalis* traitées avec ces deux produits. Le butoxyde de pipéronyl, ajouté à l'H₂-AZA, a diminué la croissance des insectes plus que ne l'a fait l'H₂-AZA seulement. Le butoxyde de pipéronyl n'a pas montré de toxicité en soi. Le phénobarbitol, ajouté à l'H₂-AZA, n'a pas affecté la croissance des insectes comparativement à l'H₂-AZA seulement.

FIGURE 18

Représentation graphique de l'interaction entre les facteurs H₂-AZA et DIL sur les chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner pour l'ANOVA à deux critères de classification. 0: absence du produit dans le traitement et 1: présence du produit dans le traitement. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%.

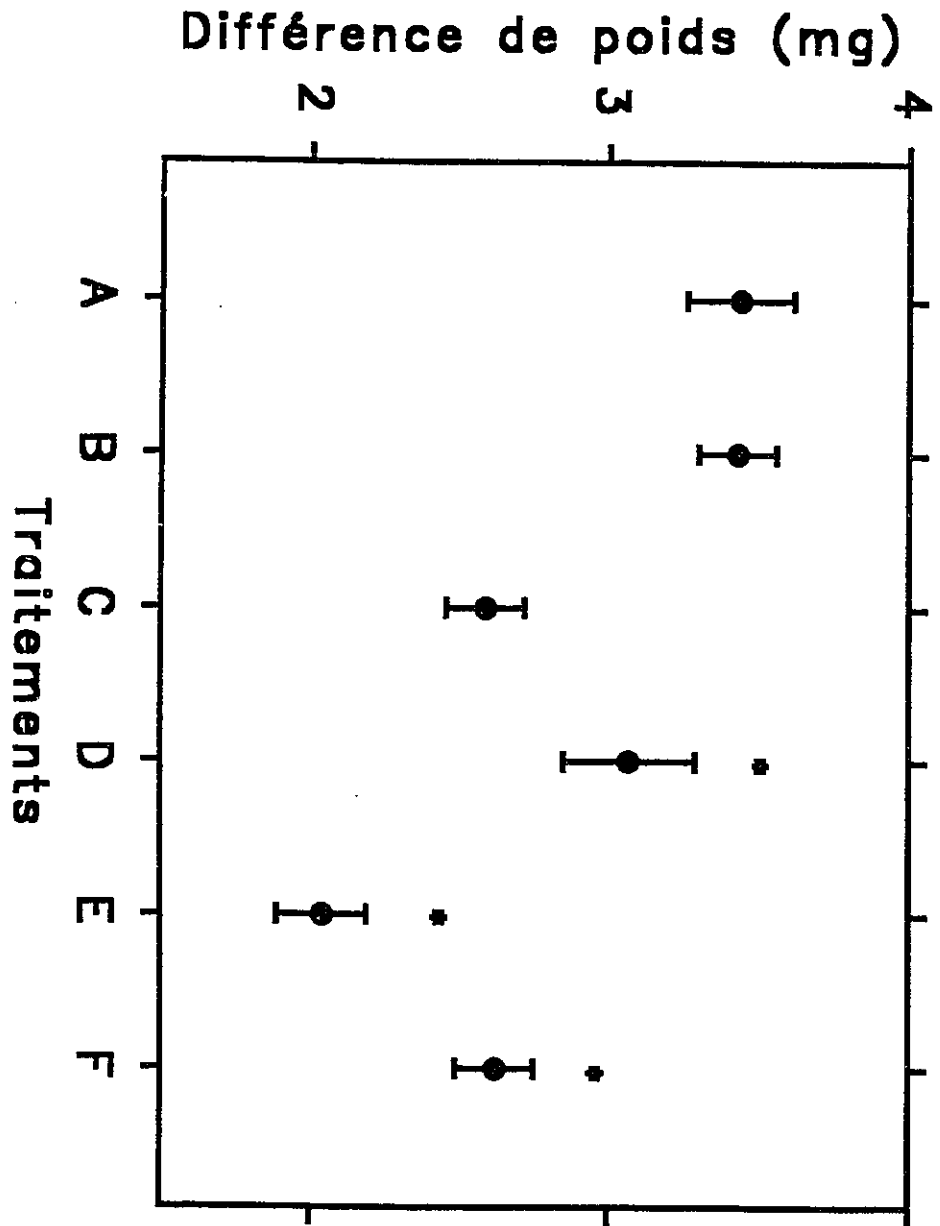


3.3.3. Meilleur rapport DIL:H₂-AZA

Différents rapports DIL:H₂-AZA ont été testés afin de déterminer le rapport pouvant affecter le plus la croissance d'*O. nubilalis* (figure 20). Les erreurs-types sont très grandes et il a été impossible d'observer une différence significative entre les 3 rapports testés. Les rapports H₂-AZA:DIL de 1:5 et de 1:10 semblent toutefois montrer une tendance d'une plus petite prise de poids par les insectes, indiquant qu'ils seraient possiblement plus efficaces.

FIGURE 19

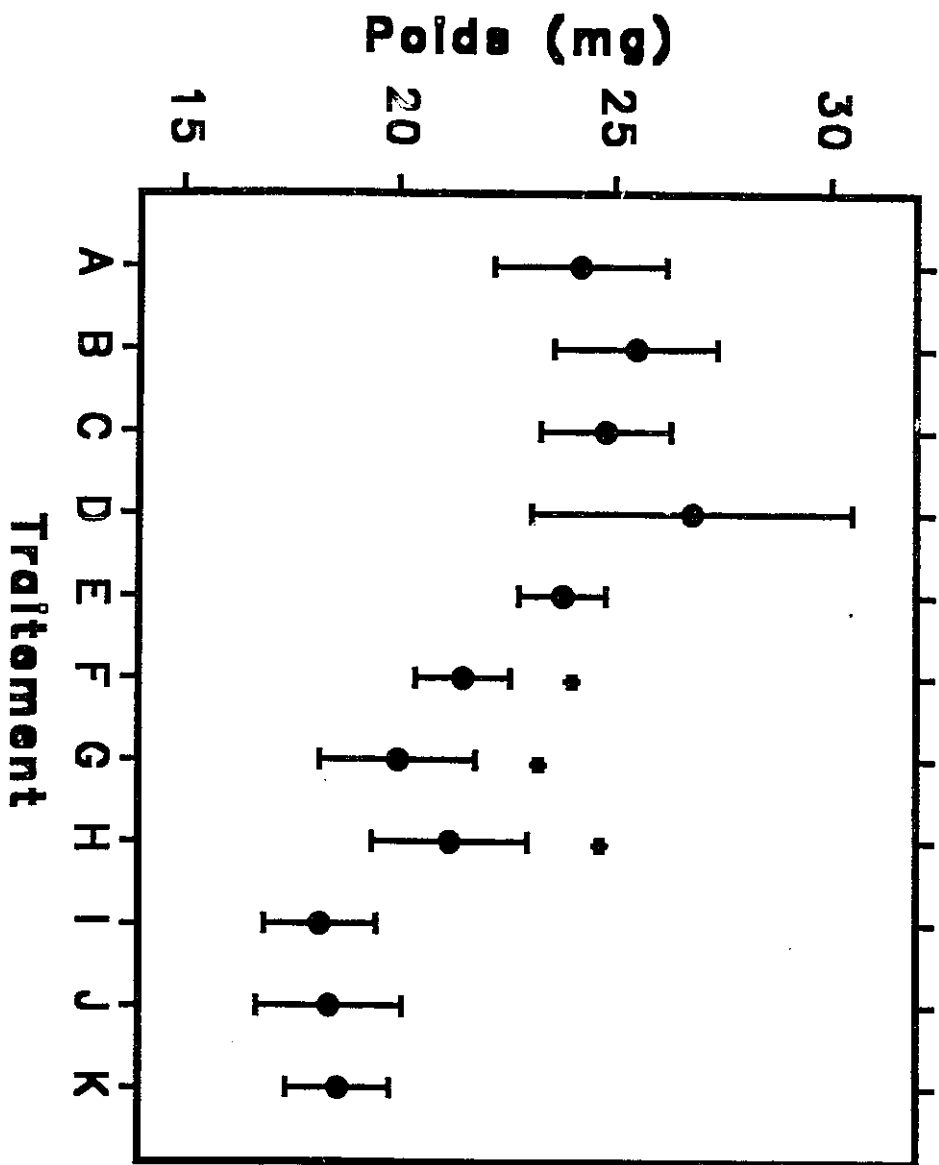
Effet sur le poids des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner du jour 6 au jour 12 de différents traitements alimentaires. Les barres représentent les erreurs-types. *: significativement différent selon ANOVA (F=20.16 et 7.86 respectivement avec $\alpha=0.05$). EtOH=éthanol, Pip. But.=butoxyde de pipéronyl (50 ppm), Phénob.=phénobarbitol (50 ppm) et H₂-AZA=azadirachtine dihydrogénée (1 ppm).



Traitements	
A	EtOH
B	Pip. But.
C	AZA
D	Phénob.
E	AZA+Pip.
F	AZA+Phén.

FIGURE 20

Effet sur le poids des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* Hübner traitées sur de la nourriture contenant différents rapports H₂-AZA:DIL (exprimés en dpm). Les barres représentent les erreurs-types. *: significativement différent selon ANOVA (F=4.38, F=3.41 et F=3.89 pour les traitements F, G et H selon leur témoin respectif avec $\alpha=0.05$).



Ratio
AZA:DIL

A	0:0
B	0:0.1
C	0:0.5
D	0:1.0
E	0.1:0
F	0.1:0.1
G	0.1:0.5
H	0.1:1.0
I	1.0:0
J	0.5:0
K	1.0:5.0

3.4. DISCUSSION

3.4.1. Effet sur la croissance et le développement d'*O. nubilalis* du DIL et de l' H_2 -AZA.

L'effet du DIL sur la croissance des chenilles d'*O. nubilalis* lorsque celui-ci est donné aux insectes conjointement à l' H_2 -AZA, indique clairement que le néolignan augmente la toxicité de l'azadirachtine (figure 17 et figure 18). Le dillapiol inhibe l'activité des PSMO chez *O. nubilalis* (Bernard et al., 1989), entraînant une diminution de la capacité de détoxification de ces enzymes pour d'autres molécules toxiques (Berenbaum, 1984). Le métabolisme de l' H_2 -AZA passe donc probablement par ces enzymes. Le dillapiol empêchant ou retardant la détoxification de l' H_2 -AZA, cette dernière est maintenue sous sa forme toxique chez l'insecte plus longtemps. D'autres molécules naturelles ayant un groupe méthylendioxyphényl possèdent des propriétés synergistiques avec des molécules naturelles ayant une activité insecticide. Par exemple la myristicine, un constituant des feuilles de plusieurs plantes de la famille des Ombellifères est un synergiste très efficace du furanocoumarine xanthotoxine. Lorsque 0.1% de myristicine est introduit dans un régime méridique chez *Heliothis zea*, la toxicité pour l'insecte est cinq fois plus grande qu'avec la xanthotoxine seulement (Berenbaum et Neal, 1985).

3.4.2. Effet du butoxyde de pipéronyl, du phénobarbitol et de l' H_2 -AZA sur la croissance d'*O. nubilalis*.

Pour déterminer l'implication des PSMO *in vivo* dans la détoxification d'un insecticide, la mesure des valeurs de DL_{50} de l'insecticide avec et sans butoxyde de pipéronyl est généralement utilisée. (Brattsten et al., 1977). Ici, une

approche différente a été employée. Le DIL est un inhibiteur, mais son innocuité n'est pas certaine chez *O. nubilalis*. Le butoxyde de pipéronyl par contre, n'est pas toxique à la dose utilisée. Le phénobarbitol quand à lui est à l'opposé, un activateur des PSMO. Chacun des composés, le butoxyde de pipéronyl, le phénobarbitol et l'H₂-AZA, seuls ou combinés, ont été ajoutés à de la nourriture et les changements dans la croissance d'*O. nubilalis* ont été mesurés. Le butoxyde de pipéronyl seul n'a pas d'effet sur la croissance des chenilles, tandis que lorsque les deux produits ont été conjointement donnés aux insectes, la croissance a été diminuée significativement (figure 19). La toxicité de l'H₂-AZA pour *O. nubilalis* est largement augmentée par la présence de butoxyde de pipéronyl dans la nourriture. Un effet semblable a été signalé par Lange (1984) chez les chenilles de *Plutella xylostella* L. après 8 jours de traitement avec du butoxyde de pipéronyl et différents extraits de margousier. Gagnon (1991), dans un test antiappétant avec *O. nubilalis*, n'a pas observé d'augmentation de l'efficacité de l'azadirachtine lorsque celle-ci était offerte en combinaison avec du butoxyde de pipéronyl sur des feuilles de maïs, mais la durée du test, 24 heures seulement, ne permettait probablement pas de noter des effets significatifs. Ces résultats pourraient aussi indiquer que le butoxyde de pipéronyl n'agit pas sur l'appétance mais plutôt sur le métabolisme, c'est-à-dire qu'il y aurait dégradation de l'azadirachtine en un métabolite (Berenbaum et Neal, 1985). Bien que non significatif, le phénobarbitol a légèrement tendance à diminuer la toxicité de l'H₂-AZA, indiquant peut-être que le métabolisme de la molécule passerait par les PSMO.

3.4.3. Meilleur rapport DIL:H₂-AZA.

L'analyse statistique utilisée dans l'étude avec le DIL (voir la section 3.3.1) indique clairement un effet de synergiste du néo-lignan sur l'H₂-AZA. Sans aucun doute, l'effet du DIL et de l'H₂-AZA est plus grand que la somme des effets dûs au DIL et à l'H₂-AZA pris séparément.

Le DIL démontre peu de toxicité et la toxicité de l'H₂-AZA est augmentée en sa présence.

L'efficacité d'un synergiste d'insecticide est communément exprimée par le rapport de la DL₅₀ de l'insecticide seul sur la DL₅₀ de l'insecticide plus le synergiste (Bradley et Selim, 1985; Raffa et Priester, 1985; Yamamoto et Casida, 1966). Puisqu'il est difficile d'évaluer si la mortalité causée par l'H₂-AZA vient d'un effet antiappétant ou d'un effet toxique, et puisque l'azadirachtine a peu d'effet par contact, la DL₅₀ est difficilement mesurable. L'approche utilisée ici consiste donc uniquement à évaluer différents rapports du synergiste et de l'H₂-AZA pour déterminer celui qui affecte le plus la croissance d'*O. nubilalis*. Les résultats obtenus montrent une inhibition de croissance variant peu avec l'augmentation de la dose de synergiste (figure 20). Une partie seulement de la détoxification de l'H₂-AZA serait effectuée par les PSMO possiblement ou du moins par les isozymes des PSMO inhibés par le butoxyde de pipéronyl ou le DIL. D'autres voies métaboliques pourraient également être utilisées pour la détoxification de cette molécule.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

L'un des grands avantages de l'azadirachtine comme moyen de contrôle des insectes phytophages nuisibles est qu'elle présente deux effets combinés chez *O. nubilalis*. En effet, en plus d'agir au niveau comportemental comme un antiappétant, l'azadirachtine possède des propriétés toxiques et son ingestion par l'insecte résulte en une régulation de la croissance et du développement (Arnason et al., 1985, Gagnon, 1992). Ces effets combinés offrent, en situation pratique, une meilleure garantie de succès qu'un produit ne possédant qu'une seule de ces caractéristiques (Jermy, 1990). La possibilité du développement de l'habitude à l'antiappétant d'une part et de la résistance aux effets toxiques d'autre part est ainsi grandement diminuée. Les espèces polyphages comme *O. nubilalis* sont par contre plus susceptibles à de tels développements, et des études toxicologiques à plus long terme sont certes encore nécessaires pour en connaître plus à ce sujet (Raffa et Frazier, 1988).

Dans la recherche de moyens de contrôle des insectes ravageurs qui sont plus sécuritaires pour l'environnement, un antiappétant et un régulateur de croissance tel que l'azadirachtine a certes beaucoup à offrir. Trop souvent, les substances naturelles plus sécuritaires pour l'environnement ne sont pas suffisamment persistantes pour permettre une protection efficace des plantes traitées suffisamment longtemps. L'hydrogénation de la molécule d'azadirachtine, la grande variété de composés présents dans les différents extraits de margousier et qui possèdent une activité biologique chez les insectes phytophages, la possibilité d'une activité systémique de l'azadirachtine dans la plante ainsi que l'ajout de produits synergiques

pour accroître les effets de la molécule, sont tous différents moyens, facilement utilisables, pour permettre d'augmenter la persistance de l'azadirachtine en situation pratique.

Les études toxicocinétiques permettent en quelque sorte elles aussi d'observer la persistance d'une molécule toxique, mais plutôt, à l'intérieur d'un organisme. Il serait également intéressant d'étudier la toxicocinétique chez *O. nubilalis* lorsque du dillapiol est ajouté au traitement d'azadirachtine. Le plus souvent, les résultats de telles études sont spécifiques à l'espèce. Déterminer la vitesse d'élimination et la distribution de l'azadirachtine chez un insecte phytophage insensible aux effets toxiques de l'azadirachtine, permettrait de mieux comprendre d'où vient la variabilité des réponses interspécifiques aux effets de l'azadirachtine. Déterminer la nature des métabolites retrouvés dans les fèces ou dans différents tissus pourrait également amener une meilleure compréhension des voies métaboliques utilisés par l'insecte traité à l'azadirachtine.

Au niveau enzymatique, il serait intéressant de confirmer *in vitro* l'activité enzymatique des PSMO. L'induction des PSMO par un produit en particulier a une importance considérable sur le développement de la résistance puisque celle-ci apparaît le plus souvent lorsque les insectes peuvent métaboliser une substance étrangère suffisamment rapidement pour échapper à ses effets toxiques. D'autres systèmes enzymatiques importants en regard de la molécule d'azadirachtine pourraient également être étudiés et fournir des indications utiles sur le métabolisme de la molécule dans l'insecte. Un examen de la structure moléculaire de l'azadirachtine suggère que les enzymes

susceptibles d'intervenir à cet effet sont l'O-déméthylase, la glutathion-S-transférase et certaines estérases.

Plusieurs recherches ont été effectuées sur l'azadirachtine et les produits du margousier depuis plus de 60 ans. Certains produits de l'arbre sont déjà manufacturés et utilisés commercialement aux États-Unis, principalement pour la culture en serre. Même si la recherche sur les propriétés de l'azadirachtine et des produits du margousier doit continuer autant au niveau pratique que fondamental, leur utilisation dans des programmes intégrés de contrôle d'insectes ravageurs de cultures est dès maintenant possible. Une coopération internationale active est la meilleure garantie de succès dans le développement de nouveaux moyens de contrôler les insectes ravageurs tel que l'azadirachtine et la recherche exhaustive dont fait l'objet le margousier à travers le monde depuis toutes ces années, en est la preuve tangible.

RÉFÉRENCES

- Agosin, M., 1985. Role of microsomal oxidation in insecticide degradation, Vol. 11 Dans: Comparative Insect Physiology and Pharmacology, Kerkut, G.A. et L.I. Gilbert (eds), Pergamon Press, London, pp. 647-712.
- Ahmad, S., L.B. Brattsten, C.A. Mullin et S.J. Yu, 1986. Enzymes involved in the metabolism of plant allelochemicals, Dans: Molecular Aspects of Insect-Plant Associations, Brattsten, L.B. et S. Ahmad (eds), Plenum Press, New York, pp. 73-152.
- Ahmed S. et M. Grainge, 1986. Potential of Neem Tree (*Azadirachta indica*) for pest control and rural development, *Economic Botany*, 40(2): 201-209.
- Anders, M.W., 1968. Inhibition of microsomal drug metabolism by methylenedioxybenzenes, *Biochem. Pharmacol.*, 17: 2367-2370.
- Arnason, J.T., B.J.R. Philogène, N. Donskov, M. Hudon, C. McDougall, G. Fortier, P. Morand, D. Gardner, J. Lambert, C. Morris et C. Nozzolillo, 1985. Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*, *Entomol. exp. appl.* 38: 29-34.
- Attri, B.S., 1982. Neem (*Azadirachta indica* Juss.) as a source of pest control material, Dans Cultivation and Utilization of Medicinal Plants, Atal, C.K. et B.M. Kapur (eds), Regional Research Laboratory, Council of Scientific and Industrial Research, Jammu-Tawi, India.
- Awasthi, M.D. et S.K. Mukerjee, 1977. Evaluation of dillapiole and dihydro-dillapiole as synergists for DDVP, *Pesticides* 11: 29-30.
- B-Bernard, C. et B.J.R. Philogène, 1992. Insecticide synergists: role, importance, toxicology and perspectives, *J. Toxicol. Envir. Health*, sous presse.
- Barnby, M.A. et J.A. Klocke, 1987. Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr.) (Noctuidae), *J. Insect Physiol.*, 33(2): 69-75.

- Barnby, M.A., R.B. Yamasaki et J.A. Kloccke, 1989a. Biological activity of azadirachtin, three derivatives, and their ultraviolet radiation degradation products against tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae, *J. Econ. Entomol.*, 82: 58-63.
- Barnby, M.A., J.A. Klocke, M.V. Darlington et R.B. Yamasaki, 1989b. Uptake, metabolism, and excretion of injected tritiated 22,33-dihydroazadirachtin in last instar larvae of *Heliothis virescens*, *Entomol. exp. appl.*, 52: 1-6.
- Berenbaum, M., 1986. Postingestive effects of phytochemicals on insects: on paracelsus and plant products, Dans: *Insect-Plant Interactions*, Miller J.R. et T.A. Miller (eds), Springer Verlag, 342 p.
- Berenbaum, M., 1984. Interactions among allelochemicals in plants, Recent advances in phytochemistry, vol. 19, Dans: *Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms*, Cooper-Driver, G.A., T. Swain et E.E. Conn (eds), Plenum Press, New York, p. 139-169.
- Berenbaum, M. et J.J. Neal, 1985. Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally cooccurring plant toxicant, *J. Chem. Ecology*, 11(10): 1349-1358.
- Bernard, C.B.-, 1988. Effect of lignans in associations with naturally occurring allelochemicals from the Asteraceae on the detoxification enzymes and the life cycle of an herbivorous Lepidoptera, *Ostrinia nubilalis* Hübner, *Thèse de maîtrise en Sciences biologiques*, Université d'Ottawa, Ottawa.
- Bernard, C.B.-, J.T. Arnason, B.J.R. Philogène, J. Lam et T. Wadell, 1989. Effect of lignans and other secondary metabolites of the Asteraceae on the PSMO activity of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, *Phytochem.*, 28(5): 1373-1378.
- Bidmon, H.J., G. Kauser, P. Mobus et J. Koolman, 1987. Effect of azadirachtin on blowfly larvae and pupae, Dans: *Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants*, Proc. 3rd Int. Neem Conf. Nairobi, 1986, Schmutterer H. et K.R.S. Ascher (eds), Eschborn:GTZ, pp. 253-271.

- Bilton, J.N., H.B. Broughton, P.S. Jones, S.V. Ley, Z. Lidert, E.D. Morgan, H.S. Rzepa, R.N. Sheppard, A.M.Z. Slawin et D.J. Williams, 1987. An X-ray crystallographic, mass-spectroscopic, and NMR study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives, *Tetrahedron* 43(12): 2805-2815.
- Bilton, J.N., H.B. Broughton, S.V. Ley, Z. Lidert, E.D. Morgan, H.S. Rzepa et R.N. Sheppard, 1985. Structural reappraisal of the limonoid insect antifeedant azadirachtin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, pp. 968-971.
- Blaney, W.M., M.S.J. Simmonds, S.V. Ley, J.C. Anderson et P.L. Toogood, 1990. Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae, *Entomol. exp. appl.*, 55: 149-160.
- Brindley, W.A. et A.A. Selim, 1984. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance, *Environ. Entomol.*, 13(2): 348-353.
- Brattsten, L.B., C.F. Wilkinson et T. Eisner, 1977. Herbivore-plant interactions: mixed-function oxidases and secondary plant substances, *Science*, 196: 1349-1352.
- Brattsten, L.B., 1986. Fate of ingested plant allelochemicals in herbivorous insects Dans: *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*, Brattsten, L.B. et S. Ahmad (eds), Plenum Press, New York, pp. 211-255.
- Brattsten, L.B., S.L. Price et C.A. Gunderson, 1980. Microsomal oxidases in midgut and fatbody tissues of a broadly herbivorous insect larva, *Spodoptera eridania* Cramer (Noctuidae), *Comp. Biochem. Physiol.*, 66c: 231-237.
- Brattsten, L.B., 1979. Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals, Dans: *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, Rosenthal G.A. et D.H. Janzen (eds), Academic Press, New York, pp. 199-270.
- Brodie, B.B., J.R. Gillette et B.N. LaDu, 1958. Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds, *Ann. Rev. Biochem.*, 27: 427-454.

- Butterworth, J.H., E.D. Morgan et G.R. Percy, 1972. The structure of azadirachtin, the functional groups, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 2445-2450.
- Butterworth, J.H. et E.D. Morgan, 1968. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. Chem. Commun., p. 23-24.
- Campos, F., J. Atkinson, J.T. Arnason, B.J.R. Philogène, P. Morand, N.H. Werstiuk et G. Timmin, 1989. Toxicokinetics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), J. Chem. Ecol., 15(7): 1989-2001.
- Campos, F., J. Atkinson, J.T. Arnason, B.J.R. Philogène, P. Morand, N.H. Werstik et G. Timmins, 1988. Toxicity and toxicokinetics of 6-methoxybenzoxazolinone (MBOA) in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), J. Chem. Ecol., 14(3): 989-1001.
- Campos, F., 1989. Toxicity and toxicokinetics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) in *Ostrinia nubilalis*, and effects of DIMBOA on the endoparasitoid *Diadegma terebrans*, Thèse de Doctorat en Philosophie, Département de Biologie, Université d'Ottawa, Ottawa.
- Canney, P. et D.R. Gardner, 1988. Effects of artificial and natural diets on success in tip recording and on galeal chemosensillum morphology of European corn borer larvae, Physiol. Entomol., 14(1): 13-20.
- Cardellina, J.H. II, 1988. Natural products in the search for new agrochemicals, Dans Biologically Active Natural Products: Potential Use in Agriculture, Cutler H.G. (ed), Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, ACS, New Orleans, Louisiana, August 30-September 4, 1987.
- Casida, J.E., 1970. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. J. Agr. Food Chem 18(5): 753-772.
- Champagne, D.E., M.B. Isman et G.H.N. Towers, 1989. Insecticidal activity of phytochemicals and extracts of the *Meliaceae*, Chap. 8 Dans: Insecticides of Plant Origin, Arnason, J.T., B.J.R. Philogène et P. Morand (eds), ACS Symposium Series, June 5-11, Toronto, 1988.

- Cutler, H.G., 1988. Natural products and their potential in agriculture: a personal overview, Dans Biologically Active Natural Products: Potential Use in Agriculture, Cutler H.G. (ed), Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, ACS, New Orleans, Louisiana, August 30-September 4, 1987.
- Duffey, S.S., 1980. Sequestration of plant natural products by insects, *Ann. Rev. Entomol.*, 25: 447-477.
- Elakovich, S.D., 1988. Terpenoids as models for new agrochemicals, Dans: Biologically Active Natural Products: Potential Use in Agriculture, Cutler H.G. (ed), Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, ACS, New Orleans, Louisiana, August 30-September 4, 1987.
- El-Sabae, A.H., 1980. Biochemical challenges in future toxicological research, *J. Environ. Sci. Health*, B15(6): 689-721.
- Franklin, M.R., 1976. Methylenedioxyphenyl insecticide synergists as potential health hazards, *Environment health perspectives*, 14: 29-37.
- Fritzsche, U. et G. Cleffmann, 1987. The insecticide azadirachtin reduces predominantly cellular RNA in *Tetrahymena*, *Naturwissenschaften*, 74: 191-192.
- Gagnon, D., 1991. Neem products for the control of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*, in sweet corn, Thèse de Maîtrise en Sciences biologiques, Université d'Ottawa, Ottawa.
- Garcia, E.S., B. Subrahmanyam, TH. Müller et H. Rembold, 1989. Absorption, storage, organ distribution, and excretion of dietary [22,23-³H₂]dihydroazadirachtin A in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*, *J. Insect Physiol.* 35(10): 743-749.
- Georghiou, G.P., 1990. Overview of insecticide resistance, Dans: Managing Resistance to Agrochemicals: from Fundamental Research to Practical Strategies, Green, M.B., H.M. LeBaron et W.K. Moberg (eds), ACS series 421, ACS Washington DC, pp 18-41.
- Gill, J.S. et C.T. Lewis, 1971. Systemic action of an insect feeding deterrent, *Nature*, 232: 402-403.

- Guthrie, W.D., W.A. Russel et C.W. Jennings, 1971. Resistance of maize to second-brood European corn borers, Dans: Proc. 26th Ann. Corn Sorghum Res. Conf. Chicago, pp. 165-179.
- Harborne, J.B., 1988. Introduction to Ecological Biochemistry, Third Edition, Academic Press, Toronto, 356 p.
- Hayes, A.W., 1989. Principles and Methods of Toxicology, Second Edition, Hayes, A.W. (ed), Raven Press, Ltd., New York, 929 p.
- Hoddy, E., 1986. The Neem Tree, Development and Cooperation No. 1, pp. 1-3.
- Hodgson, E., 1985. Microsomal mono-oxygenase, Vol 12 Dans: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Kerkut, G.A. et L.I. Gilbert (eds), Pergamon Press London, pp. 225-321.
- Hudon, M. et E.J. LeRoux, 1986. Biology and population dynamics of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) with special reference to sweet corn in Québec. I. Systematics, morphology, geographical distribution, host plants, economic importance. *Phytoprotection*, 67: 39-54.
- Hudon, M., E.J. LeRoux et D.G. Harcourt, 1989. Seventy Years of European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) Research in North America, *Agricultural Zoology Reviews*, Vol 3: 53-96.
- Isman, M.B., O. Koul, D.T. Lowery, JT. Arnason, D. Gagnon, J.G. Stewart et G.S. Salloum, 1990. Development of a neem-based insecticide in Canada, Proc. of a workshop "Neem's potential in U.S. pest management programs", USDA, Beltsville, MD, April 16-17, 1990.
- Isman, M.B., O. Koul, A. Luczynski et J. Kaminski, 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content, *J. Agric. Food Chem.*, 38(6): 1406-1411.
- Iyengar, S., 1988. Toxicokinetics and metabolism of alpha-terthienyl in *Manduca sexta*, *Heliothis virescens* and *Ostrinia nubilalis*, Thèse de Doctorat en Philosophie, Département de Biologie, Université d'Ottawa, Ottawa.

- Jacobson, M., 1986. The neem tree: natural resistance par excellence, Dans: Natural Resistance of Plants to Pests. Roles of Allelochemicals, Green, M.B. et P.A. Hedin, ACS Symp. Ser., 296: 220-232.
- Jermy, T., 1990. Prospects of antifeedant approach to pest control-A critical review, *J. Chem. Ecol.*, 16(11): 3151-3167.
- Jernelöv A., K. Beijer et L. Söderlund, 1978. General aspects of toxicology, Dans: Principles of Ecotoxicology Scope 12, Butler, G.C. (ed), John Wiley & Sons, Toronto, pp.151-168.
- Koolman, J., H.-J. Bidmon, M. Lehmann et G. Käuser, 1988. On the mode of action of azadirachtin in blowfly larvae and pupae, Dans: Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology, Sehna, F., A. Zabza et D.L. Denlinger (eds), Wroclaw Technical University Press, Wroclaw, pp. 56-67.
- Koul, O., M.B. Isman et C.M. Ketkar, 1990. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*, *Can. J. Bot.*, 68: 1-11.
- Kubinyi, H., 1979. Lipophilicity and drug activity, Dans: Progress in Drug Research Vol. 23, Herausgegeben von (ed), Birkhäuser Verlag, Boston, pp. 97-198.
- Kubo, I. et J.A. Klocke, 1982. Azadirachtin, insect ecdysis inhibitor. *Agric. Biol. Chem.*, 46(7): 1951-1953.
- Lambert, J.D.H., J.T. Arnason, A. Serratos, B.J.R. Philogène, M.A. Faris, 1987. Role of intercropped red clover in inhibiting European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) damage to corn in eastern Ontario, *J. Econ. Entomol.*, 80: 1192-1196.
- Lange, W., 1984. Piperonyl butoxide: synergistic effects on different neem seed extracts and influence on degradation of an enriched extract by ultra-violet light, Dans: Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants, Proc. 2nd Neem Conf., Rauischholzhausen 1983, Schmutterer, H. et K.R.S. Ascher (eds), Eschborn:GTZ, pp. 129-140.
- Lewis, C.T., 1980. The penetration of cuticle by insecticides, Chap. 10 Dans: Cuticle Techniques in Arthropods, Miller, T.A. (ed), Springer-Verlag, New York, pp. 367-400.

- Ley, S.V., A.A. Somovilla, H.B. Broughton, D. Craig, A.M.Z. Slawin, P.L. Toogood et D.J. Williams, 1989. Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta Indica* (Part 4): synthesis towards the limonoid azadirachtin; preparation of a functionalised decalin fragment, *Tetrahedron*, 45(7): 2143-2164.
- Ley, S.V., J.C. Anderson, W.M. Blaney, P.S. Jones, Z. Lidert, E.D. Morgan, N.G. Robinson, D. Santafianos, M.S.J. Simmonds et P.L. Toogood, 1989. Insect antifeedants from *azadirachta indica* (Part 5): Chemical modification and structure-activity relationships of azadirachtin and some related limonoids, *Tetrahedron*, 45(16): 5175-5192.
- Ley, S.V., D. Santafianos, W.M. Blany et M.S.J. Simmonds 1987. Synthesis of a hydroxydihydrofuranacetal related to azadirachtin, a potent insect control antifeedant, *Tetrahedron Lett.*, 28: 221-223.
- Mannering, G.J., 1971. Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism, Dans: *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, La Du, B.N., H.G. Mandel et E.L. Way (eds), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 206-252.
- Mansour, F.A., K.R.S. Ascher et N. Omari, 1987. Effect of neem seed kernel extracts from different solvents on the predacious mite *Phytoseiulus persimilis*, as well as the predatory spider *Chiracanthium mildei*, Dans: *Natural Pesticides from the Neem and Other Tropical Plants*, Proc. 3rd Int. Neem Conf., Schmutterer, H. et K.R.S. Ascher (eds), Nairobi, pp. 577-587.
- Matsumura, F., 1975. *Toxicology of Insecticides*, Plenum Press, New York, 503 p.
- McEwen, F.L. et G.R. Stephenson, 1979. *The Use and Significance of Pesticides in the Environment*. John Wiley & Sons, Toronto, 538 p.
- Meisner, J., V. Melamed-Madjar, K.R.S. Ascher et S. Tam, 1985. Effect of an aqueous extract of neem seed kernel on larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, *Phytoparasitica*, 13(3-4): 173-178.
- Millburn, P., 1978. Biotransformation of xenobiotics by animals, Dans *Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution*, Harborne, J.B. (ed), Academic Press, London, 435 p.

- Mordue (Luntz), A.J., P.K. Cottee et K.A. Evans, 1985. Azadirachtin: its effect on gut motility, growth and moulting in *Locusta*, *Physiol. Entomol.*, 10: 431-437.
- Mordue A.J. et F. Plane, 1988. Neuromuscular effects of azadirachtin, Dans: Neurotox '88: An International Symposium on Neuropharmacology and Pesticide Action, Nottingham, England, UK, April 10-15, *Pestic. Sci.*, 24(4): 337-338.
- Morgan, E.D., 1982. Strategy in the isolation of insect control substances from plants, Dans: Natural Pesticides from the Neem Tree, Proc. of the 1st Int. Neem Conf., Rottach-Egern, 1980, Schmutterer, H., K.R.S. Ascher et H. Rembold (eds), Eschborn:GTZ, pp. 43-52.
- Mulkern et Mongolkiti, 1975. *Acrida*, 4: 95.
- Nakanishi, K., 1975. Structure of the insect antifeedant azadirachtin, *Recent Adv. Phytochem.*, 9: 283-298.
- Nakatsugawa, T. et M.A. Morelli, 1976. Microsomal oxidation and insecticide metabolism, Dans: Insecticide Biochemistry and Physiology, Wilkinson, C.F. (ed), Plenum Press, New York, pp. 61-114.
- Nijhout, H.F., 1981. Physiological control of molting in insects, *Amer. Zool.*, 21: 631-640.
- Olson, W.P. et R.D. O'Brien, 1963. The relation between physical properties and penetration of solutes into cockroach cuticle, *J. Insect Physiol.*, 9: 777-786.
- Osman, M.Z. et G.R. Port, 1990. Systemic action of neem seed substances against *Pieris brassicae*, *Entomol. exp. appl.*, 54: 297-300.
- Parke, D.V., 1968. *The Biochemistry of Foreign Compounds*, Pergamon Press, Oxford, 269 p.
- Peterson, L.A. et F.P. Guengerich, 1988. Comparison of and relationships between glutathione S-transferase and cytochrome P-450 systems, Dans: Glutathione Conjugation, Mechanisms and Biological Significance, Sies, H. (ed), Academic Press, 7: 193.

- Philogène, B.J.R., J.T. Arnason, N. Donskov et M. Hudon, 1987. Intérêt de l'*azadirachta indica* dans la lutte contre la pyrale du maïs, Conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, Paris, 1,2,3 décembre.
- Radwanski, S., 1977. Neem tree 1: Commercial potential, characteristics and distribution, *World Crops and Livestock*, 29: 62-66.
- Raffa, K.F. et T.M. Priester, 1985. Synergists as research tools and control agents in agriculture. *J. Agric. Entomol.*, 2(1): 27-45.
- Raffa, K.F. et J.L. Frazier, 1988. A generalized model for quantifying behavioral desensitization to antifeedants, *Entomol. Exp. Appl.* 46: 93-100.
- Rembold, H., 1984. Secondary plant products in insect control, with special reference to the azadirachtins, Dans: *Advances in Invertebrate Reproduction* vol 3, Engels W. et al. (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 481-491.
- Rembold, H., Th. Müller et B. Subrahmanyam; 1988. Tissue-specific incorporation of azadirachtin in the Malpighian tubules of *Locusta migratoria*, *Naturforsch.*, 43c: 903-907.
- Rembold, H., H. Forster, Ch. Czoppelt, J.P. Rao et K.-P. Sieger, 1984. The azadirachtins, a group of insect growth regulators from the neem tree, pp. 53-162 Dans: *Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants*, Proc. 2nd Int. Neem Conf., Rauischholzhausen, 1983, Schmutterer, H. et K.R.S. Ascher (eds), Eschborn: GTZ. 587 p.
- Rembold, H., M. Uhl et TH. Müller, 1986. Effect of azadirachtin A on hormone titers during the gonadotrophic cycle of *Locusta migratoria*, Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi 1986, pp. 289-298.
- Rembold, H., B. Subrahmanyam et T. Müller, 1989. Corpus cardiacum: a target for azadirachtin, *Experientia*, 45: 361-363.
- Rembold, H., 1987. The azadirachtins-potent insect growth inhibitors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Intern. Symp. on Insects, Rio de Janeiro, Vol. 82, Suppl. III: 61-66.

- Rembold, H., H. Forster, CH. Czoppelt, P.J. Rao et K.-P. Sieber, 1983. The azadirachtins, a group of insect growth regulators from the neem tree, Proc. 2nd Int. Neem Conf., Rauischholzhausen, pp. 153-162.
- Rembold, H., 1989. Azadirachtins, their structure and mode of action, Chap. 11, Dans: Insecticides of Plant Origin, Arnason, J.T., B.J.R Philogène et P. Morand (eds), ACS Symposium Series, June 5-11, Toronto, 1988, 213 p.
- Renwick, A.G., 1989. Pharmacokinetics in Toxicology, Chap. 30 Dans: Principles and Methods of Toxicology, Second edition, Hayes, A.W. (ed), Raven ress, Ltd., New York, pp.835-878.
- Rosenthal, G.A. et D.H. Janzen (eds), 1979. Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites, Academic Press, New York, 718 p.
- Saxena, R.C., 1989. Insecticides from Neem, Chap. 9, Dans: Insecticides of Plant Origin, Arnason, J.T., B.J.R Philogène et P. Morand (eds), ACS Symposium Series, June 5-11, Toronto, 1988, 213p.
- Schlüter, U., H.J. Bidmon et S. Grewe, 1985. Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, J. Insect Physiol., 31(10): 773-777.
- Schlüter, U., 1987. Effects of azadirachtin on developing tissues of various insect larvae, Dans: Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants, pp. 331-348, Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi, 1986.
- Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*, Annu. Rev. Entomol., 35: 271-297.
- Schmutterer, H., 1988. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. J. Insect Physiol., 34: 713-719.
- Schoonhoven, L.M., 1980. Perception of azadirachtin by some lepidopterous larvae, Proc. 1st Int. Neem Conf., Rottach-Egern, pp. 105-108.
- Schoonhoven, L.M., 1982. Biological aspects of antifeedants, Ent. exp. & appl., 31: 57-69.

- Sharma, R.N., 1982. Development and utilization of plant products for insect control: a comprehensive approach, Dans: Cultivation and Utilization of Medicinal Plants, Atal, C.K. et B.M. Kapur (eds), Regional Research Laboratory, Council of Scientific and Industrial Research, Jammu-Tawi, India.
- Simmonds, M.S.J., W.M. Blaney, S.V. Ley, J.C. Anderson et P.L. Toogood, 1990. Azadirachtin: structural requirements for reducing growth and increasing mortality in lepidopterous larvae, Entomol. Exp. Appl., 55: 169-181.
- Simmonds, M.S.J. et W.M. Blaney, 1983. Some neurophysiological effects of azadirachtin on lepidopterous larvae and their feeding response, Proc. 2nd Int. Neem Conf., Rauschholzhausen, pp. 163-180.
- Soderlund, D.M., 1979. Pharmacokinetic modifications of intrinsic insecticide activity, Dans: Insect Neurobiology and Pesticide Action (Neurotox'79), Society of Chemical Industry, London, pp. 449-455.
- Sokal, R.R. et F.J. Rohlf, 1981. Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, Second edition, W.H. Freeman and Company, New York, 859 p.
- Stokes, J.B. et R.E. Redfern, 1982. Effect of sunlight on azadirachtin: antifeeding potency, J. Environ. Sci. Health, A17(1): 57-65.
- Strong, D.R., J.H. Lawton, Sir R. Southwood, 1984. Insects on Plants: Community Patterns and Mechanisms, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 313 p.
- Sun, Y-P. et E.R. Johnson, 1960. Synergistic and antagonistic actions of insecticide - Synergist combinations and their mode of action, Agric. Food Chem., 8(4): 261-266.
- Taylor, L.R., 1961. Aggregation, variance and the mean, Nature, Lond., 189: 732-735.
- Turunen, S., 1985. Absorption, Vol 4 Dans: Comparative Insect Physiology and Pharmacology, Kergut, G.A. et L.I. Gilbert (eds), Pergamon Press, London, pp. 241-277.
- Ullrich, V., 1976. The mechanism of cytochrome P-450 action, Dans: Microsomes and Drug Oxidations, Ullrich, V. et al. (eds), pp. 192-201, Pergamon Press, New York.

- Van Der Nat, J.M., W.G Van Der Sluis, K.T.D. De Silva et R.P. Labadie, 1991. Ethnopharmacognostical survey of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), 35: 1-24.
- Völlinger, M., 1987. The possible development of resistance against neem seed kernel extract and deltamethrin in *Plutella xylostella*, Dans: Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants, Schmutterer, H. et K.R.S. Ascher (eds), Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi 1986, pp. 543-554.
- Warthen, J.D. Jr., 1989. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss): organisms affected and reference list update, Proc. Entomol. Soc. Wash., 91(3): 367-388.
- Warthen, J.D., 1979. *Azadirachta indica* A. Juss: a source of insect feeding inhibitors and growth regulators, U.S. Department of Agriculture Science and Education Administration, Agricultural Reviews and Manuals ARM-NE-4, April.
- Welling, W. et G.D. Paterson, 1985. Toxicodynamics of insecticides, Vol. 12 Dans: Comparative Insect Physiology and Pharmacology, Kergut, G.A. et L.I. Gilbert (eds), Pergamon Press, London, pp. 603-645.
- Wigglesworth, V.B. 1984. Insect Physiology, 8th edition, Chapman and Hall, New York, 191 p.
- Wilkinson, C.F., 1976. Insecticide synergism, Dans: Insecticides for the future: needs and prospects, Metcalf R.R. et J.J. McKelvey Jr. (eds), John Wiley & Sons, New York, pp. 195-218.
- Xie, Y.S., D. Gagnon, J.T. Arnason, B.J.R. Philogène et J.D.H. Lambert, 1991. Effects of azadirachtin on the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Leconte) (Coleoptera: Chrysomelidae), Can. Entomol., 123: 707-710.
- Yamamoto, I. et J.E. Casida, 1966. O-demethyl Pyrethrin II analogs from oxidation of Pyrethrin I, Allethrin, Dimethrin, and Phthalthrin by a house fly enzyme system, J. Econ. Entomol., 59(6): 1542-1543.
- Yamasaki, R.B. et J.A. Klocke, 1987. Structure-bioactivity relationships of azadirachtin, a potential insect control agent, J. Agric. Food Chem., 35: 467-471.

Zanno, P.R., E. Miura, K. Nakanishi et D.L. Elder, 1975.
Structure of the insect phagorepellent azadirachtin.
Applications of PRFT/CWD carbon-13 nuclear magnetic
resonance, J. Am. Chem. Soc., 97: 1975-1977.

Zar, J.H., 1984. Biostatistical Analysis, Second edition,
Prentice-Hall, Inc., N.J., 718 p.

ANNEXE 1

Nourriture pour la culture d'*O. nubilalis* (selon Guthrie, 1971)

Composition et méthode de préparation (400 g)

<u>A</u>	
1	Mélanger et amener à ébullition 216.5 ml d'eau distillée et 7.45 g d'agar.
2	Transférer dans un mélangeur électrique
3	Ajouter 86.0 ml d'eau distillée (pour refroidir)
4	Ajouter 10.75 g de granules de maïs
5	Bien mélanger et laisser refroidir à $\pm 58^{\circ}\text{C}$.

<u>B</u>	
6	Mesurer 49.25 g de mélange sec ⁽¹⁾
7	Ajouter 2.0 ml d'une solution de parabène de méthyle ⁽²⁾
8	Ajouter 2.3 ml d'une solution d'acide propionique et d'acide phosphorique ⁽³⁾
9	Ajouter 0.19 ml de formaldéhyde
10	Ajouter 0.20 g de Fumidil B
11	Ajouter 43.5 ml d'eau distillée et bien mélanger

Aussitôt que la température du mélange d'agar A descend à $\pm 58^{\circ}\text{C}$, ajouter le mélange B et bien mélanger. Verser la nourriture dans des moules et laisser refroidir. Réfrigérer dans des bocaux de verre.

(1) Composition du mélange sec

- 520 g de germe de blé
- 400 g de dextrose
- 440 g de caséine
- 32 g de cholestérol
- 144 g de mélange salé (Wesson)
- 92 g de vitamines (Vanderzant Adkisson)
- 120 g d'acide ascorbique
- 27 g d'auréomycine
- 80 g d'acide sorbique

Mélanger tous les ingrédients et réfrigérer. Tous les ingrédients ci-dessus sont disponibles chez Bio-Serve Inc. Le germe de blé est disponible dans tout magasin de produits naturels.

ANNEXE 1 (suite)

(2) Composition de la solution de parabène de méthyle

- 56 g de parabène de méthyle
- 200 ml d'éthanol 95%

Garder à la température de la pièce

(3) Composition de la solution d'acide propionique

- A- Mélanger 418 ml d'acide propionique avec 32 ml d'eau distillée
- B- Mélanger 42 ml d'acide phosphorique avec 458 ml d'eau distillée

Mélanger A et B et garder au réfrigérateur

ANNEXE 2

Effet	Témoin	Traitement (1 ppm)	Observations
Mortalité durant le 5 ^e stade larvaire	0	6	Aucun signe de formation de chrysalides
Mortalité pour passer du 5 ^e stade au stade chrysalide	0	12	Début d'enroulement dans la soie mais pas de formation de chrysalides
Chrysalides qui n'ont pas émergé	0/20	2/2	Les chrysalides présentaient des anomalies évidentes: manque de pigmentation et malformations

ANNEXE 3

Composition du tampon phosphate pour dissection d'*O. nubilalis*

A- 4.52 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans 200 ml d'eau distillée

B- 2.52 g de NaOH dans 100 ml d'eau distillée

Prendre 83 ml de A et 17 ml de B et bien mélanger

ANNEXE 4

Loi de puissance de Taylor (1961):

$$Y' = Y^{1-b/2} \quad (\text{pour } b \neq 2)$$

$$Y' = \log Y \quad (\text{pour } b = 2)$$

ANNEXE 5a

Traceur (dpm) retrouvé chez *O. nubilalis* après alimentation continue, moyennes et erreurs-types ().

Hrs.	1	3	6	12	24	48	72
Estomac	256 (112)	1137 (389)	478 (318)	1301 (496)	1226 (354)	2173 (908)	3402 (1108)
Hémol.	137 (72)	188 (68)	243 (101)	298 (128)	581 (188)	967 (476)	906 (424)
Cor.Gr.	191 (43)	181 (37)	190 (68)	311 (100)	521 (193)	1338 (520)	2170 (873)
Tub.Mal	16 (6)	18 (5)	20 (6)	40 (9)	54 (28)	86 (25)	56 (21)
Carcas.	254 (113)	385 (119)	704 (168)	729 (182)	1414 (312)	2176 (826)	4125 (2087)
Fèces	308 (46)	916 (521)	1911 (1399)	2893 (1418)	5679 (2704)	6870 (7074)	8471 (5606)

ANNEXE 5b

Traceur (dpm) retrouvé chez *O. nubilalis* après application sur la cuticule, moyennes et erreurs-types ().

	0,5	1	2	3	6	12	24	48	72
Extern	31528 (27258)	33940 (33425)	13345 (8010)	18069 (7862)	10749 (7180)	14938 (10151)	11062 (4604)	3037 (2395)	5348 (3068)
Tub.Ma	120 (19)	115 (30)	110 (13)	40 (18)	58 (53)	78 (83)	42 (21)	49 (51)	165 (143)
Estoma	615 (384)	787 (747)	777 (398)	989 (416)	1272 (872)	1487 (1048)	1544 (620)	1800 (908)	2590 (1382)
Cor.Gr	209 (85)	282 (210)	192 (25)	86 (6)	254 (339)	140 (113)	130 (36)	116 (52)	427 (349)
Carcas	910 (647)	584 (222)	989 (553)	687 (217)	891 (754)	1602 (1262)	887 (112)	921 (232)	1226 (446)
Fèces	-	2830 (3305)	2093 (2008)	2015 (1783)	11046 (8015)	8772 (11045)	23446 (17304)	29128 (21694)	65695 (39540)
Hemol.	538 (332)	297 (168)	371 (158)	451 (202)	728 (1124)	596 (608)	2066 (3912)	126 (33)	144 (58)