

No - 920 143

15675

Institut d'Elevage et de Médecine  
Vétérinaire des Pays Tropicaux  
10, rue Pierre Curie  
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Ecole Nationale Vétérinaire  
d'Alfort  
7, avenue du Général-de-Gaulle  
94704 MAISONS-ALFORT Cedex



Institut National Agronomique  
Paris-Grignon  
16, rue Claude Bernard  
75005 PARIS

BIBLIOTHEQUE  
CIRAD-EMVT  
10, rue P. Curie  
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Muséum National d'Histoire Naturelle  
57, rue Cuvier  
75005 PARIS

---

## DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

---

# MEMOIRE DE STAGE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIOLOGIE DE LA TIQUE  
AMBLYOMMA VARIEGATUM (ACARINA : IXODIDA) EN GUADELOUPE  
(ROLE DES SECRETIONS CUTICULAIRES, CONSEQUENCES  
SUR LA LUTTE BIOLOGIQUE).

par

Martine MAIBECHE

année universitaire 1991-1992

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES  
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

---

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIOLOGIE DE LA TIQUE  
AMBLYOMMA VARIEGATUM (ACARINA : IXODIDA) EN GUADELOUPE  
(ROLE DES SECRETIONS CUTICULAIRES, CONSEQUENCES  
SUR LA LUTTE BIOLOGIQUE).

par

Nadine MAIBECHE

Lieu de stage : POINT A PITRE

Organisme d'accueil : Mission EMVT Antilles

Période du stage : 1er mai - 5 avril 1992

Rapport présenté oralement le : 26 octobre 1992

# PLAN

## INTRODUCTION

# I - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

## A - AMBLYOMMA VARIEGATUM

### 1 - Présentation

- a - Position systématique
- b - Cycle
  - b1 - La phase parasite
  - b2 - La phase libre
- c - Prédateurs naturels
- d - Rôle pathogène
- e - Répartition géographique
  - e1 - Répartition actuelle
  - e2 - Risques d'extension
- f - Importance économique en Guadeloupe

### 2 - Cuticule et glandes dermiques

- a - La cuticule
- b - Les glandes dermiques
  - b1 - structure
  - b2 - Rôle

## B - LES METHODES DE LUTTE ACTUELLES

### 1 - La lutte chimique

### 2 - La lutte agronomique

### 3 - La lutte biologique

- a - Perspectives offertes par les phéromones
- b - Essais d'infestation par des nématodes

## **II - ESSAIS D'INFESTATION PAR DES BACTERIES ENTOMOPATHOGENES**

### **A - MATERIEL**

#### **1 - Les animaux utilisés pour le gorgement des tiques**

a - L'animalerie de l'IEMVT

b - Les chèvres

#### **2 - Les tiques**

a - Origine et élevage

b - Le gorgement des tiques

#### **3 - Les souches bactériennes entomopathogènes**

### **B - METHODE**

1 - Pouvoir pathogène par contact

2 - Pouvoir pathogène par inoculation

### **C - RESULTATS**

### **D - DISCUSSION**

# III - ETUDE DU ROLE DEFENSIF DES SECRETIONS CUTICULAIRES

## A - TEST DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE

### 1 - Préliminaire

### 2 - Matériel

### 3 - Méthode

### 3 - Résultats et discussion

## B - TEST DE L'ACTIVITE REPULSIVE

### 1 - Matériel

#### a - Les insectes

a1 - Les fourmis *Solenopsis geminata*

a2 - Les chenilles *Galleria mellonella*

#### b - Sécrétions cuticulaires : réalisation de différents extraits

### 2 - Méthode

### 3 - Résultats

#### a - Mode de présentation des résultats

#### b - Résultats obtenus avec les larves gorgées

#### c - Résultats obtenus avec les nymphes gorgées

#### d - Résultats obtenus avec les femelles gorgées

### 4 - Discussion

## C - TEST DU POUVOIR TOXIQUE

### 1 - Matériel

### 2 - Méthode

#### a - Toxicité par contact

#### b - Toxicité par injection

### 3 - Résultats et discussion

# **IV - ANALYSE BIOCHIMIQUE : PREMIERE APPROCHE**

## **A - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE**

**1 - Principe de la GC-MS**

**2 - Matériel**

**3 - Résultats et discussion**

## **B- REALISATION D'ELECTROPHORESES**

**1 - Principe de l'électrophorèse**

**2 - Matériel**

a - Le gel de polyacrylamide

b - Le tampon

c - Le ph

d - Le matériel d'électrophorèse

e - Les échantillons

**3 - Méthode**

**4 - Résultats**

**5 - Discussion**

**CONCLUSION**

**ANNEXES**

# INTRODUCTION

La tique *Amblyomma variegatum*, originaire d'Afrique, parasite des grands herbivores, pose un problème majeur en Guadeloupe par son rôle pathogène direct mais surtout par son rôle de vecteur de la cowdriose. Sa présence est en outre associée à l'apparition de la dermatophilose.

Un programme de lutte intégrée, exploitant le système de communication phéromonale de cette tique a été élaboré, et des essais d'infestation expérimentale par des nématodes entomopathogènes ont été réalisés.

Des études préliminaires ont également été faites sur les sécrétions cuticulaires (H. Mauléon, C. Pavis, INRA) soupçonnées de participer aux mécanismes de défense de cette tique .

Nous avons tenté au cours de ce stage d'étudier les propriétés biologiques des sécrétions cuticulaires produites par les stases gorgées d'*A. variegatum*, et de compléter les essais réalisés à des fins de lutte biologique.

Ce travail a été réalisé conjointement à l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) et à l'IEMVT (Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux) et a pour but d'approfondir les connaissances concernant la biologie de cet important vecteur, afin de mieux en cerner l'épidémiologie, et d'étendre la gamme des moyens de lutte actuels.

Dans une première partie, après quelques rappels sur *A. variegatum* , sa situation en Guadeloupe et quelques données relatives aux glandes dermiques, nous présenterons les méthodes de lutte actuelles et les tentatives de lutte intégrée.

Dans la deuxième et troisième partie, nous décrirons les expérimentations réalisées, à savoir les essais d'infestation par des bactéries entomopathogènes et l'étude du rôle défensif des sécrétions cuticulaires.

Dans la dernière partie, nous présenterons les résultats des analyses biochimiques préliminaires.

Sauf mention contraire, tous les résultats présentés dans ce document relèvent de notre contribution personnelle.

# I - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

## A - AMBLYOMMA VARIEGATUM

### 1 - Présentation

#### **a - Position systématique**

*Amblyomma variegatum* peut-être située parmi les invertébrés selon la classification suivante (Camicas et Morel, 1978).

Embranchement : Arthropoda

Classe : Arachnida

Sous-classe : Acarina

Super-ordre : Anactinotrichida

Ordre : Ixodida

Sous-ordre : Ixodina

Super-famille : Ixodoïdea

Famille : Amblyommidea

Genre : *Amblyomma*

Espèce : *variegatum*

Il s'agit d'une tique dont le tégument porte des éléments sclérifiés, au dimorphisme sexuel accusé, possédant un long rostre et adaptée à des hôtes herbivores de grande taille (figure 1).

#### **b - Cycle**

Comme toutes les tiques, *A. variegatum* présente un développement en 3 stases, larves, nymphes puis adultes, séparées par des mues larvaire puis nymphale (figure 2).

Il s'agit d'une tique (Morel, 1992) :

- exophile (habitats constitués par des milieux ouverts et herbacés);
- trixène (un nouvel hôte à chaque stase).
- télotrope (tropisme d'hôte seulement à la stase adulte).

Chacune des stases doit trouver un hôte, s'y fixer, s'y gorger avant de s'en détacher pour pouvoir muer à l'abri sur le sol.

La durée minimale du cycle, dans des conditions expérimentales, est de 112 jours.

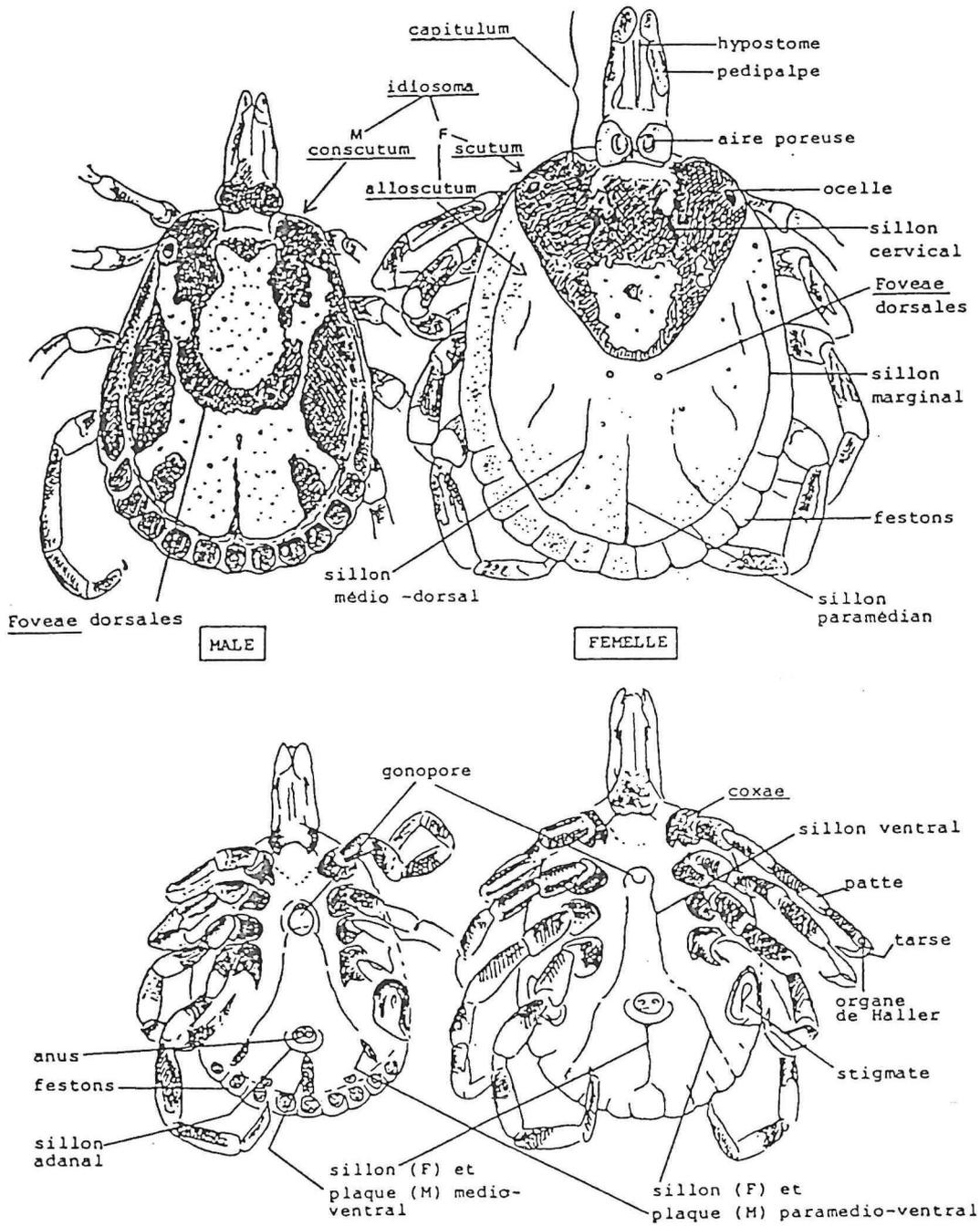


Figure 1 : morphologie des adultes d'*A. variegatum*

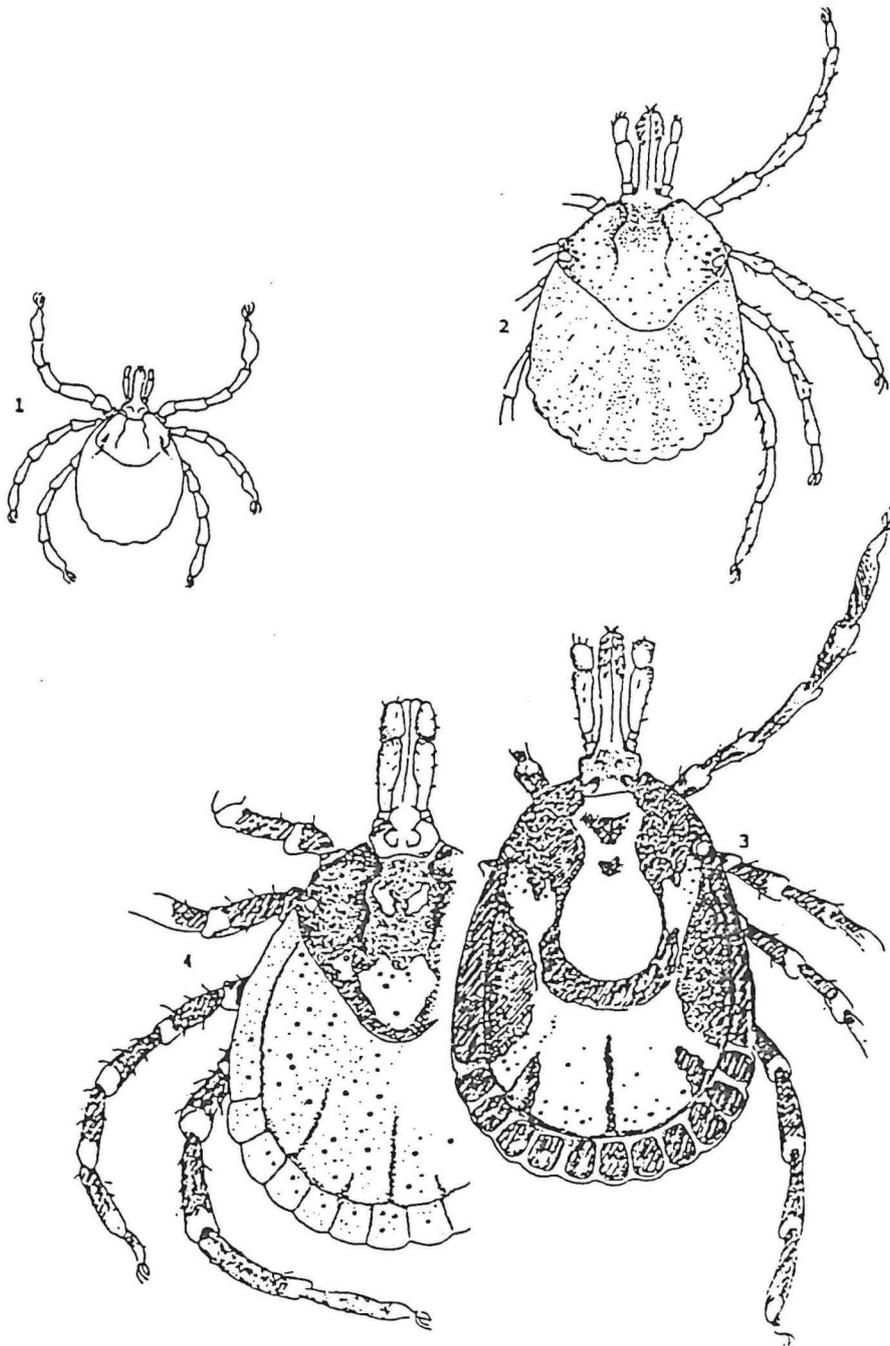
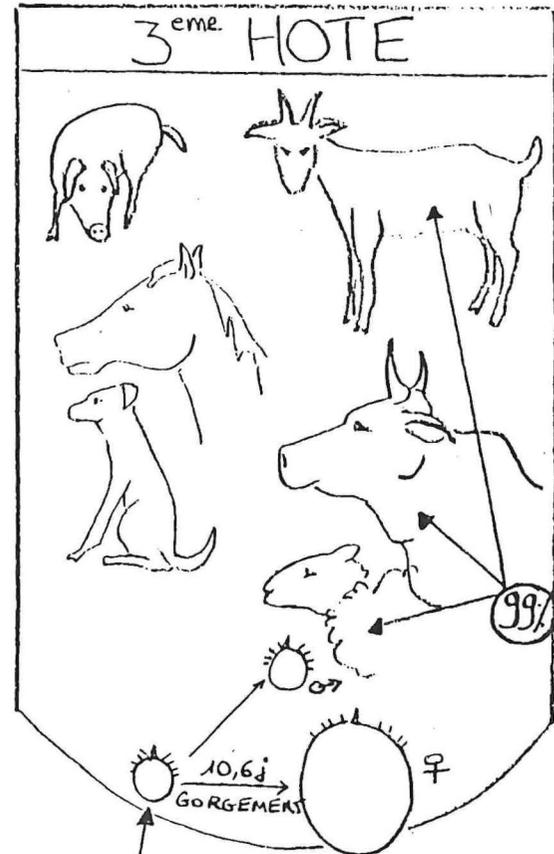
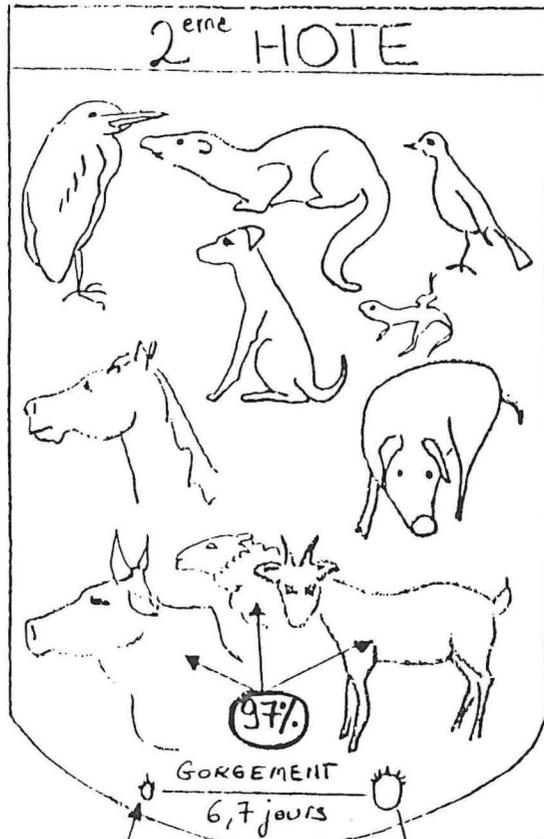
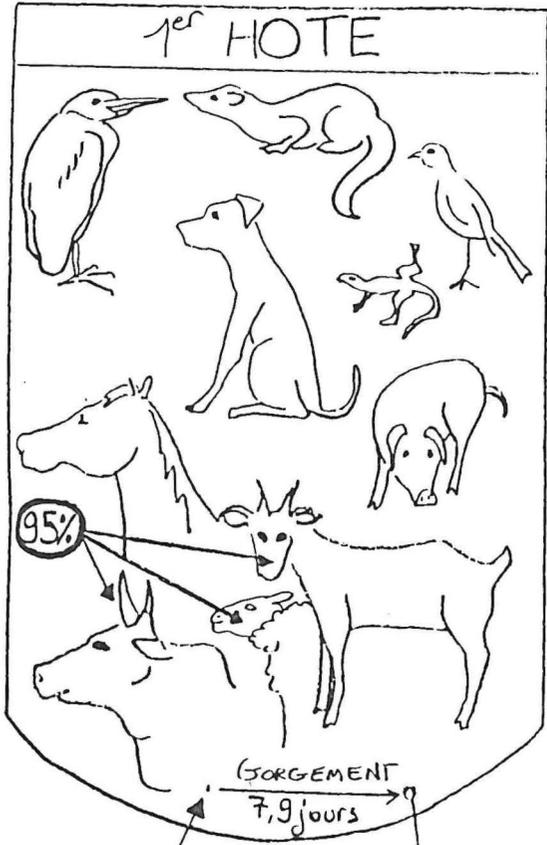


Figure 2 : les stases de la tique *A. variegatum* (1 : larve, 2 : nymphe, 3 : mâle, 4 : femelle)

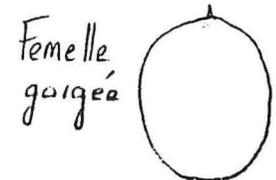


Larve gorgée → MUE → Nymphe à jeun

19,1j

Nymphe gorgée → MUE → Adulte à jeun

23,7j



Écllosion  
49,6 jours

Oeufs  
(15000)

PONTE

Ce cycle se déroule selon deux phases (figure 3) :

#### b1 - La phase parasite

Elle dépasse rarement plus d'un mois. C'est la phase pendant laquelle se déroulent le gorgement des immatures et des adultes, ainsi que l'accouplement.

*Amblyomma variegatum* est essentiellement un parasite des grands herbivores, en particulier des bovins. Cependant, les chiens, les mangoustes (*Herpestes auropunctatus*) et les oiseaux, notamment le héron garde-boeufs (*Bubulcus ibis*) peuvent être parasités par des immatures et assurer leur dissémination d'une façon difficilement maîtrisable.

#### b2 - La phase libre

Elle se déroule au niveau du sol et de la végétation.

C'est pendant cette phase qu'on lie les mues et la ponte des femelles (une ponte par femelle, de 10000 à 30000 oeufs).

Les phases libres sont soumises aux aléas du milieu extérieur, la température et l'hygrométrie influant notamment sur la cinétique de la ponte et des mues.

La survie de ces stases dans le milieu extérieur peut être très longue : elle est au maximum de 11 mois pour les larves, de 15 mois pour les nymphes et peut atteindre jusqu'à 23 mois chez les adultes placés sur des sites protégés, sur le sol des prairies.

Ces stases sont les plus exposées à la prédation naturelle, bien que celle-ci s'exerce aussi sur les phases parasites (rôle des oiseaux inféodés au bétail).

#### **c - Prédateurs naturels**

Les stases libres sont les plus exposées à la prédation naturelle, bien que celle-ci s'exerce aussi sur les phases fixées sur l'hôte (rôle des oiseaux inféodés au bétail, tel que le Quiscal qui débarasse les bovins de leur tiques).

Les principales espèces prédatrices d'*Amblyomma variegatum* en Guadeloupe sont le merle des Antilles (*Quiscalus lugubris*), le héron garde-boeufs et le poulet domestique, ainsi que la souris (*mus musculus*) et la mangouste.

Cependant, la prédation ayant l'impact le plus intense sur les phases libres en Guadeloupe est celle exercée par les fourmis *Solenopsis geminata* (Barré, 1991).

#### **d - Rôle pathogène**

- **Rôle pathogène direct** : il résulte de la fixation des tiques sur l'hôte (lésions de fixation, surtout au niveau de la mamelle, du fanon et de la région anogénitale chez les bovins, risques d'infections secondaires et d'abcès) et de la spoliation sanguine (anémie).
- **Rôle pathogène indirect** : *Amblyomma variegatum* est vecteur de *Cowdria ruminantium*, rickettsie agent de la cowdriose (heartwater). Cette maladie atteint les caprins de tout âge et les bovins de races améliorées. 3 îles des Antilles sont foyers de cowdriose, la Guadeloupe, Marie-Galante et Antigua. De plus, la présence d'*A. variegatum* est souvent associée à l'apparition de la dermatophilose (affection cutanée due à *Dermatophilus congolensis*), qui peut revêtir des formes graves chez les ruminants de race améliorée.

## e - Répartition géographique

### e1 - répartition actuelle

En Afrique, *A. variegatum* est présente entre 17° de latitude nord et 20° de latitude sud, du Sud du Sahara jusqu'au Zimbabwe et au Mozambique.

Les facteurs limitant son extension sont une pluviométrie trop élevée (> à 2750mm, cas de l'Afrique équatoriale) ou trop faible (< à 400 mm, cas de l'Afrique saharienne), ainsi que des températures trop fraîches (Delot, 1990).

*A. variegatum* a également colonisé, à la faveur des mouvements de bétail, les îles de l'Océan indien (Madagascar, les Comores et les Mascareignes).

Elle a été introduite aux Antilles au XIXe siècle, à la suite d'importation de bétail sénégalais infesté, d'abord en Guadeloupe, à Marie-Galante et à Antigua, puis en Martinique (en 1948). D'autres îles ont été envahies à partir des années soixante, et l'on trouve actuellement *A. variegatum* de Porto Rico dans le Nord Ouest jusqu'à la Barbade et St Vincent dans le Sud Est (Uilenberg, 1990): carte 1.

En Guadeloupe, *A. variegatum* est présent dans pratiquement toutes les zones fréquentées par des ruminants, sauf au dessus de 500 m d'altitude (températures trop fraîches et pluviométrie peut-être trop élevée).

### e2 - Risques d'extension

La présence d'*A. variegatum* dans les Petites Antilles constitue une menace pour les Grandes Antilles et les régions tropicales américaines, indemnes de cowdriose.

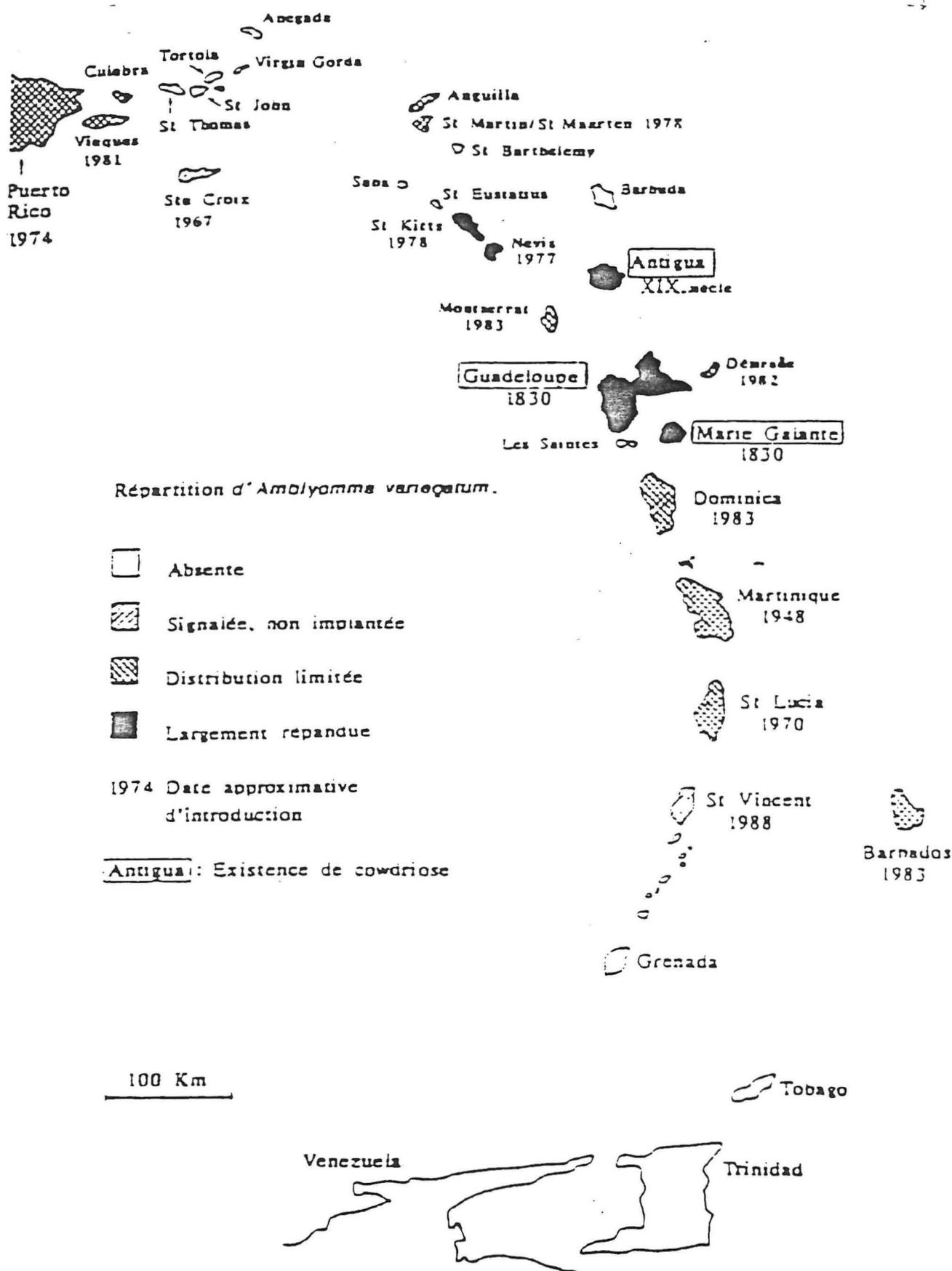
En effet, la relative proximité de l'Amérique (seules Grenade et Trinidad-Tobago restent encore non infestées au Nord du Venezuela), la possibilité de propagation des immatures par le héron garde-boeufs (dont la chronologie d'arrivée et la multiplication dans les Antilles cadre avec l'extension de la tique), la possibilité de mouvements illégaux ou incontrôlés de bétail infesté sont autant de facteurs de risque d'introduction de cette tique sur le continent américain.

*A. variegatum* y trouverait des conditions favorables à son installation (carte 2) et les pertes causés par la cowdriose dans un tel cheptel réceptif seraient certainement importantes. Sans compter que 2 espèces d'*Amblyomma*, *A. maculatum* et *A. cajennense*, largement réparties sur le continent américain ont été démontrées comme vecteurs potentiels de cowdriose.

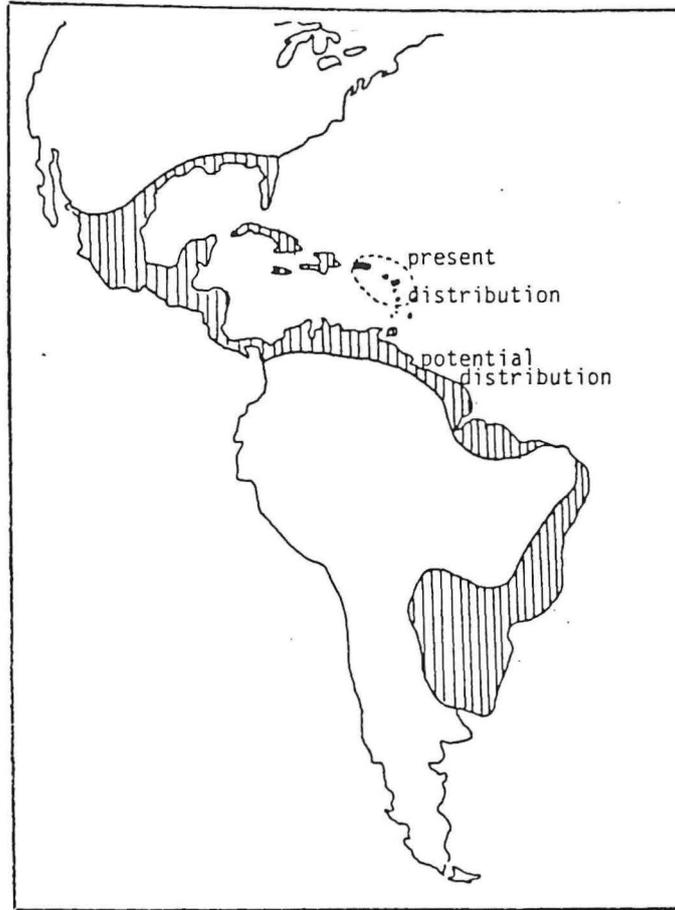
Tout ceci explique en partie les efforts consentis par l'IEMVT, l'INRA et les instituts de recherche américains pour approfondir les connaissances sur cette tique et sur la cowdriose.

## f - Importance économique en Guadeloupe

Les pertes liées aux effets pathologiques directs et indirects d'*A. variegatum* ont été évalués à 7.660.000 francs par an, et le coût de la campagne de détiqage à 4.470.000 francs par an (Stachurski, 1988).



Carte 1 : répartition d'A. variegatum dans les Antilles



Carte 2 : Distribution actuelle et potentielle d'*A. variegatum*

## 2 - Cuticule et glandes dermiques

### **a - La cuticule**

Le tégument des tiques est analogue à celui des autres arthropodes.

La cuticule est sécrétée par les cellules épidermiques. Elle est de nature acellulaire, hétérogène et remplit de multiples rôles.

Sa structure, selon qu'elle soit ou non sclérotisée est représentée dans les figures 4 et 5.

L'épicuticule est constituée de 4 couches différentes, une couche lipidique externe (protection contre la dessiccation), sous laquelle se trouvent la couche épicuticulaire externe, une couche composée de cuticuline et une couche dense aux électrons (proteins epicuticule).

La cuticule non sclérotisée est soit extensible (cas de l'alloscutum), soit inextensible mais flexible (au niveau des articulations intersegmentaires par exemple).

La cuticule sclérotisée permet le maintien de la forme corporelle, joue un rôle protecteur et fournit des points d'attache pour les muscles. On la retrouve entre autre au niveau des pièces buccales (Hackman, 1982).

### **b - Les glandes dermiques**

#### b1 - Structure

Le tégument comporte des cellules épidermiques ayant une activité glandulaires spécialisée, qui sont communément appelées glandes dermiques (figures 4 et 5).

Un à 3 types de cellules sécrétrices sont décrites par Lees (1947) chez les Ixodidés (Hackman 1982, Stauffer 1986):

- type A: grandes cellules sécrétrices qui s'hypertrophient lors du repas sanguin et vont se décharger après le détachement de la tique, avant l'apolyse.
- type B: cellules sécrétrices doubles qui présentent une évolution similaire et plus rapide.
- type C: cellules plus petites, qui sécrètent lentement leur contenu peu avant l'apolyse (ce type pourrait dériver du précédent).

Chez *A. variegatum*, on trouve un grand nombre de glandes dermiques de type I et de type II. Les glandes dermiques de type I ont une distribution ventro-dorso-latérale chez les adultes mâles et femelles. Chez les mâles gorgés, les glandes de type II sont ventrolatérales.

Chez les nymphes à jeun, les glandes de type I se composent de 2 cellules sécrétrices, 2 cellules du canal, 1 cellule enveloppante I et 1 cellule enveloppante II. Ces 3 dernières sont en relation directe avec le pore, qui se présente comme une ouverture reliant le canal à l'extérieur (figure 6).

Les glandes dermiques de type II se composent également de 2 cellules sécrétrices et de cellules différentes formant le canal et le pore (figure 7).

Lors du gorgement, la taille des glandes dermiques I et II augmente rapidement. Après le détachement, les glandes continuent à augmenter en volume jusqu'à atteindre une taille maximale. Ensuite, elles dégèrent rapidement et disparaissent.

Chez les nymphes, cette disparition coïncide avec la séparation de l'épiderme de la vieille cuticule et avec la formation de la cavité exuviale (Balashov, 1972).

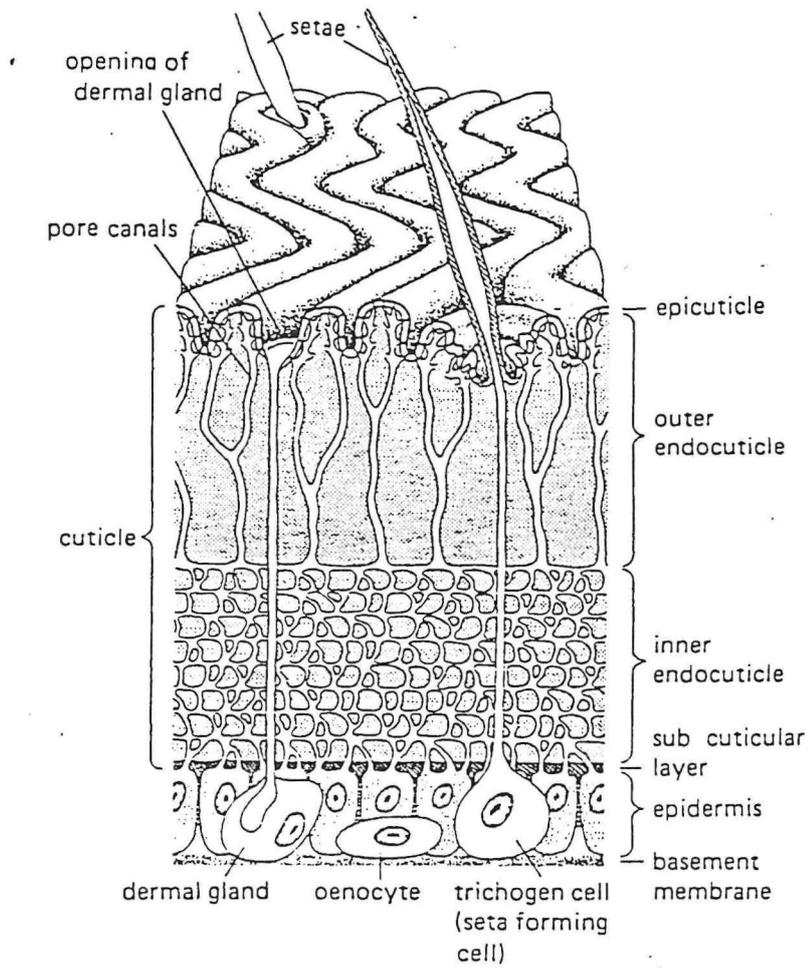


Figure 4 : cuticule non sclérotisée (alloscutum d'une femelle *Boophilus microplus*)

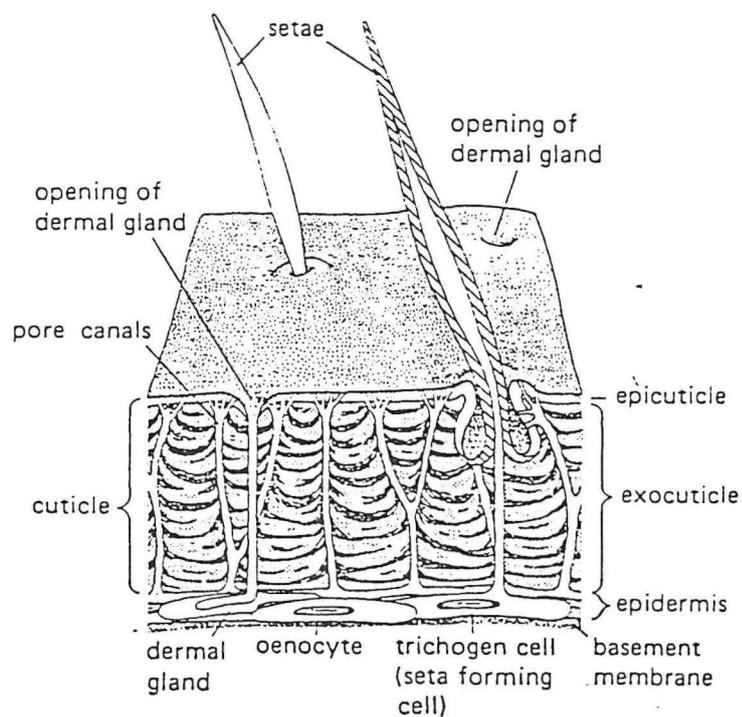


Figure 5 : cuticule sclérotisée (scutum d'une femelle *Boophilus microplus*)

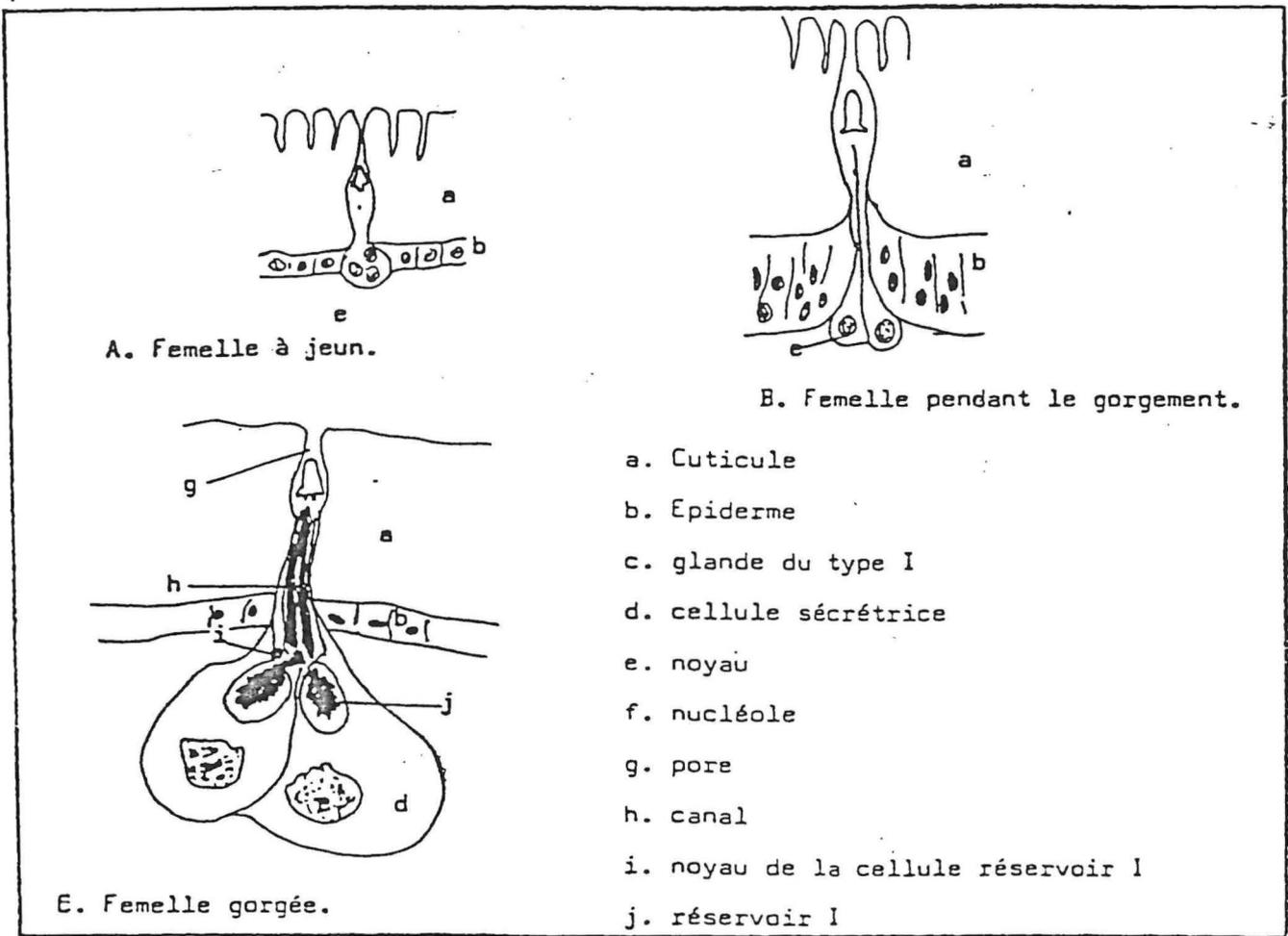


Figure 6 : Glandes dermiques I

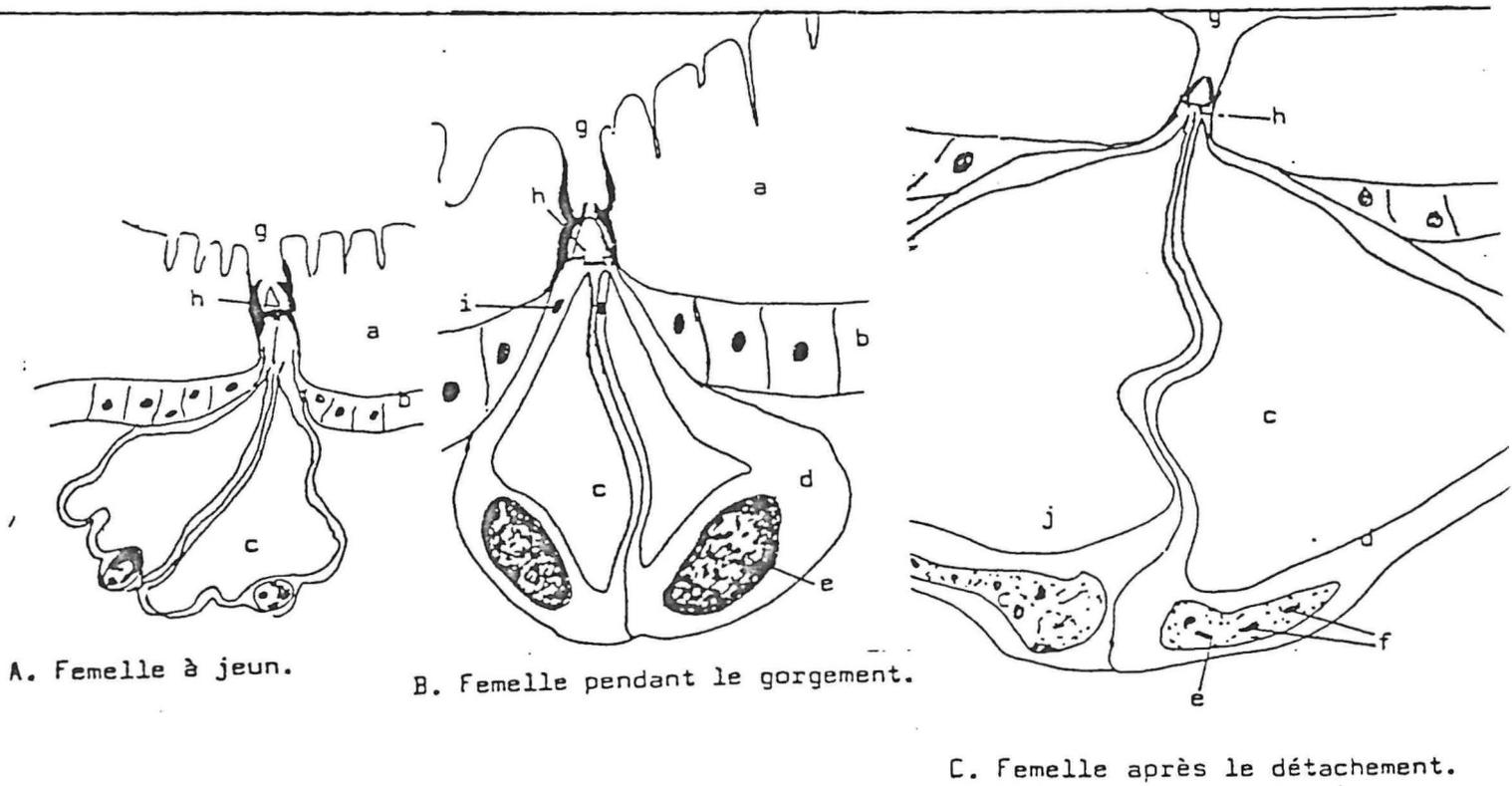


Figure 7 : Glandes dermiques II

## b2 - Rôle

Le rôle des glandes dermiques chez les Ixodidés fait l'objet de nombreuses controverses.

Leur activité est étroitement liée au gorgement et à la mue de la tique (Balashov, 1972).

Des gouttelettes liquidiennes se trouvant à l'orifice de ces glandes ont été observées chez diverses espèces de tiques: chez *Hyalomma* sp et *Dermacentor andersoni*, on parle d'un liquide exuvial. Lees (1947) croit que ces sécrétions participent à la couche cireuse de la cuticule, et remarque la sécrétion d'une substance grasse chez *D. andersoni* et *Ixodes ricinus*. La sécrétion d'un liquide violacé contenant une toxine chez *I. holocyclus* et d'un fluide clair émis après manipulation chez des femelles *Boophilus microplus* a été signalée par d'autres auteurs (Stauffer, 1986). Chez *D. variabilis*, les glandes dermiques II regroupées dans la fovea dorsale sécrètent une phéromone. Ces mêmes glandes dermiques II sécrètent des phéromones chez les mâles *A. variegatum* en gorgement.

Pour cette dernière espèce, nous avons fait quelques observations:

- des gouttelettes d'un liquide transparent sont émises par les larves, les nymphes et les femelles gorgées après manipulation (pincement des pattes).

Cette sécrétion est observée dès les premières heures qui suivent le détachement des nymphes et des femelles, et ce pendant une dizaine de jours .

Les gouttelettes perlent à l'orifice des glandes, s'étalent sur la cuticule et sèchent au bout de quelques minutes.

Lorsque l'on stimule tous les jours cette sécrétion chez des nymphes gorgées (dès le détachement), il se forme progressivement un enduit jaunâtre, friable, à la surface de la cuticule entière. Cet enduit peut être gratté à l'aide d'une aiguille fine et dissout dans de l'eau ou du méthanol.

Cette sécrétion est également observée chez des adultes, dès la sortie de leur exuvie nymphale, alors que la cuticule est encore molle. Ce phénomène est observé jusqu'à 7 jours après la mue. Nous n'avons malheureusement pas pu réaliser d'observations au delà de ce stade et nous ignorons jusqu'à quel moment cette sécrétion se poursuit chez les adultes à jeûn. Néanmoins, cette sécrétion n'était pas observée chez des adultes à jeûn qui avaient mué depuis plusieurs mois.

## B - LES METHODES DE LUTTE ACTUELLES

L'élevage guadeloupéen est resté traditionnel, les animaux étant maintenus à l'attache toute l'année autour d'un piquet. Il s'agit essentiellement de bovins (effectif: 92000 en 1989), porcins et caprins, en majorité de race créole. Les ovins et les équins sont plus rares.

La lutte contre les tiques du bétail est actuellement essentiellement basée sur l'emploi d'acaricides, et les méthodes de lutte alternative en sont encore au stade de la recherche.

### 1 - La lutte chimique

Elle consiste en l'aspersion des animaux par des produits acaricides, par douches ou à l'aide de pulvérisateurs mécaniques ou manuels.

Les produits utilisés sont des organophosphorés (diethion, coumaphos), des pyrethriinoïdes (deltaméthrine) et des triazapentadiènes (amitraz).

La campagne de lutte est organisée par la Fédération Départementale des Groupements de Défense Sanitaire: les agents de la FGDS passent chez les éleveurs adhérents tous les 15 jours pour traiter les

animaux par aspersion.. C'est à l'heure actuelle la méthode la plus efficace pour maintenir les tiques à un niveau tolérable, leur éradication étant difficilement envisageable du fait du transport possible des immatures par des hôtes sauvages.

Enfin, de nombreux éleveurs propriétaires de petits cheptels résistant à la cowdriose n'estiment pas ces traitements nécessaires.

## **2 - La lutte agronomique**

Elle est basée sur la surexploitation des paturages, en accroissant la charge des animaux "pièges", couplée à un traitement acaricide et une rotation des paturages permettant de maintenir l'assainissement obtenu (Barré, 1988).

Cette méthode de lutte reste dans le contexte guadeloupéen purement théorique: les conditions de milieu sont en permanence favorables au développement et à l'activité de la tique, rendant impossible une mise en defens saisonnière des paturages.

La grande résistance des stases libres (essentiellement des adultes) sur les prairies rend le système de rotation des parcelles difficilement applicable.

Ces méthodes se révèlent de plus inadaptées face au contexte de l'élevage traditionnel, et difficilement défendables face à une campagne de détiqage subventionnée en grande partie.

## **3 - La lutte biologique**

Elle reste encore du domaine de la recherche.

Deux voies ont été jusqu'à présent envisagées, l'une exploitant le système de communication phéromonale de cette tique, l'autre faisant appel à des nématodes entomopathogènes.

### **a - Perspectives offertes par les phéromones**

Les plupart des phéromones émises par les différentes stases d'*A. variegatum* ont été identifiées au cours de ces dernières années. Les plus intéressantes sont les phéromones sexuelles et les phéromones d'agrégation-fixation (ces dernières sont libérées par les mâles en gorgement).

On peut envisager l'emploi de ces phéromones seules (piégeage, confusion sexuelle) ou en association avec des acaricides. Dans ce cas, la phéromone permettrait de maximiser l'effet de l'acaricide, en attirant électivement les tiques sur les zones traitées de l'hôte. La confection de tel appâts nécessite la recherche de substrats adaptés et l'évaluation de la stabilité des constituants utilisés (phéromones de synthèse, systèmes à libération contrôlée...).

Néanmoins, aucune préparation exploitant ce système n'est encore commercialisé pour le bétail.

### **b - Essai d'infestation par des nématodes**

Certains nématodes entomopathogènes sont à l'heure actuelle utilisés comme agents de lutte biologique contre divers arthropodes nuisibles.

Différents nématodes parasites d'insectes ont été testés dans cette optique sur *A. variegatum* et 2 autres espèces de tiques, *Boophilus microplus* et *Boophilus annulatus* (absent de Guadeloupe), par l'équipe de H. Mauléon (INRA).

Les essais ont été réalisés avec différentes souches de nématodes (appartenant aux familles des

Steinernematidae et des Heterorhabditidea), dosées à 10000 nématodes par ml (Mauléon 1992). Certaines de ces souches ont été isolées à la suite de prélèvements en Guadeloupe.

Les essais ont été réalisés sur des femelles gorgées et des femelles en ponte, selon le protocole (résumé) suivant: les tiques sont placées dans des boîtes de Pétri dont le fond est recouvert d'une rondelle de papier filtre imbibé de 1 ml de suspension de nématodes. Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 25-27 °C, à l'obscurité. Le nombre de tiques mortes est noté chaque jour, les tiques sont disséquées 3 à 4 jours après leur mort et la présence de nématodes avec ou sans développement est notée.

Les résultats obtenus avec *Boophilus annulatus* sont intéressants (mortalité atteignant 100% après 3 jours avec toutes les souches).

Par contre, ils se sont avérés négatifs pour *Boophilus microplus* et *Amblyomma variegatum*.

Comme nous l'avons vu, la présence de sécrétions cuticulaires a été signalée chez *Boophilus microplus* et est effective chez *Amblyomma variegatum*.

Il est possible, en tout cas pour ce qui est d'*Amblyomma variegatum*, que ces sécrétions cuticulaires participent aux mécanismes de défense de la tique (particulièrement vulnérable après le détachement et jusqu'à la mue) et expliquent l'échec des infestations par les nématodes.

L'étude des propriétés biologiques de ces sécrétions fera donc l'objet de la partie suivante. Des essais d'infestation par des bactéries entomopathogènes seront également réalisées, afin de compléter les essais réalisés à des fins de lutte biologique.

# II - ESSAIS D'INFESTATION PAR DES BACTERIES ENTOMOPATHOGENES

## A - MATERIEL

### 1 - Les animaux utilisés pour le gorgement des tiques

#### a - L'animalerie de l'IEMVT

L'animalerie est située à la station de zootechnie de l'INRA-CRAAG sur le domaine de Duclos, en Basse-Terre.

Elle est constituée de 3 parties (Camus, 1987) :

- un abri avec un plancher en caillebotis où les chèvres sont en liberté.
- une zone avec des cages individuelles où sont isolés les animaux d'expérience, entourée d'une rigole contenant un acaricide.
- une pièce servant de bureau.

#### b - Les chèvres

Les chèvres infestées sont des chèvres créoles, de race naine, provenant de l'île des Saintes (indemne de cowdriose).

Elles sont maintenues pendant les expériences en cage individuelle et nourries à l'auge (fourrage vert et concentré).

### 2 - Les tiques

#### a - Origine et élevage

Les tiques sont des descendants de tiques femelles récoltées gorgées sur des bovins à la ferme de Gardel en Grande-Terre, en Décembre 1982.

Cette souche est entretenue depuis, par passage des stases à jeun sur des chèvres.

Au laboratoire, les oeufs et les larves gorgées sont placés après dénombrement et/ou pesée dans des tubes à hémolyse cotonnés, tandis que les nymphes et les femelles gorgées, ainsi que les adultes non gorgés sont placés dans des tubes en plastique ajourés fermés par un couvercle en plastique.

Les tubes sont conservés dans des bacs de plexiglas à double fond, fermés par un couvercle, et dont la partie inférieure est remplie d'une solution saline saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (cela permet d'assurer une hygrométrie constante de 90 à 95%). Ces bacs sont maintenus à la température du laboratoire et reçoivent la lumière du jour (Camus, 1987).

Des larves issues de femelles sauvages récoltées dans divers élevages de Guadeloupe sont incorporées aux larves d'élevage lors d'apparition de malformations dues probablement à des

phénomènes de consanguinité.

### **b - Le gorgement des tiques**

Les tiques sont mises à gorger sur les chèvres en 2 localisations :

- sur les oreilles, à l'intérieur de manchons en tissu de coton pour les larves.
- sur les flancs, dans des sacs en jersey, pour les nymphes et les adultes.

L'installation de ces sacs se fait de la façon suivante: l'extrémité du manchon en jersey est enduite de colle Néoprène, ainsi que la zone correspondante sur la peau des animaux dont on a préalablement coupé les poils aux ciseaux.

Après séchage, (environ 10 minutes), la partie encollée du sac est appliquée et pressée sur le cercle encollé de peau.

On procède de la même façon pour les sacs placés sur les oreilles, la partie encollée du manchon étant appliquée à la base de l'oreille, sans rasage préalable.

L'extrémité libre des sacs fixés est fermée par un élastique après mise en place des tiques.

Sur une chèvre en bonne condition physique, on peut ainsi mettre à gorger simultanément environ 300 larves (150/oreille) et une centaine de nymphes, ou 300 larves et 10 adultes de chaque sexe.

Les mâles sont mis en place dans les sacs 4 à 5 jours avant les femelles (délai de gorgement nécessaire avant l'émission des phéromones d'agrégation fixation indispensables à la fixation des femelles).

Les tiques gorgées sont récoltées le jour même de leur détachement, qui a lieu généralement tôt le matin et surtout en fin de matinée (figure 8).

Le gorgement dure en moyenne 7,9 jours pour les larves

6,7 jours pour les nymphes

10,6 jours pour les femelles

2 lots de 3 chèvres et un bouc ont été utilisés pour la production des tiques gorgées nécessaires à la réalisation de tous nos tests.

### **3 - Les souches bactériennes entomopathogènes**

Nous avons utilisé 2 souches bactériennes cultivées en routine au laboratoire de H. Mauléon (INRA), *Bacillus thuringiensis* LM2174 et *Serratia marcescens* (biotype coloré).

Leurs caractéristiques respectives sont regroupées dans le tableau I.

Les suspensions bactériennes sont conservées au congélateur et sont titrées à environ  $10^6$  bactéries par ml (entre  $10^5$  et  $10^7$  bact/ml, titrage réalisé par ensemencement spirale et comptage).

	BACILLUS THURINGIENSIS	SERRATIA MARCESCENS
Définition	Bacilliacea Groupe I Gram +, sporulé, mobile Aéroanaérobic facultative	Enterobacteriaceae Groupe III, Genre Serratia Gram -, peu mobile Aéroanaérobic facultative
Habitat	Sol, eau, air (germe tellurique)	Ubiquitaire
Rôle pathogène	Pathogène pour les insectes	Pathogène opportuniste (microbisme hospitalier) Pathogène expérimentalement pour les Insectes (biotype pigmenté).
Morphologie	Batonnet de diamètre < à 0,9µm Spores ne déformant pas le corps bactérien	Batonnets de diamètre compris entre 0,5 et 1 µm
Culture	Croissance sur gélose ordinaire à pH proche de la neutralité, en 24 heures	Croissance sur gélose ordinaire en 24 heures. Colonies pigmentées en rouge

Tableau I : caractéristiques de Bacillus thuringiensis et de Serratia marcescens

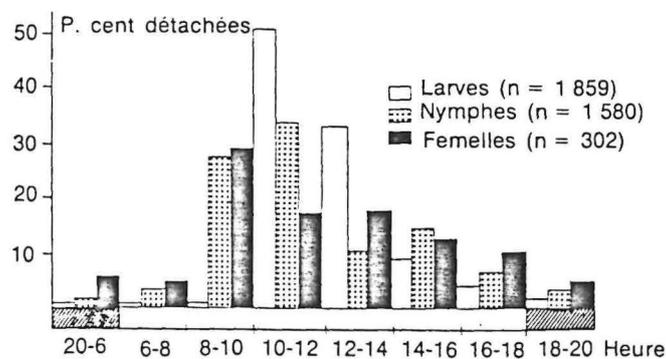


Figure 8 : rythme de détachement des 3 stases en fonction de l'heure

## **B - METHODE**

Nous avons testé le pouvoir pathogène respectif de ces 2 souches bactériennes sur des larves et des nymphes gorgées, à 2 stades de détachement (le premier et le 6<sup>e</sup> jour après détachement), selon 2 protocoles différents: par contact et par inoculation.

Nous nous sommes inspirés de la technique utilisée pour les essais d'infestation par des nématodes.

### **1 - Pouvoir pathogène par contact**

Les tiques sont placées dans des boîtes de Pétri dont le fond est recouvert de papier filtre imbibé de la suspension bactérienne considérée (0,5 ml de suspension par boîte).

Dans les boîtes témoins, le papier filtre est imbibé d'eau distillée.

Le nombre d'individus utilisé par boîte est de 10 pour les larves et de 5 pour les nymphes.

On réalise 6 répétitions pour chacune des 2 stases, aux 2 moments de détachement précités.

Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 26°C, et le papier filtre est imbibé régulièrement d'eau distillée pour maintenir une hygrométrie suffisante.

Les boîtes contenant les larves gorgées sont entourées d'un film plastique Parafilm dès le début des premières mues pour éviter la fuite des nymphes à jeun.

La mortalité des tiques est évaluée par le nombre d'individus n'ayant toujours pas mué après les délais moyens normaux

( à savoir environ 20 jours pour les larves et 25 jours pour les nymphes).

### **2 - Pouvoir pathogène par inoculation**

L'inoculation est réalisée à la jonction entre le capitulum et le scutum, à l'aide d'une aiguille fine dont l'extrémité est trempée dans la suspension bactérienne considérée.

Pour les témoins, on opère de la même façon mais l'aiguille est laissée stérile.

Les tiques sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri, dont le fond est recouvert d'un papier filtre imbibé d'eau distillée régulièrement et mises à l'étuve à 26°C. Le nombre d'individus par boîte est le même que dans le test précédent, et l'on réalise également 6 répétitions pour chacune des 2 stases, aux 2 stades de détachement.

La mortalité est évaluée comme précédemment.

## **C - RESULTATS**

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 2 à 7 .

Nous n'avons pas testé le pouvoir pathogène par contact des bactéries sur les larves détachées depuis 6 jours, ni sur les nymphes détachées depuis 24 heures, faute de tiques en nombre suffisant.

Test n°	Bacillus thuringiensis		Serratia marcessens	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	1	2	3	5
2	3	2	5	5
3	1	2	3	1
4	4	2	1	2
5	1	0	2	3
6	2	1	0	2

Tableau 2 : Pouvoir pathogène par contact

Larves détachées depuis moins de 24 heures

Test n°	Bacillus thuringiensis		Serratia marcessens	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	0	1	1	1
2	1	1	0	1
3	1	2	3	2
4	0	0	1	7
5	0	0	0	1
6	3	2	0	0

Tableau 3 : Pouvoir pathogène par contact

Nymphes détachées depuis 6 jours

Test n°	Bacillus thuringiensis		Serratia marcessens	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	2	3	2	4
2	0	3	1	3
3	3	2	0	0
4	2	3	1	2
5	1	1	2	2
6	1	2	0	0

Tableau 4 : Pouvoir pathogène par inoculation  
Larves détachées depuis moins de 24 heures

Test n°	Bacillus thuringiensis	
	Témoins	Traitées
1	6	5
2	5	5
3	5	3
4	7	7
5	4	6
6	5	4

Tableau 5 : Pouvoir pathogène par inoculation  
Larves détachées depuis 6 jours

Test n°	Bacillus thuringiensis		Serratia marcessens	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	0	1	0	1
2	1	0	0	1
3	0	1	1	0
4	0	0	0	0
5	0	0	1	0
6	1	0	0	0

Tableau 6:Pouvoir pathogène par inoculation  
Nymphes détachées depuis moins de 24 heures

Test n°	Bacillus thuringiensis		Serratia marcessens	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	0	0	2	2
2	0	1	2	1
3	0	0	2	2
4	2	1	1	3
5	0	0	1	3
6	0	0	3	2

Tableau 7:Pouvoir pathogène par inoculation  
Nymphes détachées depuis 6 jours

Pour comparer les résultats obtenus chez les individus témoins et traités, nous avons utilisé le test statistique de Mann et Whitney (test non paramétrique sur séries non appariées).

Pour chacun des tests effectués, il n'y a pas de différence significative entre les lots témoins et les lots traités ( seuil de 5%).

## **D - DISCUSSION**

Ces 2 souches bactériennes ne se révèlent pas, dans les conditions de notre expérimentation, pathogènes envers les larves et les nymphes gorgées d'*A. variegatum*.

Le titre des suspensions bactériennes utilisées est pourtant assez élevé.

Dans les essais d'infestation par contact, il se peut que les bactéries n'aient pu franchir la barrière cuticulaire et/ou que les sécrétions cuticulaires aient une action antibactérienne.

Ou bien les bactéries peuvent effectivement pénétrer mais génèrent une réaction immunitaire efficace, ce que semblent indiquer les résultats négatifs obtenus lors des inoculations.

# III - ETUDE DU ROLE DEFENSIF DES SECRETIONS CUTICULAIRES

## A - TEST DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE

### 1 - Préliminaire

Les propriétés antibiotiques (ou antiseptiques) des sécrétions cuticulaires d'*Amblyomma variegatum* ont été mises en évidence pour la première fois par H. Mauléon (INRA) : selon la méthode des antibiogrammes par diffusion en gélose, des disques de papier filtre imbibés des sécrétions cuticulaires de différentes stases d'*Amblyomma* (nymphe gorgée et à jeun, femelle à jeun et gorgée à différents stades de détachement, mâle à jeun) ont été déposés sur des gélosesensemencées par *Bacillus thuringiensis*.

Une inhibition de la croissance bactérienne autour des disques traités a été constaté dans tous les cas, sauf pour les disques imbibés des sécrétions de nymphe et de femelle gorgée détachées depuis moins de 24 heures (figure 8).

Le but de la manipulation que nous avons effectuée était de :

- confirmer les résultats obtenus par H. Mauléon.
- déterminer le moment du détachement des nymphe et des femelle gorgée à partir duquel les sécrétions acquièrent ces propriétés, entre 0 et 48 heures.
- tester l'activité de ces sécrétions vis à vis d'une autre souche bactérienne, *Serratia marcescens* (qui nous l'avons vu, ne semble pas pathogène pour *A. variegatum*).

### 2 - Matériel

Il s'agit du matériel nécessaire à la réalisation d'antibiogrammes par diffusion en gélose:

- milieu de culture : gélose de Mueller-Hinton (composition en Annexe 1) coulée de façon stérile dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, sur une épaisseur de 4 mm environ, mises à sécher une heure à température ambiante sous la hotte à flux laminaire et conservées ensuite au réfrigérateur à -4 C.
- inoculum : il s'agit de cultures pures de *Bacillus thuringiensis* et *Serratia marcescens* (cf paragraphe II.3), toutes 2 sensibles à la Kanamycine.
- matériel biologique : femelle et nymphe gorgée, dont on prélève les sécrétions cuticulaires à différents stades de détachement:
  - Entre le moment du détachement et 48 heures post-drop, on récolte des sécrétions toutes les 6 heures (nécessité d'utiliser plusieurs lots de tiques car les tiques manipulées ne sécrètent de façon abondante qu'une fois par jour).
  - Pour les antibiogrammes réalisés avec *Bacillus thuringiensis*, on récolte également les sécrétions le 6e et le 12e jour suivant le détachement (afin de vérifier les résultats obtenus par H. Mauléon)

Résultats (pondérés K30)  
Antibiogramme *Amblyomma variegatum*

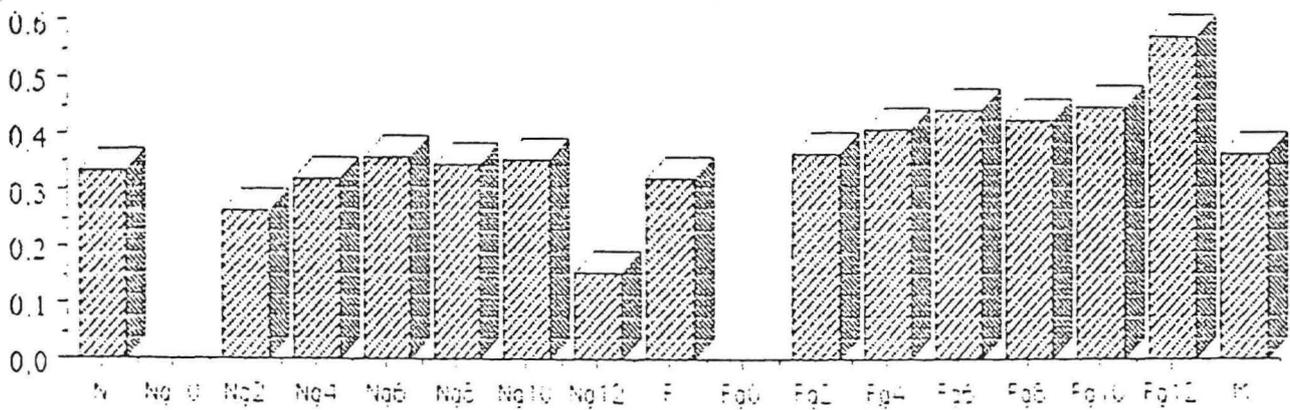


Figure 9 : Antibiogrammes réalisés avec *Bacillus thuringiensis* (H. Mauléon)

- Pour les antibiogrammes réalisés avec *Serratia marcescens*, on récolte les sécrétions tous les 2 jours, jusqu'au 12<sup>e</sup> jour de détachement.

- Disques de papier filtre stériles utilisés comme support pour les sécrétions cuticulaires, d'un diamètre de 6 mm.
- Disques imbibés de Kanamycine 30 (standard), d'un diamètre de 6 mm et dosés à 30 ug de Kanamycine.
- Pipettes stériles de 1 ml utilisées pour l'ensemencement.

### **3 - Méthode**

La méthode des antibiogrammes par diffusion en gélose est basée sur le fait qu'un antibiotique "déposé" sur une gélose nutritive ensemencée va diffuser suivant un gradient de concentration. La bactérie ne se développera pas pour les concentrations supérieures ou égales à la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice : la plus petite concentration en antibiotique capable d'inhiber la croissance du germe considéré).

On observera donc une zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique, plus ou moins grande suivant la sensibilité de la souche bactérienne.

Une telle zone d'inhibition devrait donc être observée autour des disques imprégnés de sécrétions cuticulaires, si celles-ci présentent du moins des propriétés antibiotiques.

Il s'agit néanmoins d'une méthode purement qualitative.

Pour chaque antibiogramme, on procède comme suit

- l'ensemencement se fait par inondation de toute la surface de la gélose avec 1 à 2 ml d'inoculum. L'excès est enlevé en inclinant la boîte de Pétri et en réaspirant à la pipette.

On laisse sécher 15 minutes à l'étuve à 28 C.

- Les sécrétions cuticulaires sont récoltées sur 3 disques de papier filtre stériles: les tiques sont stimulées sous la loupe binoculaire (par pincement des pattes) et l'on adsorbe les gouttelettes de sécrétions qui apparaissent à l'orifice des glandes dermiques directement sur les disques.

Pour imprégner 1 pastille jusqu'à saturation, il faut en moyenne utiliser 10 nymphes gorgées ou 1 femelle gorgée.

La quantité de sécrétions récoltée est évaluée par pesée des disques avant et après imprégnation.

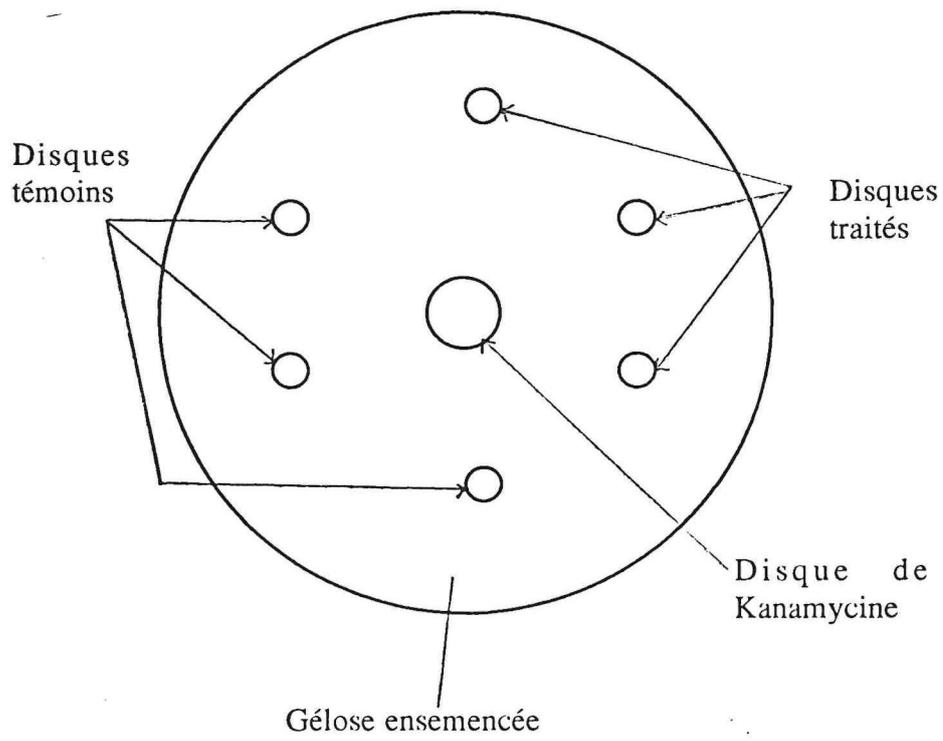
- Les 3 disques imprégnés sont déposés sur la gélose à la pince flambée, en appuyant légèrement pour faciliter l'adhérence.

on dispose de la même façon 3 disques témoins vierges et une pastille de Kanamycine 30 (utilisée comme référence, puisque la dose de l'inoculum n'est pas connue avec précision).

la boîte est ensuite placée renversée à l'étuve et mise à incuber 24 heures à 28 C (délai qui permet d'obtenir une croissance dense mais non confluyente).

### **3 - Résultats et discussion**

La lecture s'effectue après 24 heures d'étuve, par mesure du diamètre de la zone d'inhibition observée autour des disques traités: ces mesures sont reportées pour chaque stase et à tous les moments de détachement choisis, pour les 2 bactéries, en Annexe 2.



Représentation schématique d'un antibiogramme

On réalise la moyenne, pour les 3 disques, du diamètre d'inhibition observé (Dm). Ce diamètre moyen est divisé par le diamètre de la zone d'inhibition observée autour du disque de Kanamycine (Dm/K).

- On constate, pour les antibiogrammes réalisés avec les sécrétions de femelles gorgées, une inhibition de la croissance des 2 bactéries autour des disques traités, quelque soit le stade de détachement des femelles (même pour des femelles détachées depuis moins de 6 heures).

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 8 et 9 et illustrés par les figures 10 et 11.

Les quantités de sécrétions récoltées sont très variables (de 0,7 mg à 3,6mg) et il ne semble pas y avoir de rapport entre la quantité de sécrétions récoltées et le diamètre de la zone d'inhibition observée.

- Pour les antibiogrammes réalisés avec les sécrétions de nymphes gorgées, on constate une inhibition de la croissance de *Bacillus thuringiensis* autour des disques traités, ce dès les premières heures du détachement, mais la réaction observée est peu nette (halo ou diforme): tableau 10 et figure 12.
- Avec *Serratia marcescens*, les résultats sont inégaux et plus difficilement interprétables: on observe une activité pour les sécrétions récoltées 18 à 36 heures après détachement et récoltées le 6e, 8e et 10e jour: tableau 11 et figure 13.

Les quantités de sécrétions récoltées avec les nymphes sont plus faibles qu'avec les femelles (de 0,1 à 0,49mg) et le temps nécessaire pour impregner un disque est plus long (10 nymphes à stimuler, soit environ 30 minutes de nécessaires pour saturer une pastille).

Les résultats obtenus avec *Bacillus thuringiensis* confirment ceux d'H. Mauléon, sauf en ce qui concerne les sécrétions de femelles ou de nymphes détachées depuis moins de 24 heures, qui se révèlent actives.

On retrouve une telle activité antibiotique vis à vis de *Serratia marcescens*, plus nette avec les sécrétions des femelles qu'avec celles des nymphes.

Ces propriétés antibactériennes des sécrétions cuticulaires pourraient expliquer l'échec des essais d'infestations par ces 2 mêmes bactéries, du moins en ce qui concerne les essais d'infestations par contact.

Stade de détachement	0 - 6 heures	6 - 12 heures	12 - 18 heures	18 - 24 heures	24 - 30 heures	30 - 36 heures	36 - 42 heures
Qm (mg)	2,0	0,6	2	3,1	0,3	0,†	1,4
Dm (mm)	8,3	10	11	7	7	8,5	H 14*
Dm/K	0,3	0,4*	0,5	0,3	0,3	0,3**	

Stade de détachement	42 - 48 heures	4 jours	6 jours	8 jours
Qm (mg)	3,6	1,5	0,9	0,3
Dm (mm)	9	7	9,3	9,3
Dm/K	0,39*	0,25**	0,31	0,26

Tableau 8 : :Antibiogrammes réalisés avec *Bacillus thuringiensis* . Pondération Kanamycine (sécrétions de femelles gorgées)

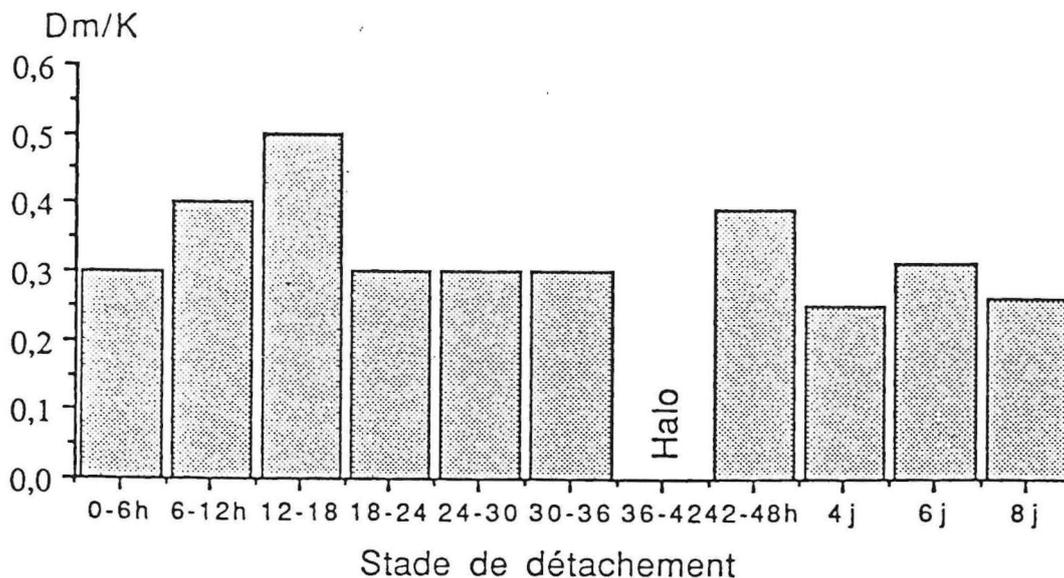


Figure 10 :Antibiogrammes réalisés avec *Bacillus thuringiensis* (sécrétions de femelles gorgées)

On réalise la moyenne pour les 3 pastilles de la quantité de sécrétions récoltées (Qm) et du diamètre d'antibiose observé (Dm) .  
Le diamètre moyen est divisé par le diamètre obtenu avec la Kanamycine ( Dm/K) .

NB : \*\* : Moyenne de 2 valeurs seulement

\* : Valeur unique ( seule réaction positive observée pour les 3 pastilles, ou réaction la plus nette lorsqu'il s'agit de halos ou de réactions difformes)

Stade de détachement	0 - 6 heures	6 - 12 heures	12 - 24 heures	24 - 30 heures	30 - 36 heures	36 - 48 heures
Qm (mg)	1,2	0,6	1,4	0,7	0,5	1,16
Dm (mm)	Di*	7,3	7,3	7,3	7	7
Dm/K		0,4	0,4	0,42	0,29	0,38

Stade de détachement	4 jours	6 jours	8 jours	10 jours	12 jours
Qm(mg)	1,33	1,3	0,36	1,4	0,6
Dm (mm)	8,3	8	10	7,6	6,3
Dm/K	0,33	0,32*	0,23	0,23	0,37

Tableau 9 : :Antibiogrammes réalisés avec *Serratia marcescens* . Pondération Kanamycine (sécrétions de femelles gorgées)

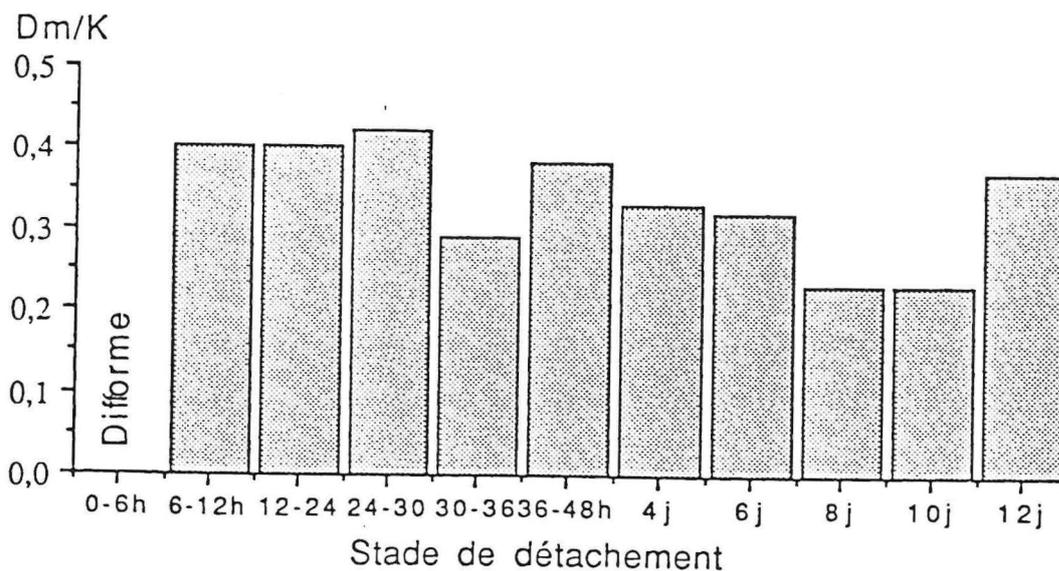


Figure 11 :Antibiogrammes réalisés avec *Serratia marcesecens* (sécrétions de femelles gorgées)

Stade de détachement	0 - 6 heures	6 - 12 heures	12 - 18 heures	18 - 24 heures	24 - 36 heures	36 - 48 heures
Qm (mg)	0,2	0,1	0,33	0,26	0,23	0,4
Dm (mm)	H7**	Di*	7	7,6	7,3	11,3
Dm/K			0,26	0,3	0,22	0,49

Stade de détachement	2 jours	6 jours
Qm (mg)	0,4	0,33
Dm (mm)	7,6	8,6
Dm/K	0,36	0,39

Tableau 10 : :Antibiogrammes réalisés avec *Bacillus thuringiensis* . Pondération Kanamycine (sécrétions de nymphes gorgées)

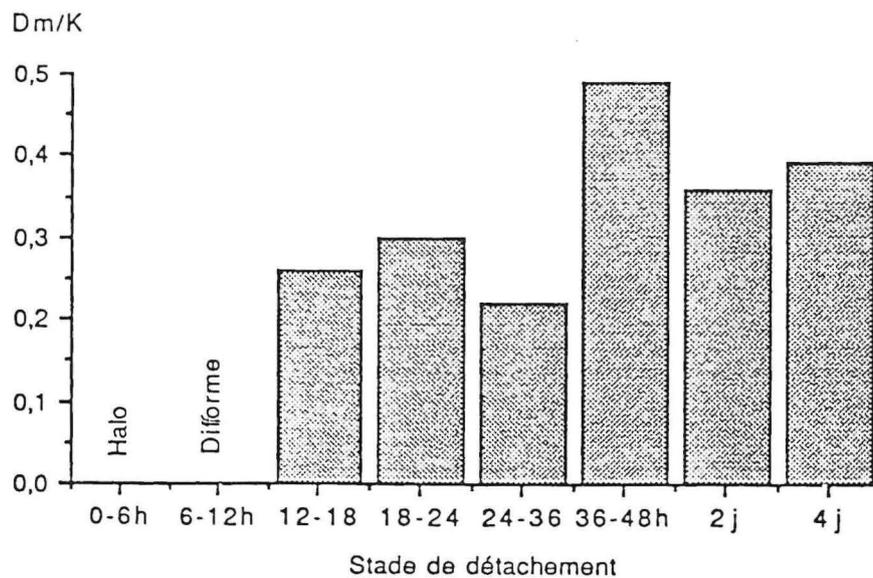


Figure 12 :Antibiogrammes réalisés avec *Bacillus thuringiensis* (sécrétions de nymphes gorgées)

Stade de détachement	0 - 6 heures	6 - 12 heures	12 - 18 heures	18 - 24 heures	24 - 36 heures	36 - 48 heures
Qm (mg)	0,1	0,2	0,2	0,16	0,2	0,26
Dm (mm)	0	0	0	8	7	0
Dm/K	0	0	0	0,38	0,28**	0

Stade de détachement	2 jours	4 jours	6 jours	8 jours	10 jours
Qm (mg)	0,1	0,4	0,26	0,17	0,33
Dm (mm)	0	0	H7**	H9*	7
Dm/K	0	0			0,41*

Tableau 11 : :Antibiogrammes réalisés avec *Serratia marcescens*. Pondération Kanamycine (sécrétions de nymphes gorgées)

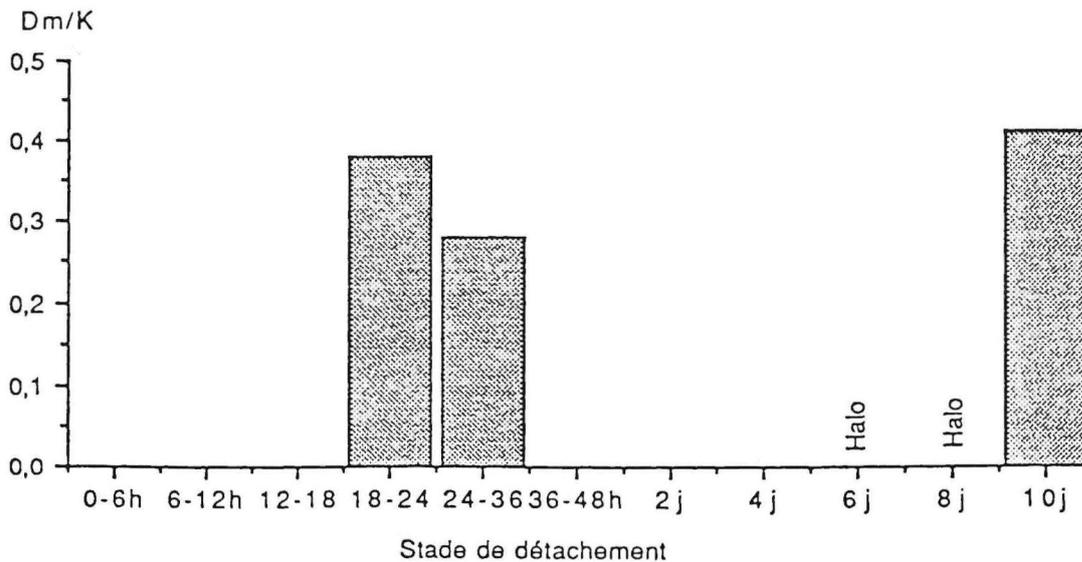


Figure 13 :Antibiogrammes réalisés avec *Serratia marcescens* (sécrétions de nymphes gorgées)

## **B - TEST DE L'ACTIVITE REPULSIVE**

L'effet répulsif des sécrétions cuticulaires d'*A. variegatum* sur les fourmis *Solenopsis geminata* a été mis en évidence par C. Pavis en 1990.

Il s'agissait des sécrétions de mâles à jeun (délai écoulé depuis la mue inconnu), utilisées pures.

Le but de nos tests est de rechercher l'existence d'une telle activité répulsive chez les stases gorgées d'*Amblyomma* (les plus vulnérables au sol), à différents stades de détachement.

### **1 - Matériel**

#### **a - Les insectes**

##### **a1 - Les fourmis**

La fourmi *Solenopsis geminata* est la principale espèce prédatrice des phases libres d'*A. variegatum* en Guadeloupe.

L'impact de cette prédation a été estimé lors d'une expérimentation en champs: au total, 9,5% des tiques gorgées relâchées à Duclos (Basse-Terre) ont été attaquées par cette espèce de fourmis, tandis que les tiques à jeun (plus mobiles) n'ont pas été attaquées.

Le mode d'attaque des fourmis est caractéristique, les tiques étant amputées puis vidées de leur contenu.

Afin de tester l'effet des sécrétions cuticulaires d'*Amblyomma* sur la prédation des fourmis, nous avons prélevé des nids de fourmis à Duclos et nous les avons maintenus au laboratoire dans des conditions artificielles : la terre prélevée au centre d'un nid sauvage et contenant de nombreuses fourmis est répartie dans des boîtes rectangulaires en plastique (10 cm de large, 22 cm de long et 10 cm de haut), dont les bords internes sont enduits de fluon sur une largeur de 2 cm. Ce dispositif permet d'éviter la fuite des fourmis.

Les nids sont laissés à température ambiante, à la lumière du jour et la terre est régulièrement humectée pour maintenir une hygrométrie suffisante.

##### **a2 - Les chenilles de *Galleria mellonella***

Ces chenilles serviront de proies lors de nos tests.

Cet insecte est élevé au laboratoire de H. Mauléon, sur milieu nutritif (cire d'abeille et pollen).

Nous utilisons des chenilles de 2 à 3 mm de long, préalablement tuées par congélation (immobilité nécessaire lors des tests).

#### **b - Sécrétions cuticulaires: réalisation de différents extraits**

Nous avons évalué l'activité des sécrétions cuticulaires des larves, nymphes et femelles gorgées, le 1er et le 6e jour après détachement.

4 extraits différents sont réalisés pour chacune de ces stases, les solvants utilisés étant le méthanol, l'hexane, le dichlorométhane et l'eau distillée.

Les larves gorgées sont mises directement à macérer dans le solvant considéré, tandis que pour les femelles et les nymphes, les sécrétions sont absorbées sur des pastilles de papier filtre mises ensuite à

tremper dans le solvant.

Le nombre d'individus utilisés par extrait est le suivant:

Extraits avec les larves gorgées : 160 larves mises à macérer dans 1 ml de solvant pendant 2 heures. Le surnageant est récupéré et réduit à 160 ul par évaporation sous un flux d'argon: 10 ul d'extrait sont déposés par chenille traitée, ce qui correspond à une concentration de 10 larves gorgées éq/chenille.

Extraits avec les nymphes gorgées : récolte des sécrétions de 50 nymphes sur pastilles de papier filtre, mises à macérer dans 1 ml de solvant pendant 2 heures. Les pastilles sont ensuite retirées et l'extrait est réduit à 100 ul.

Extraits avec les femelles gorgées : on procède comme avec les nymphes, mais 3 femelles seulement sont utilisées par extrait.

## 2 - Méthode

Il s'agit d'un test de choix permettant d'évaluer l'effet répulsif des sécrétions cuticulaires sur le prélèvement des chenilles de *Galleria mellonella* par les fourmis.

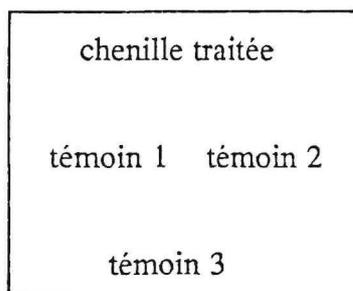
Réalisation du test : on place sur un des nids de fourmis un présentoir avec 4 chenilles de *Galleria*.

- 1 chenille traitée enduite de 10 ul d'extrait

( ce qui correspond à une concentration de 10 larves gorgées d'*A. variegatum* éq/chenille, ou à 5 nymphes gorgées éq/chenille ou à 0,3 femelle gorgée éq/chenille).

- 3 chenilles témoins enduites de 10 ul de solvant.

Le présentoir est constitué par un carré de papier bristol (3cm\*3cm), sur lequel l'emplacement initial de chaque chenille est indiqué : figure 14



On note à quel instant et dans quel ordre les chenilles sont emportées hors du présentoir par les fourmis (déclenchement du chronomètre dès que le présentoir est posé sur le nid).

La durée du test a été fixée après des essais préliminaires à 20 minutes.

10 répétitions sont réalisées pour chacun des extraits.

Le présentoir est changé après chaque test et tourné d'un quart de tour entre chaque test pour neutraliser les effets liés à l'éclairement.

Deux nids de fourmis sont nécessaires en général pour la réalisation d'une série de 10 tests.

### 3 - Résultats

#### a - Mode de présentation des résultats

Nous avons réalisé 10 tests pour chaque extrait, ce qui équivaut au total pour un extrait, à la présentation de 10 chenilles traitées et 30 chenilles témoins.

Afin de rendre compte de l'évolution de la prédation des différentes larves de *Galleria* au cours du temps, nous avons représenté sous forme d'histogrammes l'évolution du total cumulé (pour les 10 tests) du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours des 20 minutes d'expérience.

Les temps de prélèvements (en secondes) au cours des 10 tests, de chacune des 4 larves présentées, constituent 4 séries de 10 valeurs : nous avons comparé ces 4 séries à l'aide de 2 tests statistiques non paramétriques, les tests de Friedman et de Wilcoxon ( résultats en Annexe 3). Cela permet de conclure s'il y a ou non une différence significative entre la prédation des larves traitées et témoins, au seuil de 5% .

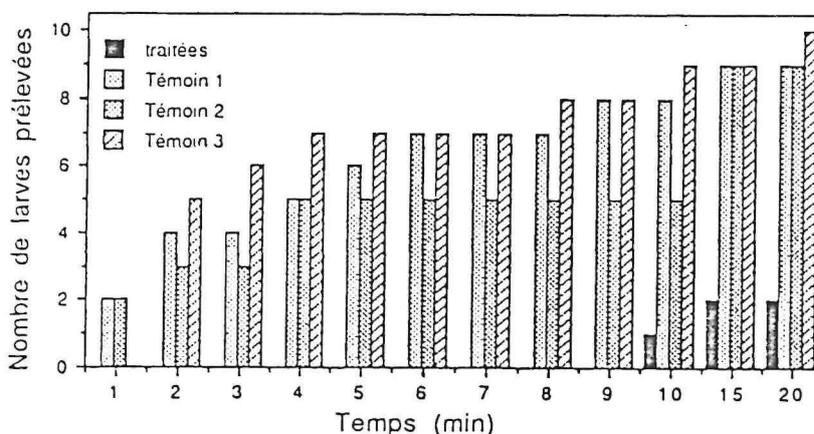
Nous avons également représenté sous forme d'histogrammes la valeur du total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes de test, pour chaque extrait : en effet, l'effet répulsif, lorsqu'il existe, se fait sentir essentiellement pendant les premières minutes du test (et la comparaison des valeurs à  $t=3\text{min}$  permet de retrouver ou non une différence significative entre prédation des larves traitées et témoins).

#### b - Résultats obtenus avec les larves gorgées

Tous les extraits n'ont pu être réalisés faute de tiques en nombre suffisant.

##### ● Larves détachées depuis moins de 24 heures.

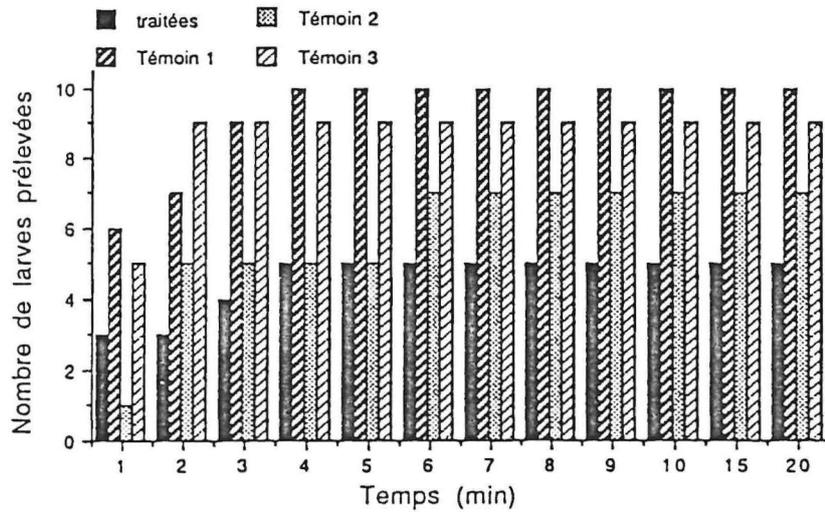
- Les chenilles traitées avec l'extrait au méthanol sont significativement moins prélevées que les chenilles témoins (figure 15).



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 15: Extrait méthanol: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test. (10 répétitions)

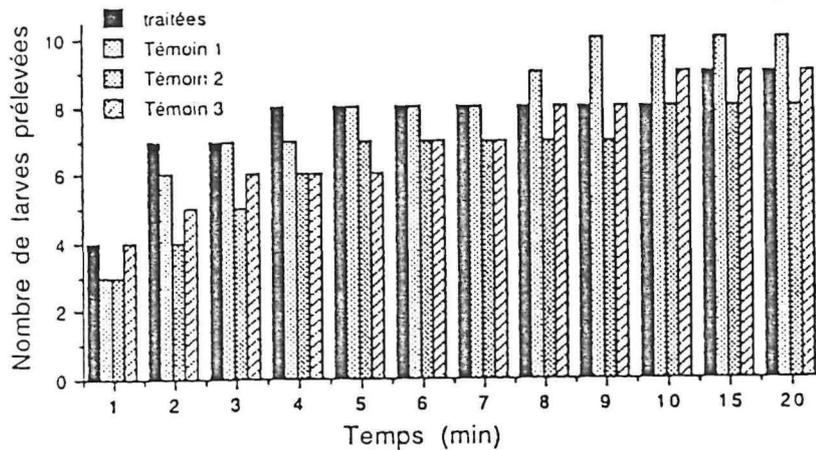
- Pour les chenilles traitées avec l'extrait au dichlorométhane, cette différence est moins nette.



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins n°1 (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 16 :Extrait dichlorométhane: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)

- L'extrait à l'hexane ne présente pas d'activité répulsive.



Pas de différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 17 :Extrait hexane: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test. (10 répétitions)

- Comparaison entre extraits à t=3min

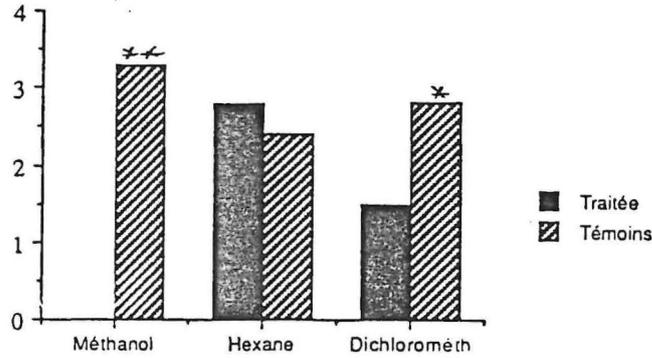


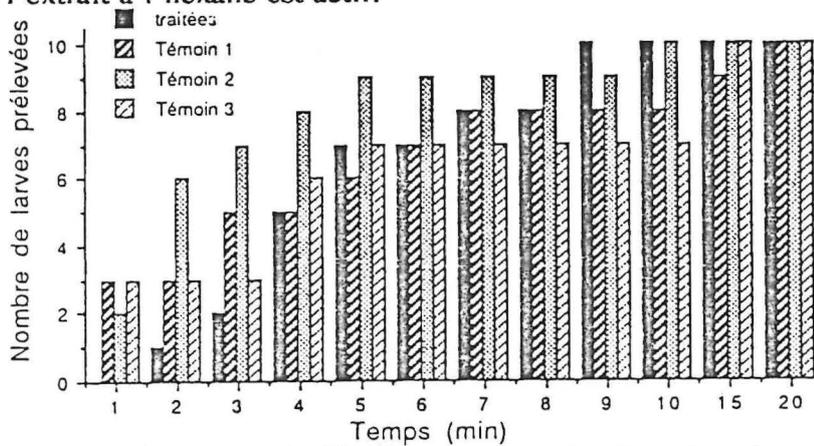
Figure 18 : total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes

\*\* différence significative

\* différence significative avec une larve témoin

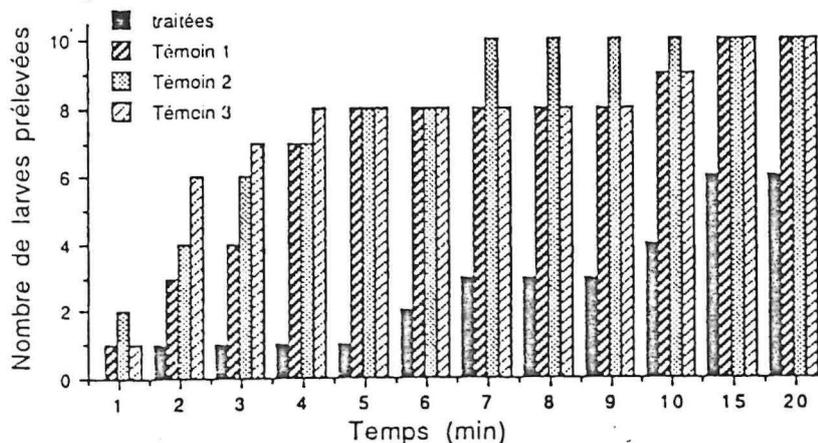
● Larves détachées depuis 6 jours

- L'évolution de la prédation par les fourmis est représentée pour les 2 extraits testés dans les figures 19 et 20. Seul l'extrait à l'hexane est actif.



Pas de différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 19 :Extrait méthanol: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 20 :Extrait hexane:Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)

- Comparaison entre extraits à t=3min

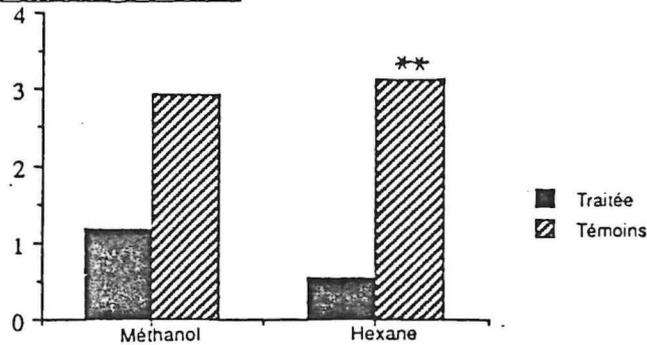
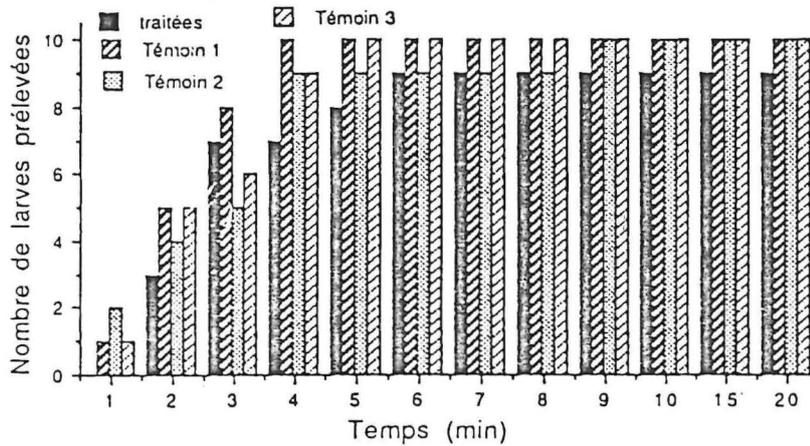


Figure 21: total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes

c - Résultats obtenus avec les nymphes gorgées.

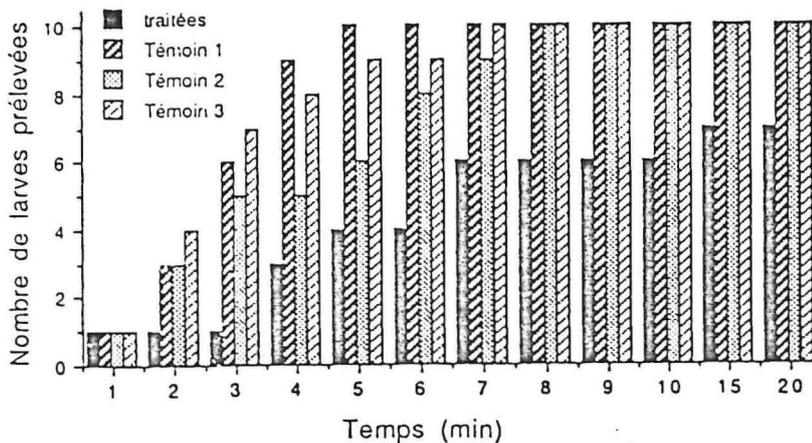
● Nymphes détachées depuis moins de 24 heures

L'extrait à l'hexane est actif, les extraits au dichlorométhane et à l'eau distillée également, mais pour ces derniers, la différence de prédation n'est significative qu'entre larves traitées et une larve témoin.



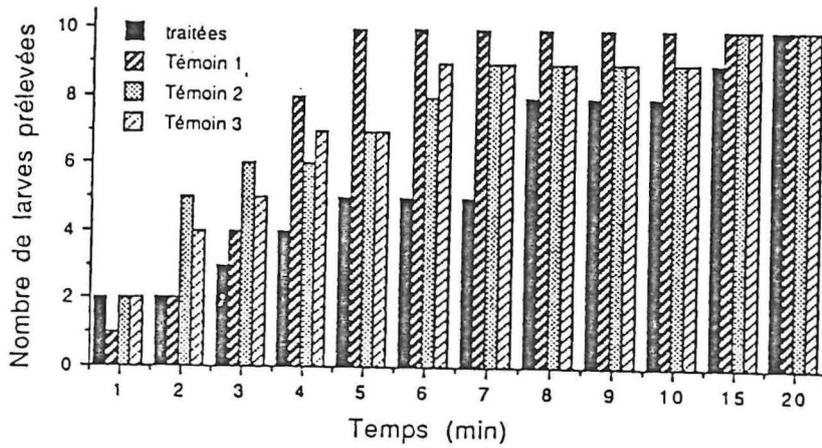
Pas de différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 22:Extrait méthanol: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



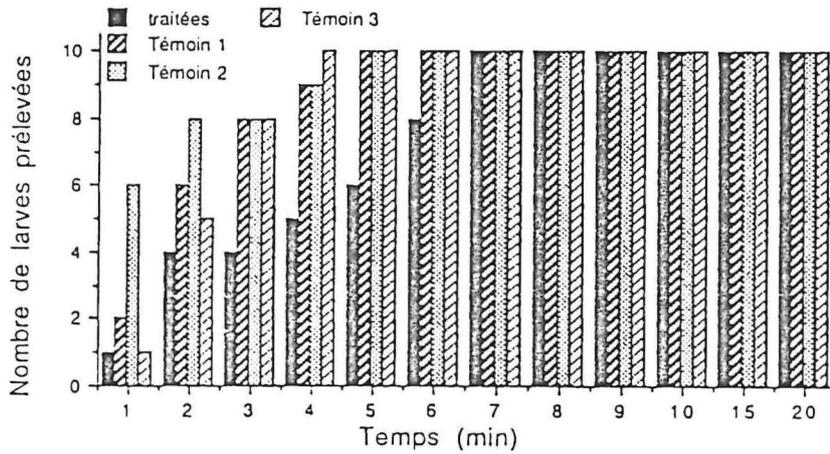
Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 23 :Extrait hexane:Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Difference significative entre prédation des larves traitées et témoins n°3 (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 24: Extrait dichlorométhane: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Difference significative entre prédation des larves traitées et témoins n°2 (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 25: Extrait H2O: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)

Comparaison entre extraits à t=3min

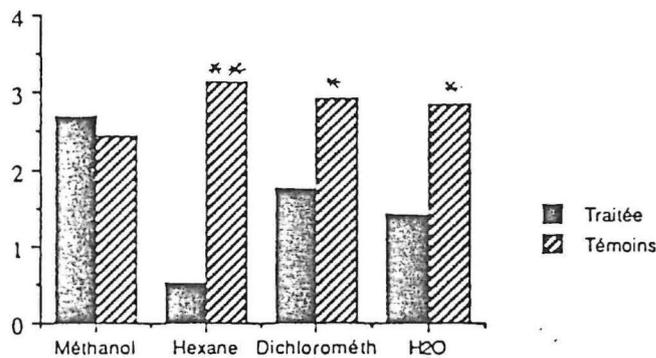


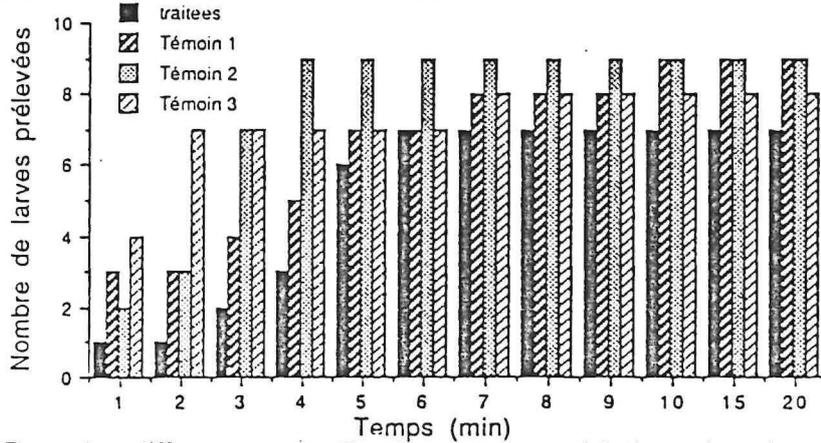
Figure 26: total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes

\*\* difference significative

\* difference significative avec une larve témoin

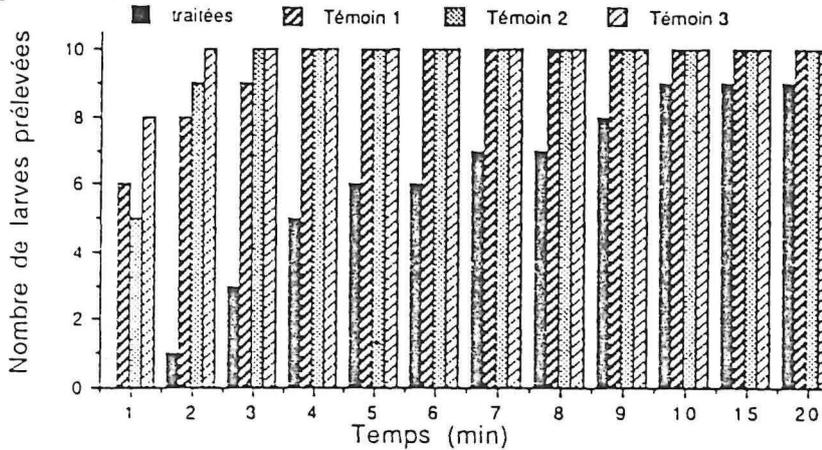
● Nymphes détachées depuis 6 jours

Les extraits à l'hexane et à l'eau distillée sont actifs.



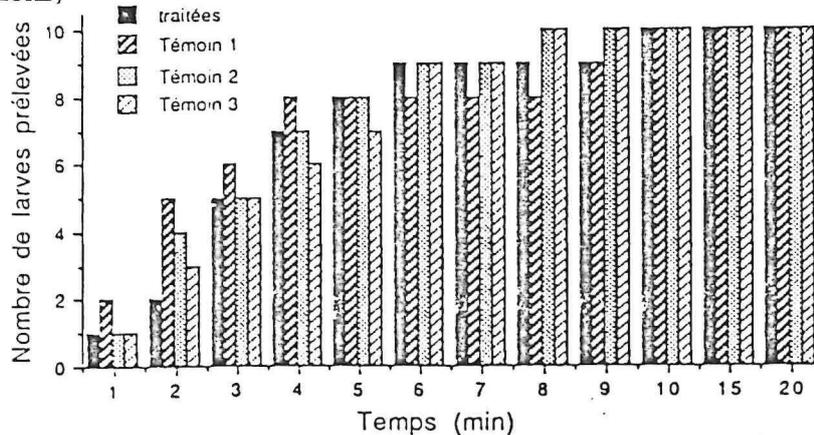
Pas de différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 27:Extrait méthanol: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



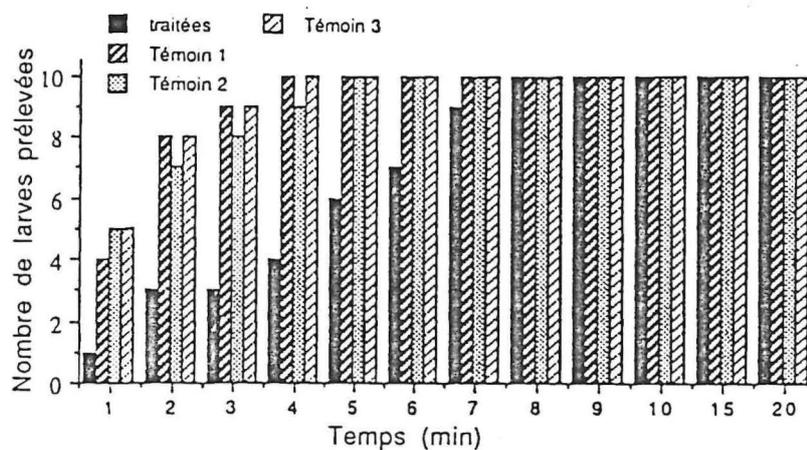
Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 28 :Extrait hexane:Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Pas de différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 29: Extrait dichlorométhane: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Difference significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 30: Extrait H2O: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)

Comparaison entre extraits à t=3min

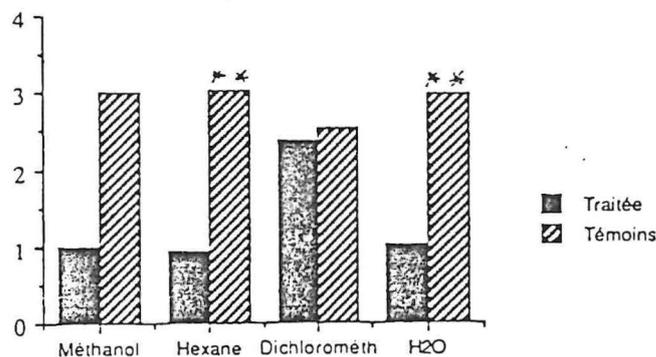


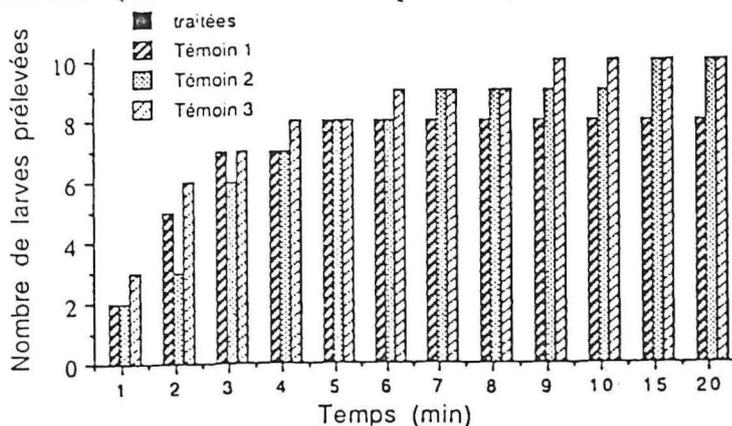
Figure 31: total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes

\*\* difference significative

**d - Résultats obtenus avec les femelles gorgées**

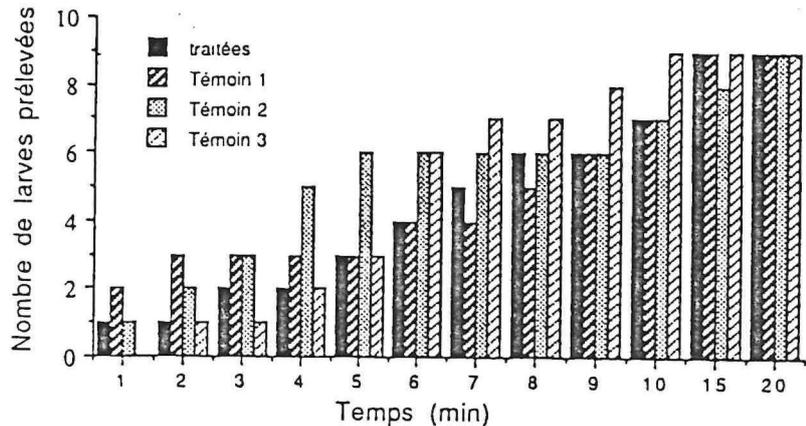
- Femelles détachées depuis moins de 24 heures

L'extrait au méthanol (aucune larve traitée prélevée) et à l'eau distillée sont actifs



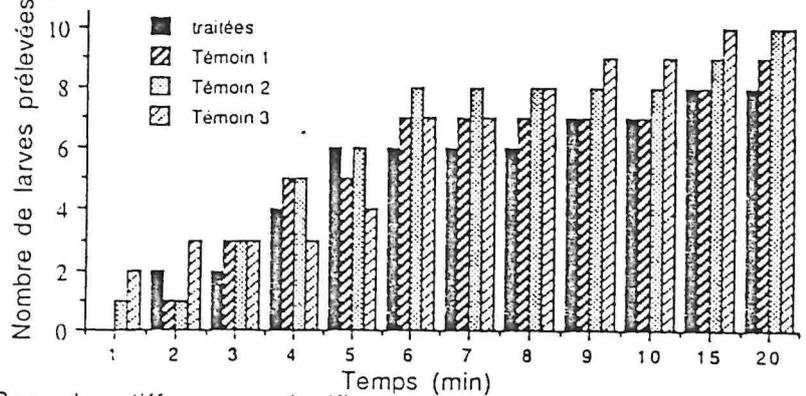
Difference significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 32: Extrait méthanol: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



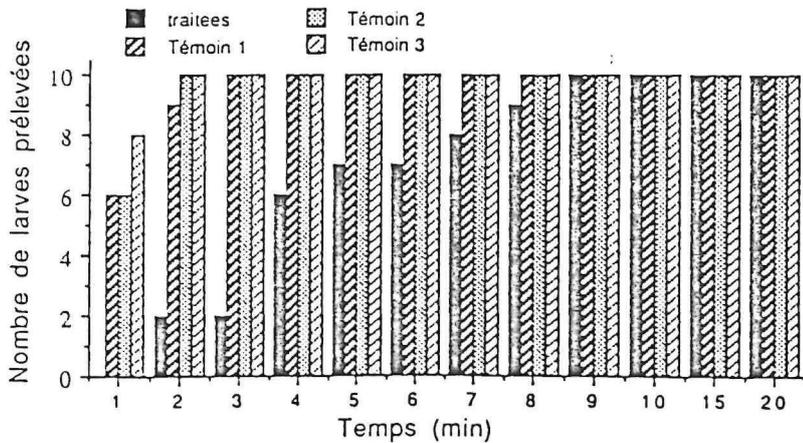
Pas de différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 33 :Extrait hexane:Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Pas de différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 34: Extrait dichlorométhane: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 35: Extrait H2O: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)

Comparaison entre extraits à t=3min

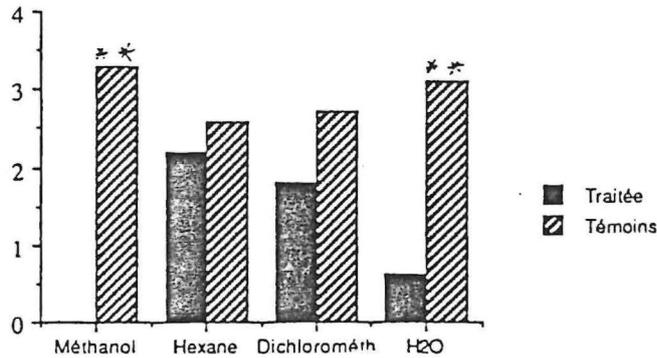
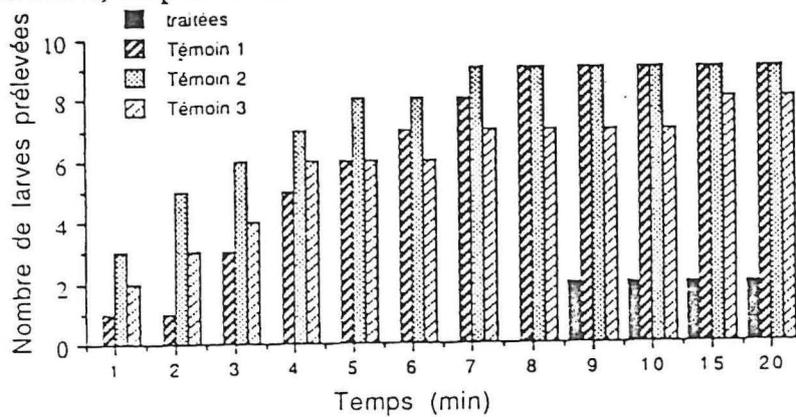


Figure 36: total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes

\*\* difference significative

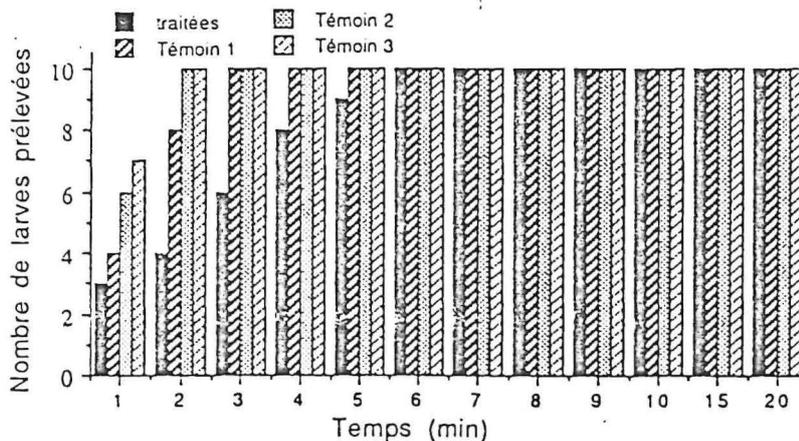
● Femelles détachées depuis 6 jours

Les 4 extraits sont actifs, en particulier l'extrait au méthanol.



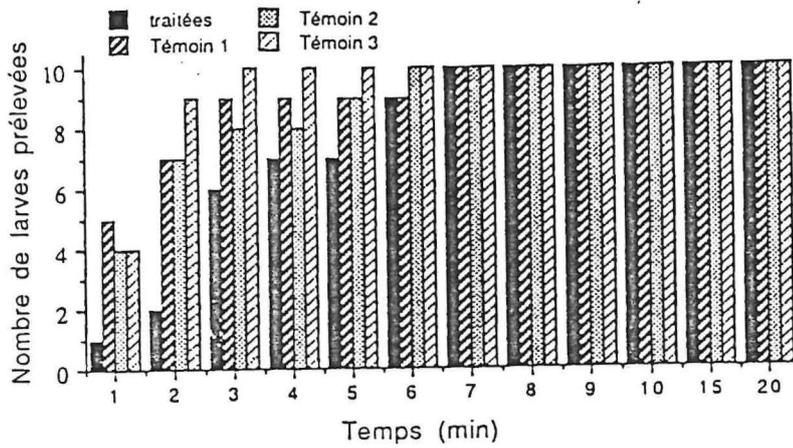
Difference significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 37:Extrait méthanol: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



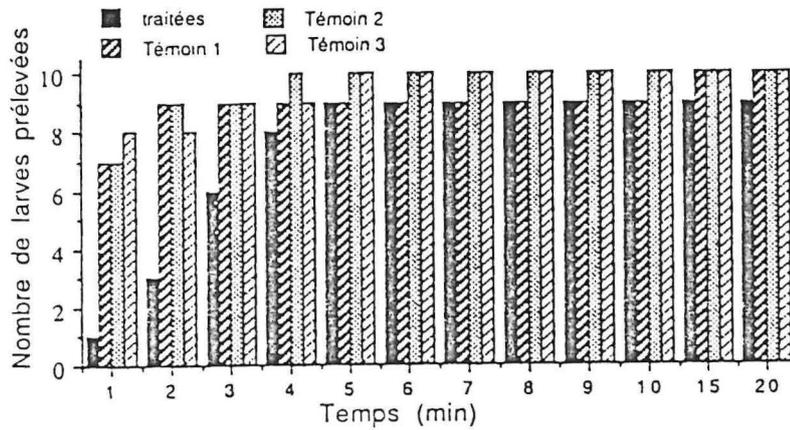
Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins . Différence entre prédation des témoins n°1 et n°2 (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 38 :Extrait hexane:Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 39: Extrait dichlorométhane: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

Figure 40 : Extrait H2O: Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées au cours du test.(10 répétitions)

Comparaison entre extraits à t=3min

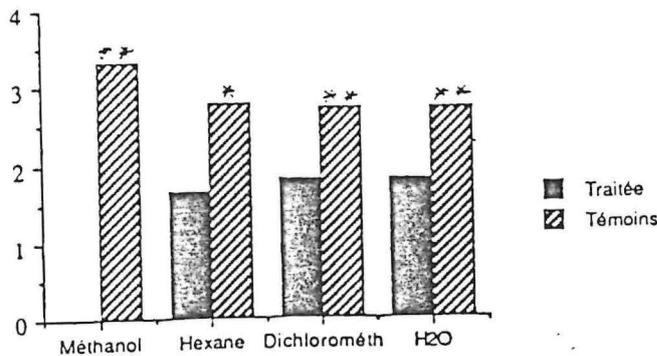


Figure 41: total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes

\*\* difference significative

\* difference significative avec une larve témoin

#### 4 - Discussion

Pour chacune des stase, quel que soit la stade de détachement, il y a toujours au moins un des 4 extraits testés actif.

cependant, d'une stase à l'autre et selon le stade de détachement, l'extrait actif n'est pas le même: tableau 10.

Extrait Stase	Méthanol	Hexane	Dichloromét	Eau distillée
Larves 24 h	++	0	+-	non testé
Larves 6 jours	0	++	non testé	non testé
Nymphes 24 h	0	++	+-	+-
Nymphes 6 jours	0	++	0	++
Femelles 24 h	++	0	0	++
Femelles 6 jours	++	+-	++	++

Ainsi, pour les larves détachées depuis moins de 24 heures, l'extrait au méthanol est actif, l'extrait à l'hexane ne l'est pas. Pour les larves détachées depuis 6 jours, c'est l'inverse qui se produit.

Nous avons donc fractionné un extrait aqueux actif (sécrétions de femelles détachées depuis 6 jours) en plusieurs extraits de polarité décroissante, à l'aide d'une colonne reverse-phase Sep-pak C18 (Annexe 4).

Le principe de cette colonne est en effet de séparer les composés selon leur polarité, par rinçage de la colonne (après injection de l'extrait actif) à l'aide de solvants de polarité décroissante (eau distillée, eau et méthanol 70:30, eau et méthanol 30:70, méthanol pur).

Les différents extraits obtenus ont été testés le même jour, le résultats obtenus sont reportés dans la figure 42 et dans le tableau 11 .

### Comparaison entre extraits à t=3min

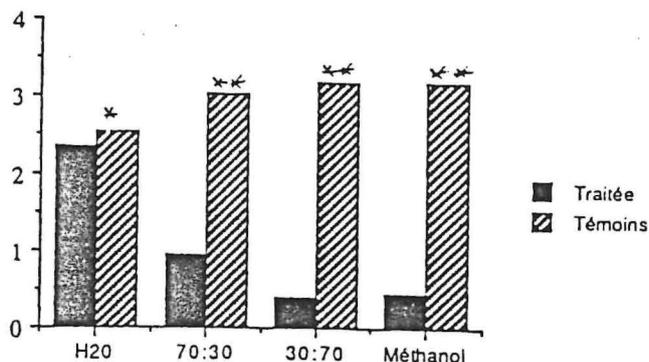


Figure 42: total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes

\*\* différence significative

\* différence significative avec une larve témoin

Nature de l'extrait	Activité	Concentration protéique (mg/ml)
Extrait total	++	0,32
Extrait aqueux (1er passage)	+ -	0,08
Extrait H2O Méthanol (70:30)	+	0,05
Extrait H2O -Méthanol (30:70)	++	0,06
Extrait méthanol	+	0,06

Tableau 11: variation de l'activité après fractionnement d'un extrait aqueux dans le colonne Sep-pak

Il est impossible de dire si un extrait est plus actif qu'un autre car les tests ont été réalisés avec différents nids de fourmis, dont l'activité n'est pas comparable.

Le premier extrait (composés très polaires) présente une activité modérée (différence de prédation avec une seule larve témoin), par contre les 3 autres extraits (composés de polarité décroissante) sont actifs.

On peut émettre l'hypothèse que cette activité répulsive est due à plusieurs composés, de polarité différente et synthétisés dans des proportions variables selon la stase et le stade de détachement.

Nous n'avons pas testé les sécrétions d'individus à jeun, faute de matériel biologique.

D'après l'étude préliminaire de C. Pavis, les sécrétions des mâles à jeun ont également des propriétés répulsives.

Néanmoins, dans les conditions naturelles, ce sont essentiellement les individus gorgés qui sont, comme nous l'avons vu, soumis à la prédation par les fourmis.

Nous n'avons pas eu l'occasion d'observer *in natura* des fourmis attaquer des individus *Amblyomma* gorgés. Par contre, nous avons placé 3 femelles gorgées détachées depuis 6 jours sur des nids de fourmis artificiels qui n'avaient pas reçu de nourriture depuis 3 jours.

Ces 3 femelles ont été "examinées" par les fourmis (antennation), mais il n'y a pas eu de prédation (durée de l'expérience : 1/2 journée).

Ces femelles n'ont pas été manipulées à la pince avant d'être placées sur les nids, afin de ne pas stimuler artificiellement leur sécrétion.

Deux des femelles ont sécrété de façon bien visible quelques minutes après avoir été déposées dans le nid. Nous n'avons pas constaté de sécrétions chez la 3e femelle (observation à l'oeil nu).

Ces sécrétions forment comme nous l'avons déjà dit, un enduit à la surface de la cuticule des nymphes et des femelles gorgées, dans lequel le(s) composé(s) à activité répulsive reste(nt) peut-être actif(s) plus longtemps que dans les extraits réalisés, limitant ainsi la prédation exercée par les fourmis sur ces stases particulièrement vulnérables.

## **C - TEST DU POUVOIR TOXIQUE**

Les essais suivants ont été réalisés pour tenter de mettre en évidence la présence d'une ou plusieurs toxines dans les sécrétions cuticulaires d'*A. variegatum*, hypothèse émise après l'échec des essais d'infestation par des nématodes.

Nous n'avons réalisé que des tests préliminaires, faute de matériel biologique.

### **1 - Matériel**

Nous avons testé le pouvoir toxique éventuel des sécrétions cuticulaires de femelles et de nymphes gorgées sur des chenilles de *Galleria mellonella* de dernier stade (3 cm de long).

Les sécrétions étaient soit utilisées pures, soit sous forme d'extraits stérilisés par passage à travers des filtres millipores 0,45 µm.

### **2 - Méthode**

#### **a - Tests de toxicité par contact**

Les chenilles de *Galleria* sont enduites des sécrétions cuticulaires pures de femelles gorgées détachées depuis 1 et 6 jours.

Les femelles sont stimulées sous la loupe binoculaire et à l'apparition des gouttelettes de sécrétions, la chenille en est humectée sur toute la surface du corps.

Une femelle gorgée est nécessaire pour traiter 2 chenilles de *Galleria* environ.

Pour un test, on dispose individuellement 5 chenilles traitées et 5 chenilles témoins (non enduites de sécrétion) dans les puits d'une boîte à microtitration fermée par un couvercle grillagé.

On réalise 6 répétitions.

On note la mortalité survenue chez les chenilles après 24h, 48h et 72 heures.

#### **b - Toxicité par injection**

Les sécrétions ne sont plus utilisées pures, mais sous forme d'extraits aqueux stériles. On réalise une injection sous-cuticulaire de 15 µl d'extrait par chenille, les chenilles témoins recevant une injection sous-cuticulaire du même volume d'eau pure.

Après traitement, les chenilles traitées et témoins sont disposées séparément dans des boîtes de Pétri dont le fond est recouvert de papier filtre, à raison de 10 chenilles par boîte.

La mortalité est notée comme précédemment.

6 à 10 répétitions devaient être effectuées si les résultats préliminaires s'avéraient positifs.

Pour les essais préliminaires, nous avons utilisé des extraits aqueux de nymphes gorgées détachées depuis 6 jours (sécrétions de 20 nymphes récoltées sur pastilles de papier filtre mises à tremper dans 1 ml d'eau pure) et des extraits de femelles détachées depuis 6 jours (sécrétions de 3 femelles recueillies comme précédemment).

Ces extraits ont été passés à travers des filtres millipores avant d'être injectés aux chenilles.

### 3 - Résultats et discussion

#### a - Toxicité par contact

Les résultats sont regroupés dans les tableaux 12 et 13.

Test n°	Mortalité à 24 h		Mortalité à 48 h		Mortalité à 72 h	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	0	2	3	2	3	2
2	0	3	2	3	2	3
3	0	3	0	3	0	3
4	1	1	1	2	1	4
5	2	1	2	1	2	1
6	1	2	3	3	3	3

Tableau 12 : mortalité des chenilles témoins et traitées (sécrétions pures de femelles détachées depuis moins de 24 heures).

Test n°	Mortalité à 24 h		Mortalité à 48 h		Mortalité à 72 h	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	0	0	1	1	1	1
2	0	0	0	2	0	2
3	0	0	0	1	1	1
4	1	0	1	0	1	1
5	0	0	0	0	0	1
6	0	1	0	1	1	1

Tableau 13 : mortalité des chenilles témoins et traitées (sécrétions pures de femelles détachées depuis 6 jours).

Il n'y a pas de différence significative entre le taux de mortalité des chenilles traitées et des chenilles témoins (test de Mann et Whitney, seuil de 5%).

La méthode utilisée est peut-être inadaptée: quantité de sécrétions déposées insuffisante et/ou choix de l'espèce cible non judicieux (il aurait été plus intéressant de tester le pouvoir toxique éventuel des sécrétions directement sur les nématodes).

#### b - Toxicité par injection

Deux essais seulement ont été réalisés.

Premier essai: nous avons utilisé un extraits aqueux de sécrétions de nymphes détachées depuis 6 jours et un extrait aqueux de sécrétions de femelles détachées depuis 6 jours également.

Ces 2 extraits ont été, après filtration sur millipore, respectivement injectés à 10 chenilles. Les chenilles témoins ont reçu une injection d'eau pure.

Aucune mortalité n'a été observée chez les chenilles traitées et témoins après 24h, 48h et 72 heures.

Deuxieme essai : nous avons utilisé un extrait aqueux de femelles gorgées détachées depuis 6 jours, centrifugé 15 minutes à 10.000g avant utilisation, car les filtres millipores ont une capacité de rétention des protéines non négligeable (ce qui pourrait éventuellement être à l'origine de l'échec de notre premier essai, si les toxines éventuelles sont de nature protéique).

Test n°	Mortalité à 24 h		Mortalité à 48 h		Mortalité à 72 h	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1	0	1	0	2	1	2
2	0	1	0	2	0	2
3	0	0	0	0	0	1

Tableau 14 : mortalité des chenilles témoins et traitées (extrait aqueux de sécrétions cuticulaires de femelles détachées depuis 6 jours, centrifugé).

La mortalité chez les chenilles traitées dans ce deuxieme essai est plus élevée que celle observée chez les chenilles témoins, mais le nombre de répétitions effectuées est insuffisant pour pouvoir faire l'objet d'un traitement statistique et aucune conclusion ne peut donc être émise.

# IV - ANALYSE BIOCHIMIQUE : PREMIERE APPROCHE

## A - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC/MS)

Les sécrétions d'adultes et de nymphes à jeun, ainsi que de nymphes gorgées ont été analysées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse.

Ces analyses ont été réalisées en Janvier 1990, au Laboratoire des Médiateurs Chimiques (INRA, Magny les Hameaux).

### 1 - Principe de la GC/MS

**Chromatographie:** l'échantillon injecté dans l'appareil est chauffé, se volatilise et est entraîné dans une colonne de chromatographie maintenue à température voulue par un four thermostaté. Sous l'action d'un gaz vecteur, les différents composants de l'échantillon envoyé dans la colonne migrent à des vitesses différentes selon leur masse moléculaire, leur encombrement stérique et leur polarité (Delot, 1990).

A la sortie de la colonne, un détecteur à ionisation de flamme mesure par conductivité électrique le nombre d'ions produits par la combustion des composés. Ce signal électrique est alors envoyé après amplification sur un enregistreur graphique.

On obtient un chromatogramme constitué d'un ensemble de pics, dont la surface est proportionnelle à la quantité des produits correspondants.

**Spectrométrie de masse :** les composés à analyser sont bombardés d'électrons et se scindent en ions positifs. Chaque ion est caractérisé par son rapport masse/charge électrique ( $m/e$ ). Ces ions sont focalisés grâce à un champ magnétique et l'on mesure alors l'intensité du courant d'ions correspondant à chaque masse. On détermine ainsi les rapport d'abondance des ions ayant la même valeur  $m/e$ .

**GC/MS :** l'association de ces 2 systèmes permet de séparer les différents produits contenus dans des échantillons complexes. La chromatographie permet de révéler un certain nombre de pics, dont on peut ensuite réaliser le spectre de masse: la comparaison avec des spectres de référence permet d'identifier des composés déjà connus.

### 2 - Matériel

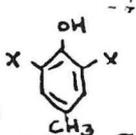
Les sécrétions des adultes à jeun ont été pipetées sous la loupe binoculaire et solubilisées dans de l'éther.

Les nymphes gorgées et non gorgées étaient, après stimulation, directement immergées dans l'éther.

Pour l'analyse, il a été utilisé une colonne capillaire CPSIL 5CB. La température initiale est de 140 °C (pendant 5 minutes) puis augmente de 10 °C/min jusqu'à 240 °C.

### 3 - Résultats et discussion

Les chromatogrammes obtenus sont reportés en Annexe 5.

On observe dans tous les cas un pic majoritaire correspondant à un produit de type , des hydrocarbures saturés (en C13), des acides gras saturés et insaturés (majoritairement en C16) et 2 pics correspondant à des produits assez volatiles pourvus de noyaux benzene.

Au vu de ces analyses, il n'y aurait pas de différence entre les sécrétions des mâles et des femelles à jeun, ni entre celles des nymphes gorgées et non gorgées.

Les 2 techniques d'extraction donnent les mêmes résultats.

Cette technique ne permet cependant de mettre en évidence que des produits peu polaires, solubles dans l'éther et cette analyse reste donc très partielle.

## B - REALISATION D'ELECTROPHORESES

Notre but était de vérifier la présence de protéines dans les sécrétions cuticulaires des tiques, hypothèse émise par P. Diehl.

### 1 - Principe de l'électrophorèse

Le principe de l'électrophorèse est la migration de molécules chargées dans un champ électrique continu. La distance de migration dépend de la densité de la charge électrique: plus la charge est élevée, plus la vitesse de migration (et donc la distance de migration) est grande (Hames, Rickwood, 1981).

La technique d'électrophorèse permet donc, par migration différentielle, la séparation des particules en fonction de leur charge électrique.

Les protéines sont les principales molécules organiques d'intérêt biologique susceptibles de posséder une charge électrique: elles sont chargées à tous les pH, sauf à leur point isoélectrique et migrent donc jusqu'à atteindre ce point particulier.

Différents facteurs interviennent sur la migration électrophorétique de la protéine (Mouthon, 1988):

#### La nature de la protéine

La charge globale de la protéine est due à la différence entre le nombre de fonctions ionisées cationiques et anioniques, et dépend de la nature même de la protéine (composition en acides aminés) et de l'état d'ionisation des différentes fonctions (donc du pH et de la force ionique de la solution tampon).

#### Le pH de la solution tampon

La charge des protéines évolue en fonction du pH, les acides aminés portant plusieurs fonctions ionisables sur leur chaîne.

A pH très acide, elles sont chargées positivement et migrent en électrophorèse vers la cathode.

A pH très basique, elles sont chargées négativement et migrent vers l'anode.

Au pH isoélectrique, la protéine ne migre plus.

#### Le champ électrique

#### Le choix du support

Plusieurs milieux peuvent être utilisés pour effectuer la migration des protéines.

Les plus utilisés sont le papier, l'acétate de cellulose, l'agarose, l'amidon et les gels de polyacrylamide.

Le papier et l'acétate de cellulose sont totalement inertes, tandis que les 3 autres milieux participent activement au processus de séparation par interaction avec les particules migrant. Ces supports peuvent être considérés comme des filtres, dont la taille des mailles est du même ordre de grandeur que la taille des molécules: la migration dépend donc à la fois de la charge électrique et de la taille des protéines.

## **2 - Matériel**

Nous avons utilisé un gel de polyacrylamide en plaques verticales, à système de pH discontinu.

### **a - Le gel de polyacrylamide**

De nature synthétique, ce gel présente les avantages de la transparence, d'une bonne stabilité sur une large gamme de pH, températures et forces ioniques, et permet l'obtention d'un degré élevé de résolution pour de faibles durées de migration.

Il résulte de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes et de chaînes secondaires constituées de bisacrylamide. Cette polymérisation est initiée par un catalyseur (Temed : cf Annexe 6).

La concentration du gel choisie est de 13% .

### **b - Le tampon**

Nous avons utilisé un système de tampon de dissociation (électrophorèse de protéines dénaturées).

Pour la dénaturation des protéines, le produit le plus couramment utilisé est le détergeant ionique SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Cette dénaturation est réalisée en présence de SDS et d'un réactif thiol qui coupe les ponts disulfures.

### **c - Le ph**

Le système de pH discontinu fait appel à différents tampons.

L'échantillon protéique migre d'abord dans un gel polymérisé à larges pores (gel de concentration ou stacking-gel), situé au dessus du gel de résolution dont les pores sont beaucoup plus petits (figure 43).

Ce système permet d'utiliser de faibles concentrations en protéines tout en conservant une bonne résolution, puisque les protéines sont concentrées dans une zone très étroite pendant leur migration dans le gel de concentration.

### **d - Le matériel d'électrophorèse**

Il s'agit d'un appareil de type Studier (figure 44), constitué de 2 réservoirs de tampon.

Un fil de platine servant d'électrode est présent au fond de chacun des 2 réservoirs.

Les 2 plaques de verre ont une épaisseur de 3 mm.

Le matériel utilisé est présenté de manière détaillée en Annexe 7.

### **e - Les échantillons**

on utilise les sécrétions cuticulaires de différentes stases d'Amblyomma, récoltées sur des pastilles de papier filtre mises à tremper dans un tampon de dilution et du leamny (Annexe 6), ou bien récoltées par trempage des tiques stimulées dans de l'eau distillée, diluée ensuite avec le tampon et le leamny.

Pour éviter les contaminations, certains échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes à 10 000g avant dépôt pour migration.

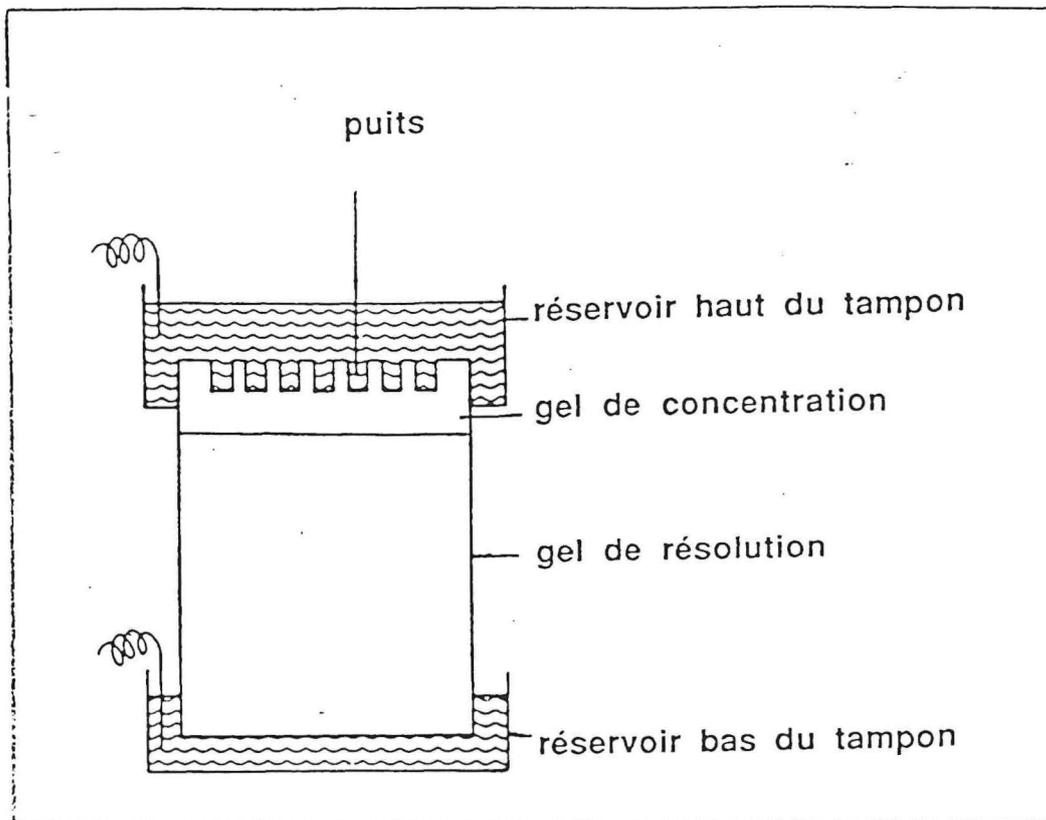


Figure 43 : Systeme de tampons discontinus

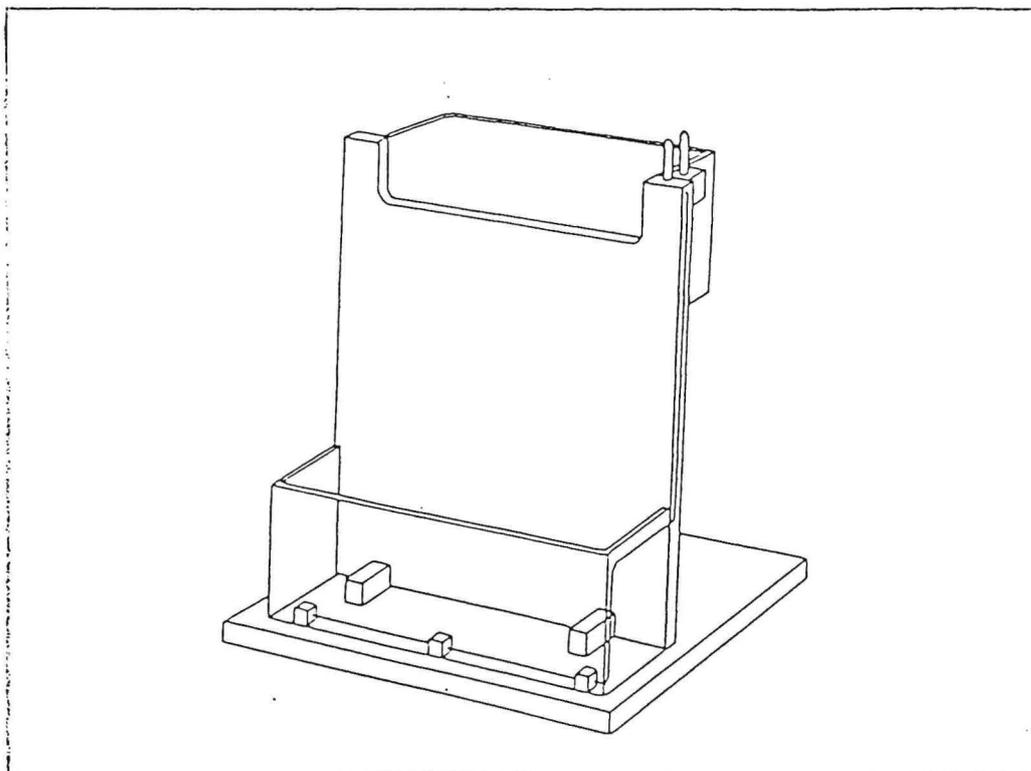


Figure 44 : Appareil de type Studier

### 3 - Méthode

Les 2 plaques sont nettoyées, placées l'une contre l'autre, l'étanchéité étant assurée par 3 joints (placés sur les côtés et le bas des plaques). Elles sont maintenues serrées par des pinces.

Les gels sont préparés à l'aide des différents composés détaillés en annexe 6. Le gel de résolution est coulé en premier, puis après polymérisation, on coule le stacking-gel et l'on y glisse un peigne à 13 encoches, destiné à former 13 puits dans le gel de concentration.

Les plaques sont mises en place avec les réservoirs de tampons, et les différents échantillons sont déposés dans les puits pour migration.

### 4 - Résultats

Nous ne présenterons que les résultats obtenus avec 4 électrophorèses, les autres étant difficilement interprétables.

Chaque bande de migration est traduite par son rapport frontal (Rf), qui correspond au rapport entre la distance de migration de la protéine et le front de migration.

Ce dernier est visualisé par un colorant.

En conditions dénaturantes avec le SDS, on obtient une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et le Rf des protéines.

Comme l'on dépose sur un même gel les échantillons et un marqueur (protéines de poids moléculaires connus), il est possible, puisque les échantillons et le marqueur migrent dans les mêmes conditions, de vérifier la qualité de l'électrophorèse en traçant la courbe du logarithme du poids moléculaire des protéines du marqueur en fonction du Rf de ces mêmes protéines.

Pour chacune des électrophorèses, nous présenterons les échantillons utilisés, la relation  $\log P_m = f(R_f)$  et le profil électrophorétique obtenu.

#### **a - Électrophorèse 1**

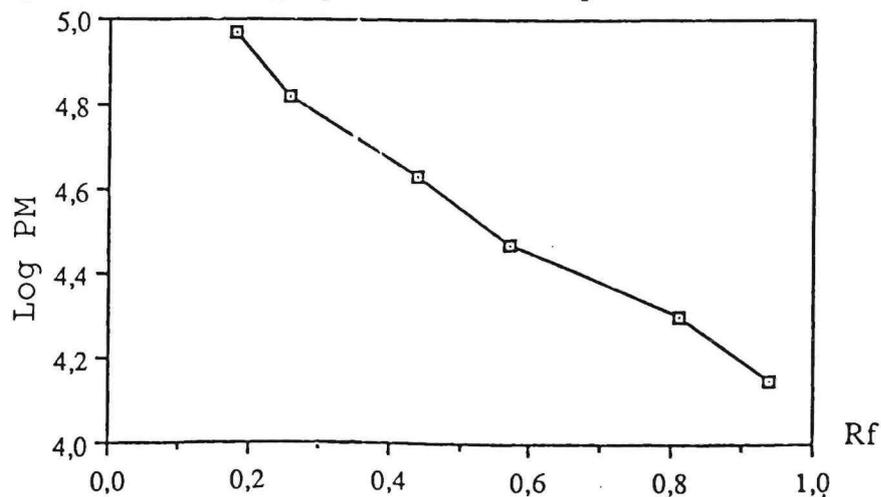
##### **- Échantillon**

Sécrétions de 2 femelles gorgées détachées depuis 6 jours.

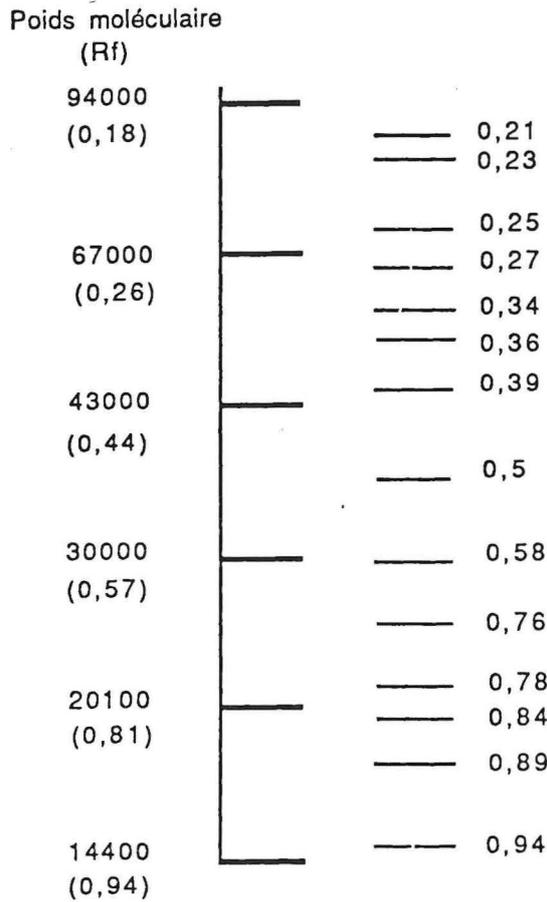
Les sécrétions ont été récoltées sur pastilles de papier filtres et mises à tremper dans 20 ul de tampon de dilution additionnés de 35 ul de leamnly.

##### **- Relation $\log P_m = f(R_f)$**

Cette relation est quasi linéaire, et le gel peut donc être interprété.



- Profil électrophorétique



Marqueur Femelle 6j

Lecture

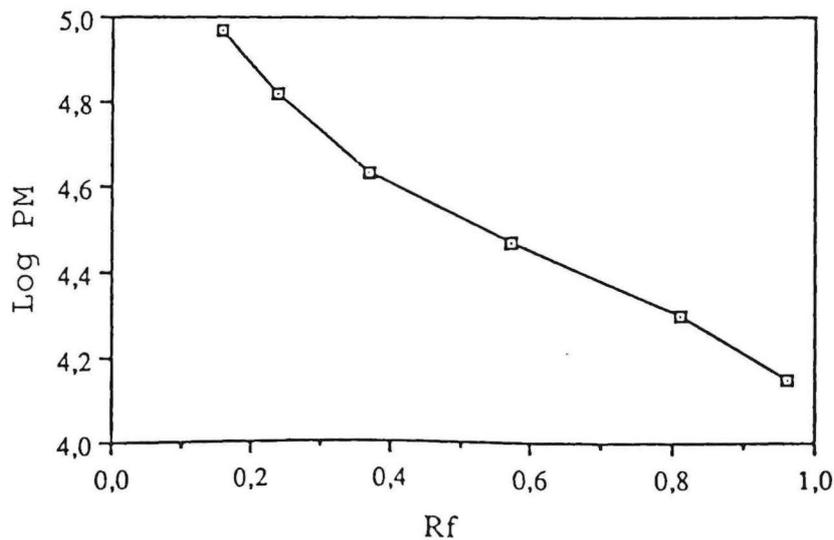
3 bandes entre 94000 et 67000 D  
 4 bandes entre 67000 et 43000 D  
 1 bande entre 43000 et 30000 D  
 3 bandes entre 30000 et 20100 D  
 3 bandes entre 20100 et 14400 D

**b - Electrophorèse 2**

- Echantillon

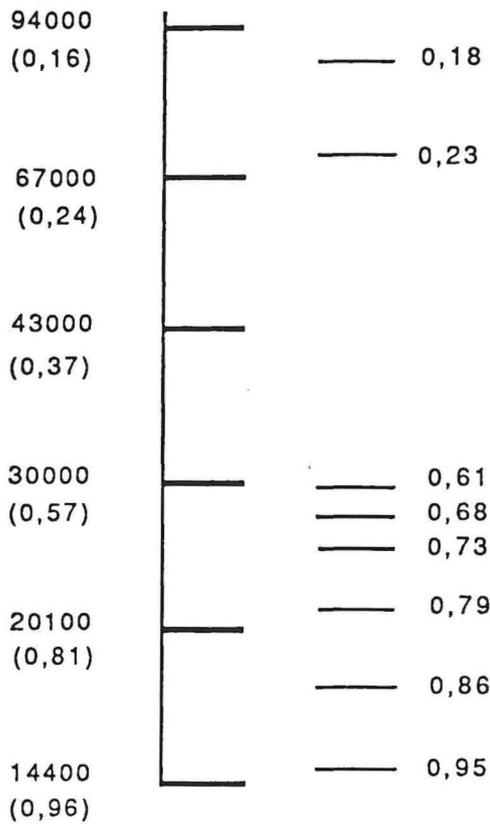
Sécrétions de 20 nymphes gorgées détachées depuis 6 jours et récoltées comme précédemment.

- Relation  $\log P_m = f(R_f)$



- Profil électrophorétique

Poids moléculaire  
(Rf)



Lecture

2 bandes entre 94000 et 67000  
4 bandes entre 30000 et 20100  
2 bandes entre 20100 et 14400

Marqueur Nymphé 6j

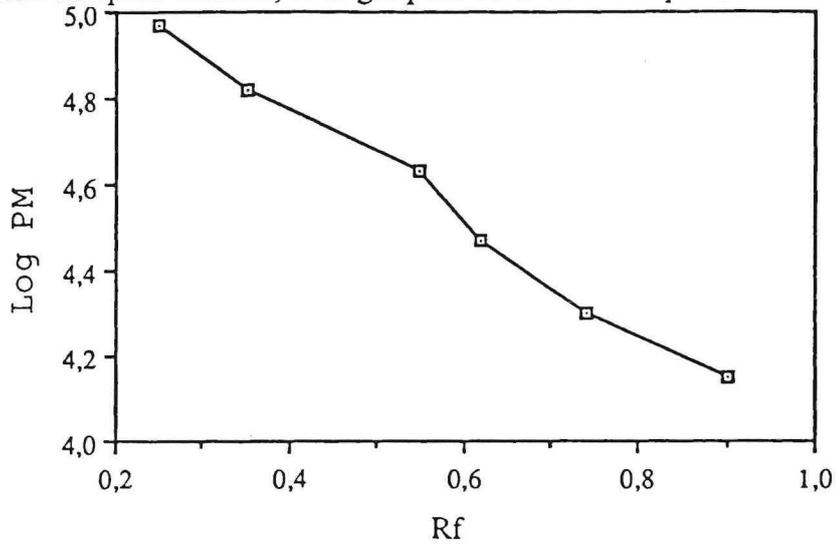
c - Electrophorèse 3

- Echantillons

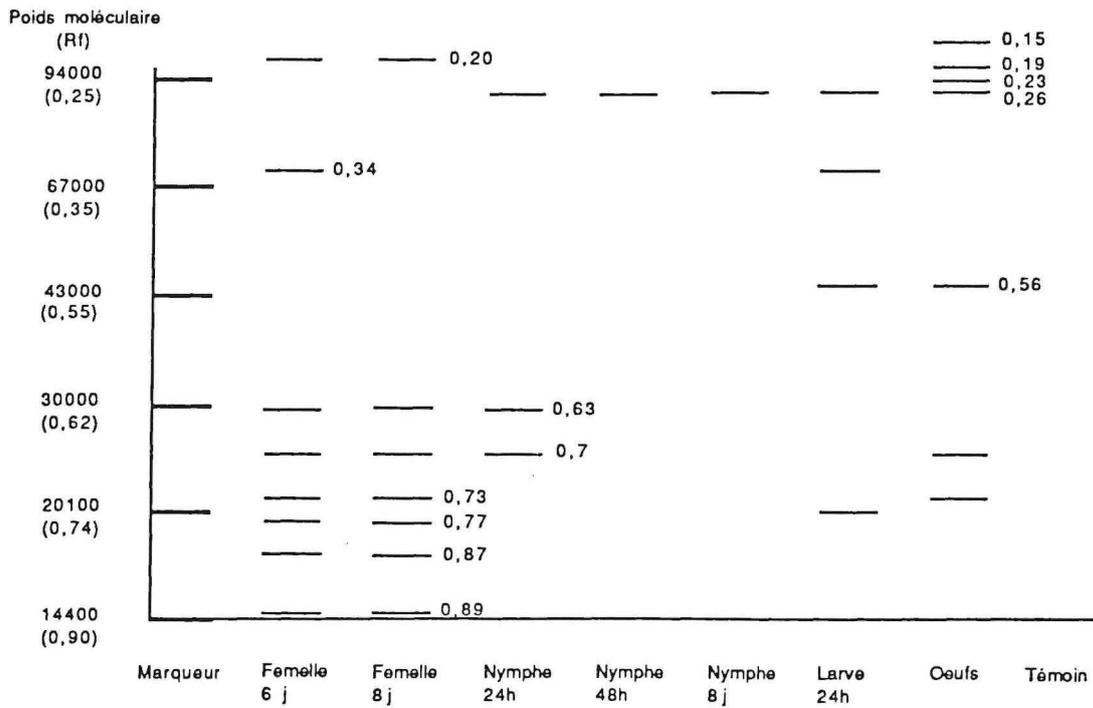
Puit	Nature de l'extrait	Conc° en protéines de l'extrait (mg/ml)	Teneur en prot de l'échantillon (ug)
1	Marqueur		
2	Femelles 6 jours	0,39	27,3
3	Femelles 8 jours	0,38	26,6
4	Nymphes 24 h	0,13	9,1
5	Nymphes 48 h	0,06	4,2
6	Nymphes 8 jours	0,2	14
7	Larves 0 jours	0,11	7,7
8	oeufs	0,11	7,7
9	Marqueur		
10	Puit vide		
11	Témoin pastille	0	0
12	Témoin pastille	0	0

- Relation  $\log P_m = f(R_f)$

Cette relation est quasi linéaire, et le gel peut donc être interprété.



- Profil électrophorétique





#### **4 - Discussion**

Nous avons réalisé peu de gels, selon une méthode dont la reproductibilité n'a pas été évaluée.

Les interprétations suivantes sont donc soumises à caution.

Nous allons essayer de comparer les résultats obtenus:

- au sein de chaque stase, à des temps de détachement différent
- entre les différentes stases.

Les valeurs des Rf des protéines du marqueur étant différentes d'un gel à un autre, il est impossible de comparer les 4 gels directement entre eux.

Par contre, pour les gels 1 et 2 d'une part et les gels 3 et 4 d'autre part, ces valeurs sont proches et il est possible de les comparer 2 à 2.

##### **Electrophorèse 1**

Ce premier gel a permis de confirmer la présence de protéines dans les sécrétions cuticulaires.

On observe 14 bandes pour les femelles détachées depuis 6 jours.

##### **Electrophorèse 2**

8 bandes sont observées pour les nymphes détachées depuis 6 jours.

Comparaison des 2 gels

Il existe des similitudes entre les profils électrophorétiques des femelles et des nymphes détachées depuis 6 jours.

7 bandes semblent communes aux 2 stases.

Le protocole a été par la suite modifié, pour s'assurer que les bandes observées ne sont pas liées à la présence de bactéries contaminantes. L'utilisation de filtres millipores s'est avérée inadaptée du fait de leur capacité de rétention des protéines. Les extraits sont donc centrifugés 15 minutes à 10.000g, le surnageant seul est récupéré.

##### **Electrophorèse 3**

Pour les femelles:

Les 2 stades de détachement ( 6 et 8 jours) ne diffèrent que par une bande (absence de la bande Rf=0,34 chez les femelles 8 jours).

Pour les nymphes:

- nymphes détachées depuis 24 h : les 2 bandes observées sont présentes chez les femelles.
- nymphes 48 h et 8 jours : 1 seule bande identique pour les 2 stades de détachement, non observée chez les femelles.

Le nombre réduit de bandes observées chez les nymphes sur ce gel est probablement lié aux faibles concentrations protéiques des échantillons utilisés (en moyenne, 3 fois moins concentrés que les échantillons des femelles).

## Electrophorèse 4

Pour les femelles :

3 à 6 bandes observées dont 3 similaires pour chacun des 3 stades de détachement.

Pour les nymphes :

4 bandes observées dont 3 similaires pour chacun des 3 stades de détachement.

Toutes les bandes présentes chez les nymphes se retrouvent chez les femelles (tous stades de détachement confondus).

A l'exception d'une bande (femelle 3 jours,  $R_f = 0,7$ ), on retrouve les mêmes bandes quelque soit la stase et le stade de détachement.

Les différences portent seulement sur leur nombre (de 3 à 6) et leur combinaison.

## Comparaison des gels 3 et 4

Pour les nymphes détachées depuis 24 heures, si l'on considère les bandes obtenues sur les 2 gels, on comptabilise au total 6 bandes.

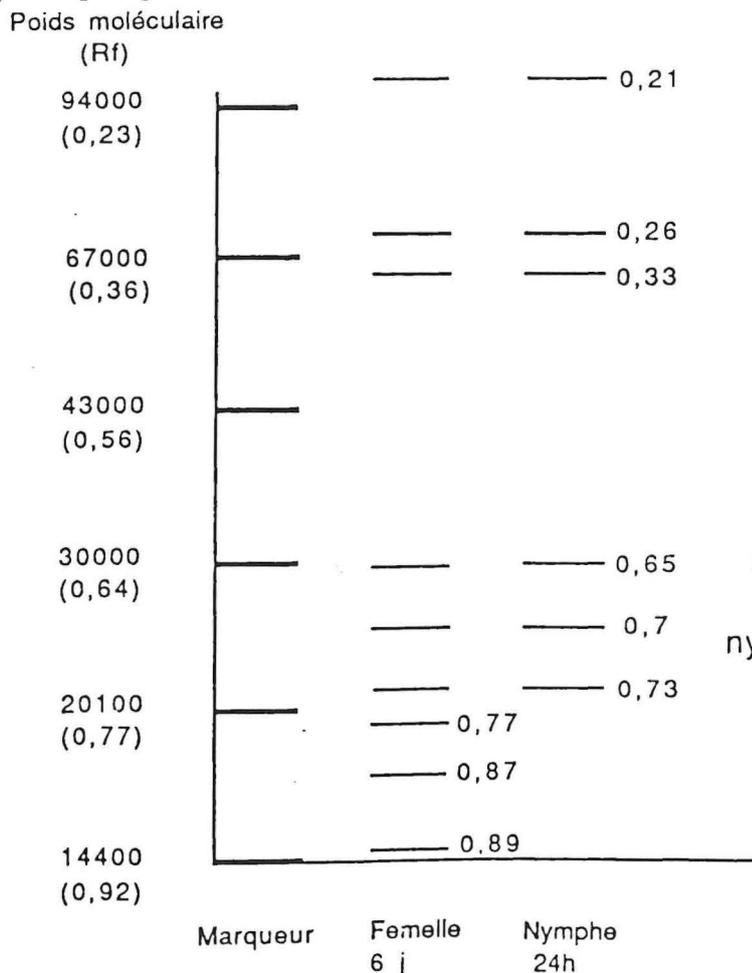
Les différences entre les stades de détachement portent sur la combinaison de ces 6 bandes.

Pour les femelles, à l'exception d'une bande ( $R_f = 0,26$ ), toutes les bandes présentes sur le gel 4 se retrouvent sur le gel 3.

On obtient ainsi un profil complet de 9 bandes pour les femelles détachées depuis 6 jours.

Les 6 bandes observées chez les nymphes à 24 h se retrouvent dans ce profil.

Le nombre moins élevé de bandes visualisées chez les nymphes est peut-être lié aux concentrations protéiques plus faibles.



Profil électrophorétique des femelles détachées depuis 6 jours et des nymphes détachées depuis moins de 24 heures (Synthèse des gels 3 et 4).

## **Conclusion**

Ces électrophorèses ont permis de mettre en évidence la présence de protéines dans les sécrétions cuticulaires.

Il faudrait néanmoins adapter cette technique pour mieux séparer les protéines et obtenir des gels plus lisibles.

Il faudrait notamment standardiser la récolte et la préparation des échantillons et faire en sorte que la concentration en protéines de chacun des échantillons soit identique.

A première vue, il n'y a pas de grandes différences entre femelles et nymphes gorgées, mais il est difficile de dire si les différences observées sont liées à la nature même des sécrétions ou à des problèmes de concentrations.

Enfin, il est impossible de dire s'il existe ou non une cinétique d'apparition des protéines en fonction de la stase et du stade de détachement.

# CONCLUSION

Les sécrétions cuticulaires des stases gorgées d'*A. variegatum* présente un certain nombre de propriétés biologiques :

- Ces sécrétions, après extraction dans différents solvants de polarité variable, exercent un effet répulsif sur les fourmis *Solenopsis geminata*, espèce prédatrice des stases gorgées en Guadeloupe.

Ces fourmis sont considérées comme très actives sur *Amblyomma americanum* au Sud des Etats-Unis et sur *Boophilus* au Mexique. D'après les premières estimations, cette prédation reste cependant modérée sur *A. variegatum* en Guadeloupe, même si les fourmis restent la principale espèce prédatrice de cette tique.

L'activité répulsive exercée par les sécrétions cuticulaires d'*A. variegatum* est peut-être responsable de cette faible incidence de la prédation sur les stases gorgées, pourtant vulnérables au sol.

Une telle activité répulsive est connue chez d'autres espèces d'arthropodes :

Ainsi, les larves de premier stade de *Diaprepes abbreviatus* (Coléoptère), vulnérables au sol, émettent une sécrétion à propriétés répulsives pour les fourmis *Solenopsis geminata*, entraînant ainsi une réduction de la prédation de près de 40% (Pavis, 1992).

De même, les Hétéroptères possèdent des glandes tégumentaires produisant des sécrétions qui ont différents rôles (Pavis, 1987) : une action répulsive en particulier vis à vis des fourmis, un rôle défensif (irritant de contact contre un large spectre de prédateurs Invertébrés et Vertébrés), un rôle de protection contre certains microorganismes (ces substances se comportent comme des antiseptiques: on retrouve une telle propriété pour les sécrétions d'*A. variegatum*).

Ces sécrétions d'Hétéroptères sont de nature très diverses et présentent en nombre et en proportions plus ou moins importants des composés appartenant à de nombreuses familles (aldéhydes, esters, acides, alcools, cétones, terpènes, composés aromatiques, et protéines: le rôle de ces dernières est d'ailleurs inconnu).

La nature chimique des sécrétions d'*A. variegatum* n'est pas encore connue, mais elles semblent assez complexes et contiennent également des protéines.

- Les sécrétions cuticulaires pures présentent également des propriétés antibactériennes vis à vis de 2 bactéries entomopathogènes, *Bacillus thuringiensis* et *Serratia marcescens*, l'une Gram +, l'autre Gram -. Cette activité est retrouvée dans les extraits aqueux.

Ces propriétés peuvent expliquer l'échec des essais d'infestation par contact par ces 2 bactéries.

Pour ce qui est des résultats négatifs obtenus lors des essais d'inoculation par ces 2 mêmes bactéries, il est possible que les tiques aient développé une réaction immunitaire compétente suite au challenge bactérien. On sait que chez les Lépidoptères, les Diptères, les Hyménoptères et les Coléoptères, des peptides à propriétés antibactériennes sont synthétisés dans l'hémolymphe à la suite d'inoculation expérimentale de bactéries tuées par la chaleur (Bulet, 1991, Kimbrell, 1991).

On peut émettre l'hypothèse qu'il en est de même chez *A. variegatum*: les électrophorèses ont permis de mettre en évidence la présence de protéines dans les sécrétions cuticulaires: ces dernières sont peut-être responsables de l'activité antibactérienne des sécrétions, et on peut imaginer que des protéines du même type sont également synthétisées dans l'hémolymphe.

- Enfin, ces sécrétions cuticulaires ne présentent pas de pouvoir toxique par contact sur les chenilles de *Galleria mellonella*.

Pour ce qui est du pouvoir toxique par inoculation, un nombre plus élevé de tests doit être réalisé avant d'émettre toute conclusion.

Cette étude des sécrétions cuticulaires d'*A. variegatum* a permis de donner un premier aperçu sur les mécanismes de défense de cette tique, contre laquelle seule la lutte chimique est actuellement efficace.

Il nous semble cependant qu'il serait plus intéressant de réaliser des essais d'infestation par d'autres souches bactériennes entomopathogènes et d'autres souches de nématodes à des fins pratiques de lutte biologique, avant d'approfondir les recherches sur le rôle des sécrétions cuticulaires d'*A. variegatum*, qui n'offrent pas de perspectives d'applications pratiques à court terme contre cette tique.

# Origine des figures

Figures 1 et 2 : Delot, 1990

Figure 3: Stachurski 1988 , actualisée

Cartes 1 et 2: Uilenberg, 1990

Figures 4 et 5: Hackman, 1982

Figures 6 et 7: Stauffer, 1986

Figure 8: Barré, 1988

Figure 9: Mauléon, 1992

Figures 43 et 44 : Hames, 1981

# BIBLIOGRAPHIE

- Balashov Y.S., 1972. Bloodsucking Ticks- Vectors of diseases of man and animals( traduction O.G. Strekalovsky in Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 5: 159-376)
- Barré N., 1988. Mesures agronomiques permettant une diminution des populations de la tique *A. variegatum*. Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop., 1988, 41(4) : 387-393.
- Barré N, Mauléon H., 1991. Predators of *A. variegatum* in Guadeloupe. Experimental and Applied Acarology, 12, 1991: 163-170.
- Boemare N, 1982. Mise en évidence d'une toxicogénèse provoquée par le nématode axénique *Neoplectana carpocapsae* chez l'insecte axénique *Galleria mellonella*. C. R. Acad SC. Paris, T295, série III : 543-547.
- Bulet P., 1991. Insect immunity: isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(36): 24520-24525.
- Camicas J.L., Morel P.C., 1978. Cours sur les Tiques (Acariens: Ixodida). O.R.S.T.O.M. Paris, photocopié, 209pp.
- Camus E, 1987. Contribution à l'étude épidémiologique de la cowdriose en Guadeloupe. Thèse Doc.es-Sciences. Orsay, 201pp.
- Hackman R.H., 1982. Structure and function in tick cuticle. Ann. Rev. Entomol, 1982, 27: 75-95.
- Hames B.D., Rickwood D., 1981. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press. Oxford. Washington DC. 290pp.
- Kimbrell D.A., 1991. Insect antibacterial proteins: not just for Insects and against bacteria. BioEssays, 13(12): 657-663.
- Mauléon H., 1992. Essai d'infestation d'*A. variegatum*, *Boophilus annulatus* et *Boophilus microplus* par des nématodes entomopathogènes. Communication personnelle.
- Morel P.C., 1992 . Cours sur les Tiques. CES de pathologie tropicale, I.E.M.V.T.
- Mouthon G., 1988. Cours de Biochimie, E.N.V.A
- Pavis C., 1987. Les sécrétions exocrines des Héteroptères, une mise au point bibliographique. Agronomie, 1987, 7(8): 547-561.
- Pavis C., 1992. Defensive secretion of first instar larvae of the rootstalk borer weevil, *Diaprepes abbreviatus* to the fire-ant *solenopsis geminata*. Non encore publié.
- Pilet C., 1975. Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne. Doin, Paris, 490pp.
- Stachurski F., 1988. Impact économique actuel et intérêt de l'éradication de la tique *A. variegatum* pour l'élevage bovin Guadeloupéen. Thèse Doc. Vét. Alfort, 126 pp.
- Stauffer A., 1986. Glandes dermiques chez les tiques. Diplôme de l'Institut de Zoologie, Neuchatel.
- Uilenberg G., 1990. Extension de la tique *Amblyomma variegatum* dans les Antilles. Comment expliquer cette grave menace et que faire? Revue Elev. Méd. Pays trop., 1990, 43(3): 297-299.

# ANNEXE 1

## Composition de la gélose Mueller Hinton

La gélose de Mueller Hinton Pasteur est un milieu standardisé selon les normes O.M.S.

- La formule est celle du milieu liquide de Mueller Hinton auquel est ajoutée une certaine proportion de gélose. Toutes les présentations en milieu déshydraté, prêt-à-l'emploi ou précoulé ont les mêmes caractéristiques.

### Milieu liquide de Mueller Hinton

Infusion de 300 g de viande de bœuf déshydratée  
hydrolysate acide de caséine ..... 17,5 g  
amidon de maïs ..... 1,5 g  
eau distillée q.s.p. .... 1000 ml  
pH 7,4 après autoclavage.

- Le pH est de 7,4:
  - un pH trop acide augmente l'activité des  $\beta$ -lactamines, tétracyclines, novobiocine et fucidine.
  - un pH trop basique augmente l'activité des aminosides, des macrolides, lincosamides et streptogramines.
- La concentration:
  - en ions  $Mg^{2+}$  est comprise entre 20 et 35 mg/l,
  - en ions  $Ca^{2+}$  est comprise entre 50 et 100 mg/l.Ces cations influent sur la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminosides.

En présence de ces concentrations de cations divalents, dont on sait qu'ils sont chélatés par les tétracyclines, les zones d'inhibition obtenues avec des disques de tétracyclines seront plus petites que celles obtenues avec des milieux contenant une faible concentration de  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ .

- La concentration en thymidine est inférieure à 50 ng/ml. Toute concentration supérieure à cette valeur risque de donner de fausses résistances avec la triméthoprime et l'association triméthoprime-sulfamides.
- L'épaisseur de la gélose dans les boîtes précoulées est constante, elle est de 4 mm.

L'interprétation des zones d'inhibition, fondée sur l'utilisation de la gélose Mueller Hinton, peut ne pas être applicable à des milieux différents.

## **ANNEXE 2**

**Antibiogrammes : résultats bruts**

ANTIBIOGRAMMES REALISES AVEC LES SECRETIONS CUTICULAIRES DE FEMELLES GORGEES
---

Abréviations

K : Kanamycine

T : Pastille témoin vierge

1, 2, 3 : Pastilles imprégnées de sécrétions cuticulaires

P1 : Poids de la pastille avant imprégnation par les sécrétions

P2 : Poids de la pastille après imprégnation par les sécrétions

D : Diamètre

H : Halo

Di : Difforme

1 - Sécrétions de femelles détachées depuis moins de 6 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,6	1,7	1,8					1,6	1,6	1,9
P2					4,4	3	3,9					2,2	2,8	2,8
Q		0	0	0	2,8	1,3	2,1		0	0	0	0,6	1,2	0,9
D	25	0	0	0	9	9	7	18	0	0	0	0	Di	Di

2 - Sécrétions de femelles détachées depuis 6 à 12 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2	1,8	1,6					2,3	3,5	2,7
P2					2,4	2,4	2,8					2,9	4,5	2,9
Q		0	0	0	0,4	0,6	1,2		0	0	0	0,6	1	0,2
D	25	0	0	0	H11	10	H10	18	0	0	0	7	7	8

### 3 - Sécrétions de femelles détachées depuis 12 à 18 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2	2,1	2,6					2,1	2,3	2,0
P2					3,5	4,5	4,8					4,9	3,1	2,8
Q		0	0	0	1,5	2,4	2,2		0	0	0	2,8	0,8	0,8
D	22	0	0	0	11	12	10	18	0	0	0	7	7	8

### 4- Sécrétions de femelles détachées depuis 18 à 24 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,9	1,7	2,4
P2					5	4,6	5,7
Q		0	0	0	3,1	2,9	3,3
D	23	0	0	0	6	6	9

### 5- Sécrétions de femelles détachées depuis 24 à 30 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,4	2,2	2,0					1,8	1,9	1,8
P2					2,5	2,6	2,4					2,1	2,8	2,7
Q		0	0	0	0,1	0,4	0,4		0	0	0	0,3	0,9	0,9
D	23	0	0	0	7	7	7	17	0	0	0	6	8	8

6- Sécrétions de femelles détachées depuis 30 à 36 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,6	2,0	1,7					1,9	2,0	1,6
P2					1,7	2,1	1,8					2,4	2,6	2,1
Q		0	0	0	0,1	0,1	0,1		0	0	0	0,5	0,6	0,5
D	28	0	0	0	8	H12	9	24	0	0	0	7	8	6

7- Sécrétions de femelles détachées depuis 36 à 42 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,8	1,8	1,9					1,5	2,4	1,6
P2					2,5	3,2	2,7					2,9	3,4	2,7
Q		0	0	0	0,7	1,4	0,8		0	0	0	1,4	1,0	1,1
D	22	0	0	0	H12	H14	H12	18	0	0	0	7	7	7

8- Sécrétions de femelles détachées depuis 42 à 48 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,6	1,2	1,3
P2					2,0	2,8	4,9
Q		0	0	0	0,4	1,6	3,6
D	23	0	0	0	Di	H11	9

9 - Sécrétions de femelles détachées depuis 4 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,2	2,1	2,2					2,0	1,7	1,9
P2					3,5	3,0	4,4					3,2	3,4	3
Q		0	0	0	1,3	0,9	2,2		0	0	0	1,2	1,7	1,1
D	28	0	0	0	H11	7	7	25	0	0	0	7	9	9

10 - Sécrétions de femelles détachées depuis 6 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,8	1,7	1,9					1,6	1,9	1,9
P2					2,4	2,5	3,3					2,9	2,6	4,1
Q		0	0	0	0,6	0,8	1,4		0	0	0	1,3	0,7	2,2
D	30	0	0	0	9	9	10	25	0	0	0	8	H9	H11

11 - Sécrétions de femelles détachées depuis 8 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,7	1,8	2,0					2,2	1,9	1,7
P2					1,9	2,2	2,4					2,7	2,1	2,1
Q		0	0	0	0,2	0,4	0,4		0	0	0	0,5	0,2	0,4
D	35	0	0	0	8	9	11	35	0	0	0	9	10	11

12 - Sécrétions de femelles détachées depuis 10 jours

	SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,7	2,0	1,9
P2					2,7	3,4	3,7
Q		0	0	0	1,0	1,4	1,8
D	32	0	0	0	6	8	9

13 - Sécrétions de femelles détachées depuis 12 jours

	SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,9	2,4	1,6
P2					2,3	3,0	2,4
Q		0	0	0	0,4	0,6	0,8
D	17	0	0	0	6	8	9

ANTIBIOGRAMMES REALISES AVEC LES SECRETIONS CUTICULAIRES DE  
NYMPHES GORGEES

Abréviations

K : Kanamycine

T : Pastille témoin vierge

1, 2, 3 : Pastilles imprégnées de sécrétions cuticulaires

P1 : Poids de la pastille avant imprégnation par les sécrétions

P2 : Poids de la pastille après imprégnation par les sécrétions

D : Diamètre

H : Halo

Di : Difforme

1- Sécrétions de nymphes détachées depuis moins de 6 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,3	2,0	2,2					2,1	1,8	1,7
P2					2,4	2,4	2,3					2,2	1,9	1,8
Q		0	0	0	0,1	0,4	0,1		0	0	0	0,1	0,1	0,1
D	26	0	0	0	H7	Di	H7	19	0	0	0	0	0	0

2 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 6 à 12 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,9	2,1	2,4					2,1	1,8	2,0
P2					2,0	2,2	2,6					2,3	2,0	2,2
Q		0	0	0	0,1	0,1	0,2		0	0	0	0,2	0,2	0,2
D	25	0	0	0	0	0	7D	17	0	0	0	0	0	0

### 3 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 12 à 18 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,1	2,0	1,7					2,1	2,0	2,1
P2					2,5	2,3	2,0					2,2	2,3	2,3
Q		0	0	0	0,4	0,3	0,3		0	0	0	0,1	0,3	0,2
D	27	0	0	0	7	7	7	18	0	0	0	0	0	0

### 4 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 18 à 24 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,0	2,0	1,9					2,0	1,9	2,0
P2					2,2	2,4	2,1					2,2	2,1	2,2
Q		0	0	0	0,2	0,4	0,2		0	0	0	0,2	0,2	0,2
D	25	0	0	0	7	8	8	21	0	0	0	0	8	10

### 5 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 24 à 36 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,9	2,1	2,2					1,8	1,7	2,2
P2					2,0	2,3	2,6					2,0	2,0	2,3
Q		0	0	0	0,1	0,2	0,4		0	0	0	0,2	0,3	0,1
D	33	0	0	0	7	7	8	25	0	0	0	0	7	7

6 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 36 à 48 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,9	1,8	1,9					2,0	2,0	2,4
P2					2,2	2,2	2,4					2,2	2,2	2,8
Q		0	0	0	0,3	0,4	0,5		0	0	0	0,2	0,2	0,4
D	23	0	0	0	10	11	13	33	0	0	0	0	0	0

7 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 2 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,8	1,8	2,0					2,0	2,0	2,2
P2					2,2	2,3	2,3					2,1	2,1	2,3
Q		0	0	0	0,4	0,5	0,3		0	0	0	0,1	0,1	0,1
D	21	0	0	0	8	8	7	17	0	0	0	0	0	0

8 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 4 jours

	SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,1	2,0	2,3
P2					2,3	2,5	2,8
Q		0	0	0	0,2	0,5	0,5
D	17	0	0	0	0	0	0

9 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 6 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					1,9	1,7	2,2					2,0	1,9	2,1
P2					2,2	2,1	2,5					2,3	2,3	2,2
Q		0	0	0	0,3	0,4	0,3		0	0	0	0,3	0,4	0,1
D	22	0	0	0	9	8	9	19	0	0	0	H7	H7	0

10 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 8 jours

	SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,0	1,8	2,2
P2					2,1	2,0	2,3
Q		0	0	0	0,1	0,2	0,1
D	18	0	0	0	H9	H8	H7

11 - Sécrétions de nymphes détachées depuis 10 jours

	SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
P1					2,0	2,0	1,9
P2					2,4	2,3	2,2
Q		0	0	0	0,4	0,3	0,3
D	17	0	0	0	7	H13	H10

ANTIBIOGRAMMES REALISES AVEC DES EXTRAITS AQUEUX
--

1 - Femelles détachées depuis 3 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	27	0	0	0	H9	0	0	26	0	0	0	7	H13	D15

2 - Femelles détachées depuis 6 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	30	0	0	0	7	7	H8	27	0	0	0	8	7	7

3 - Nymphes détachées depuis 24 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	35	0	0	0	12	10	8	28	0	0	0	7	0	0

4 - Nymphes détachées depuis 48 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	30	0	0	0	0	7	8	28	0	0	0	7	7	0

5 - Nymphes détachées depuis 4 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	28	0	0	0	0	H7	0	26	0	0	0	7	H14	H13

6 - Nymphes détachées depuis 8 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	30	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	7	7	8

6 - Nymphes détachées depuis 10 jours

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	30	0	0	0	0	H8	H8	26	0	0	0	H9	H11	H12

8 - Extrait oeufs

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	32	0	0	0	10	8	8	29	0	0	0	7	7	8

9 - Larves détachées depuis moins de 24 heures

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	33	0	0	0	9	8	8	27	0	0	0	7	7	8

10 - Exuvies nymphales

	BACILLUS THURINGIENSIS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	32	0	0	0	8	8	H10

EXTRAIT AQUEUX DE FEMELLES DETACHEES DEPUIS 6 JOURS FRACTIONNE  
PAR PASSAGE DANS LA COLONNE Sep-pak C18

1 - Extrait aqueux après premier passage

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	26	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0

2 - Extrait H2O - Méthanol (70:30)

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D		0	0	0					0	0	0			

3 - Extrait H2O - Méthanol (30:70)

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	25	0	0	0	8	8	10	26	0	0	0	0	0	8

4 - Extrait Méthanol

	BACILLUS THURINGIENSIS							SERRATIA MARCESSENS						
	K	T1	T2	T3	1	2	3	K	T1	T2	T3	1	2	3
D	26	0	0	0	8	11	13	26	0	0	0	9	10	12

## **ANNEXE 3**

**Activité répulsive : Tests statistiques (résultats bruts)**

ACTIVITE REPUSIVE  
 TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS  
 (Tests de Friedman et de Wilcoxon)

LARVES GORGEES DETACHEES DEPUIS MOINS DE 24 HEURES

Extrait methanol

Test de Friedman

	Rang moyen
Traitee	3,8
T <sub>1</sub>	2
T <sub>2</sub>	2,4
T <sub>3</sub>	1,9

$\chi^2 = 14,05$       $p = 0,0029$

ccl : non issus de la même population

Test de Wilcoxon

Traitee - T <sub>1</sub>	p = 0,0077
" " - T <sub>2</sub>	0,0218
" " - T <sub>3</sub>	0,0051
T <sub>1</sub> - T <sub>2</sub>	0,5076
T <sub>1</sub> - T <sub>3</sub>	0,575
T <sub>2</sub> - T <sub>3</sub>	0,2845

} pas de  
≠  
entre  
temoi

Difference Larves traitee et temoi

Extrait hexane

	2,4
	2,8
	2,85
	2,45

$\chi^2 = 1,05$       $p = 0,789$

ccl : issus de la même population

Traitee - T <sub>1</sub>	p = 0,87
" " - T <sub>2</sub>	0,28
" " - T <sub>3</sub>	0,50
T <sub>1</sub> - T <sub>2</sub>	0,13
T <sub>1</sub> - T <sub>3</sub>	0,33
T <sub>2</sub> - T <sub>3</sub>	0,144

Pas de difference Larves traitee - T

Extrait dichloromethane

	3,05
	1,7
	3,1
	2,15

$\chi^2 = 8,55$       $p = 0,0332$

ccl : non issus de la même population

Traitee - T <sub>1</sub>	p = 0,00699
" " - T <sub>2</sub>	0,6784
" " - T <sub>3</sub>	0,0926
T <sub>1</sub> - T <sub>2</sub>	0,0593
T <sub>1</sub> - T <sub>3</sub>	0,9594
T <sub>2</sub> - T <sub>3</sub>	0,038

Difference Traitee - T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> - T<sub>3</sub>.

LARVES GORGÉES DETACHÉES DEPUIS 6 JOURS.

Extrait méthano

Test de Friedman

Traité	Rang moyen
T <sub>1</sub>	2,8
T <sub>2</sub>	2,7
T <sub>3</sub>	1,8
T <sub>3</sub>	2,7

$\chi^2 = 3,96$   $p = 0,2688$

ccl : issus de la même population

Test de Wilcoxon

Traité - T <sub>1</sub>	p = 0,9594
" " - T <sub>2</sub>	0,0745
" " - T <sub>3</sub>	0,9594
T <sub>1</sub> - T <sub>2</sub>	0,1141
T <sub>1</sub> - T <sub>3</sub>	0,1721
T <sub>2</sub> - T <sub>3</sub>	0,0926

Pas de ≠ Témoins traité

Extrait hexane

	Rang m
	3,9
	2,3
	2
	1,8

$\chi^2 = 16,44$   $p = 0,005$

ccl : non issus de la même population

Traité - T <sub>1</sub>	p = 0,0069
" " - T <sub>2</sub>	0,0051
" " - T <sub>3</sub>	0,0051
T <sub>1</sub> - T <sub>2</sub>	0,4446
T <sub>1</sub> - T <sub>3</sub>	0,3325
T <sub>2</sub> - T <sub>3</sub>	0,7213

Différence Traité-Témoins.

NYMPHES GORGEES DETACHEES DEPUIS MOINS DE 24 HEURES

Extrait methanol

\* Test de Friedman

	Traitee	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Rang $\bar{m}$	2,9	2,6	2,3	2,2

$\chi^2 = 1,8$

$p = 0,6149$

issus de la m<sup>e</sup> pop<sup>o</sup>

\* Test de Wilcoxon

$Tt-T_1 / Tt-T_2 / Tt-T_3 / T_1-T_2 / T_1-T_3 / T_2-T_3$   
 0,2411 / 0,383 / 0,1394 / 0,7985 / 0,9594 / 0,

Pas de difference Ttrae-Tmoins

Extrait hexane

Rg  $\bar{m}$       3,5      1,8      2,7      2

$\chi^2 = 10,63$

$p = 0,0136$

issus de la m<sup>e</sup> pop<sup>o</sup>

0,0218 / 0,0367 / 0,0125 / 0,0745 / 0,7213 / 0,28

Pas de difference Ttrae-Tmoins

Extrait dichloromethane

Rang  $\bar{m}$       3,5      2,2      2,1      2,2

$\chi^2 = 3,04$

$p = 0,0452$

issus pop<sup>o</sup> ≠

0,0593 / 0,0594 / 0,0469 / 0,9183 / 0,7985 / 0,5

↓  
 Difference traitee-T<sub>3</sub>

Extrait H<sub>2</sub>O

Rang  $\bar{m}$       3,2      2,4      1,7      2,7

$\chi^2 = 7,08$

$p = 0,0694$

issus de                  pop<sup>o</sup> ≠

0,0745 / 0,0218 / 0,0745 / 0,0241 / 0,7213 / 0,11

↓  
 Difference Traitee-T<sub>2</sub>

NYMPHES GORGEES DETACHEES DEPUIS 6 JOURS

Extrait methanol

Rang  $\bar{m}$       2,75      2,45      2,45      2,35

$\chi^2 = 0,91$

$p = 0,3075$

issus de la me<sup>e</sup> pop<sup>o</sup>

0,5147 / 0,0745 / 0,3325 / 0,4446 / 0,9594 / 0,6

Pas de difference

Extrait hexane

Rang  $\bar{m}$       3,8      1,8      2,5      1,9

$\chi^2 = 15,24$

$p = 0,0016$

issus de pop<sup>o</sup> differente

0,0051 / 0,0069 / 0,0069 / 0,6465 / 0,6325 / 0,06

↓  
 ≠ a T<sub>2</sub>

### Extrait dichlorométhane

Rang  $\bar{m}$  2,7 2,2 2,4 2,7  
 $\chi^2 = 1,08$   $p = 0,7819$  sans d'1 même population

0,2845 / 0,5751 / 0,6103 / 0,9188 / 0,5751 / 0,8  
Pas de différence Traitée - Témoin.

### Extrait H<sub>2</sub>O

Rang  $\bar{m}$  3,7 1,9 2,6 1,8  
 $\chi^2 = 13,8$   $p = 0,0032$  pop  $\neq$

0,0093 / 0,0166 / 0,0166 / 0,4411 / 0,6465 / 0,241  
pas de  $\neq$  traitée - Témoin.

## FEMELLES GORGÉES DETACHÉES DEPUIS MOINS DE 24 HEURES

### Extrait méthanol

Rang  $\bar{m}$  3,9 2,4 2,3 2,4  
 $\chi^2 = 19,7$   $p = 0,0002$   
pop  $\neq$

0,0117 / 0,0051 / 0,0052 / 0,7213 / 0,0593 / 0,114  
 $\neq$  traitée - Témoin

### Extrait hexane

Rang  $\bar{m}$  : 2,5 2,25 2,6 2,65  
 $\chi^2 = 0,57$   $p = 0,902$   $\bar{m}$  pop  $^{\circ}$

0,7989 / 0,6465 / 0,8785 / 0,4413 / 0,721  
pas de  $\neq$  traitée - Témoin

### Extrait dichlorométhane

Rang moy = 2,9 2,6 2,4 2,1  
 $\chi^2 = 2,04$   $p = 0,5641$

0,7213 / 0,2026 / 0,3863 / 0,5751 / 0,4148 / 0,

### Extrait H<sub>2</sub>O

Rang  $\bar{m}$  : 3,9 2,1 2,4 1,6  
 $\chi^2 = 16,64$   $p = 0,005$

0,0069 / 0,0051 / 0,0051 / 0,6464 / 0,0743 / 0,2

FEMELLES GORGEES DETACHEES DEPUIS 6 JOURS

Extrait methanol

Rang  $\bar{m}$  : 3,8 2,3 7,8 2,1  
 $\chi^2 = 15,191$   $p = 0,0017$   $pop \neq$

0,0077 / 0,0077 / 0,0117 / 0,2135 / 0,8785 / 0,33  
 pas de difference traitée-tem

Extrait hexane

Rang  $\bar{m}$  : 3,5 2,4 2,2 1,9  
 $\chi^2 = 8,76$   $p = 0,0327$   $pop \neq$

0,0218 / 0,0093 / 0,0125 / 0,6098 / 0,0467 / 0,33

Extrait dichloromethane

Rang  $\bar{m}$  : 3,6 2 2,4 2  
 $\chi^2 = 10,37$   $p = 0,016$   $pop \neq$

0,0367 / 0,0069 / 0,0093 / 0,4755 / 0,8785 / 0,33  
 difference traitée-temoins.

Extrait H<sub>2</sub>O

Rang  $\bar{m}$  : 4 1,7 2,3 2  
 $\chi^2 = 19,08$   $p = 0,0003$   $pop \neq$

0,0051 / 0,0051 / 0,0051 / 0,4446 / 0,8785 / 0,6835  
 Difference traitée-temoins

EXTRAITS AQUEUX APRES PASSAGE PAR LA COLONNE C18

Extrait H<sub>2</sub>O - 1<sup>er</sup> passage

Rang  $\bar{m}$  : 3, 2,2 2 2,8  
 $\chi^2 = 4,08$   $p = 0,253$   $\bar{m}$   $pop \neq$

0,1394 / 0,0367 / 0,3785 / 0,7989 / 0,0926 / 0,162  
 ↓  
 ≠ ce traitée - T<sub>2</sub>

Extrait H<sub>2</sub>O - methanol 70:30

Rang  $\bar{m}$  : 3,5 2,2 1,8 2,5  
 $\chi^2 = 9,48$   $p = 0,0235$   $pop \neq$

0,0125 / 0,0218 / 0,0166 / 0,9594 / 0,2845 / 0,  
 Difference traitée temoins.

Extrait H<sub>2</sub>O - methanol 30:70

Rang  $\bar{m}$  : 3,9 1,7 2 2,4  
 $\chi^2 = 77,16$   $p = 0,0007$   $pop \neq$

0,0051 / 0,0069 / 0,0051 / 0,9594 / 0,1263 / 0,  
 pas de ≠ ce

Extrait methanol

Rang  $\bar{m}$  : 3,7 2,4 1,9 2  
 $\chi^2 = 12,36$   $p = 0,0062$   $pop \neq$

0,0125 / 0,093 / 0,0166 / 0,219 / 0,6465 / 0,507  
 ≠ traitée-temoins.

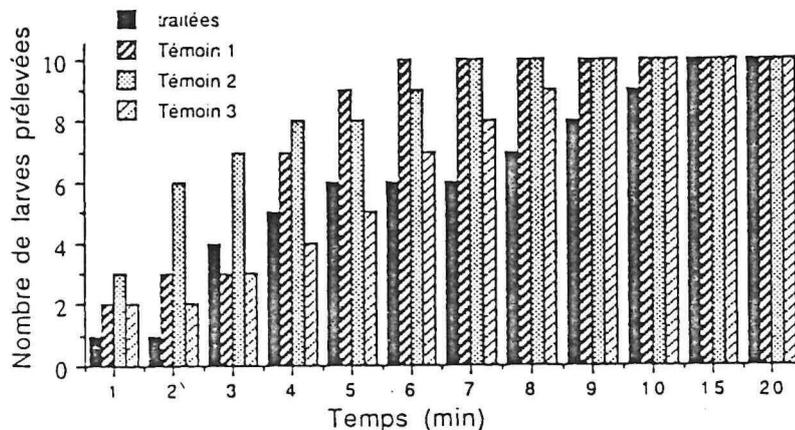
## **ANNEXE 4**

# EXTRAITS FRACTIONNES PAR PASSAGE DANS LA COLONNE Sep-pak C18

## 1 - Evolution de la prédation par les fourmis au cours du temps

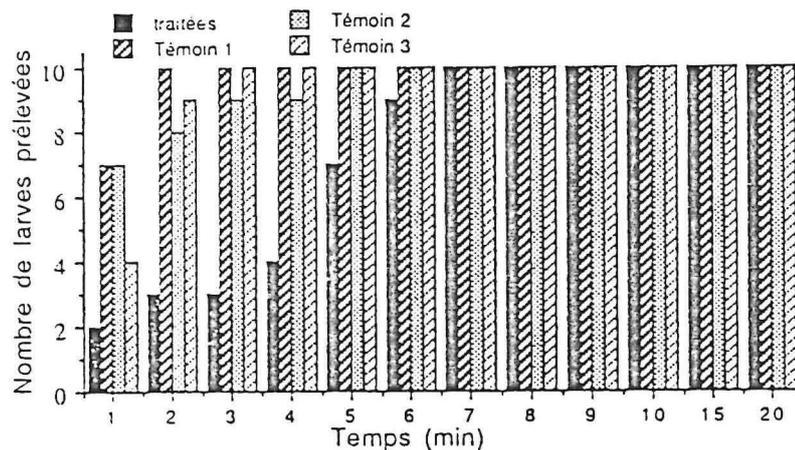
( Total cumulé du nombre de larves traitées et témoins prélevées pendant la durée du test )  
 (10 répétitions)

### a - Extrait aqueux après premier passage



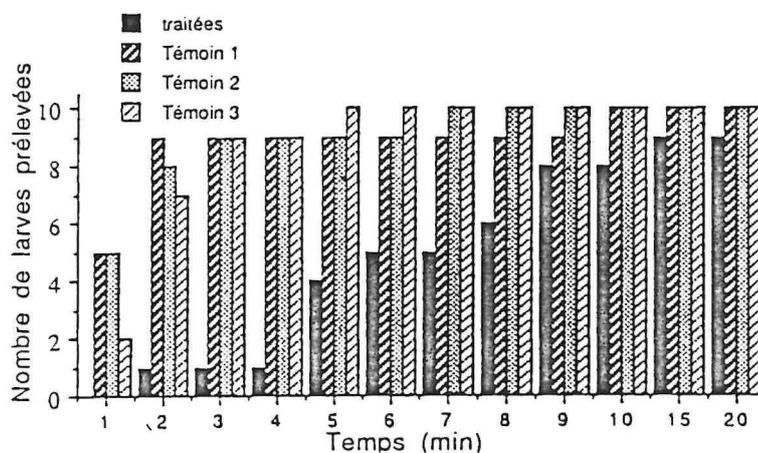
Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins n°2 (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

### b - Extrait H2O - Méthanol (70:30)



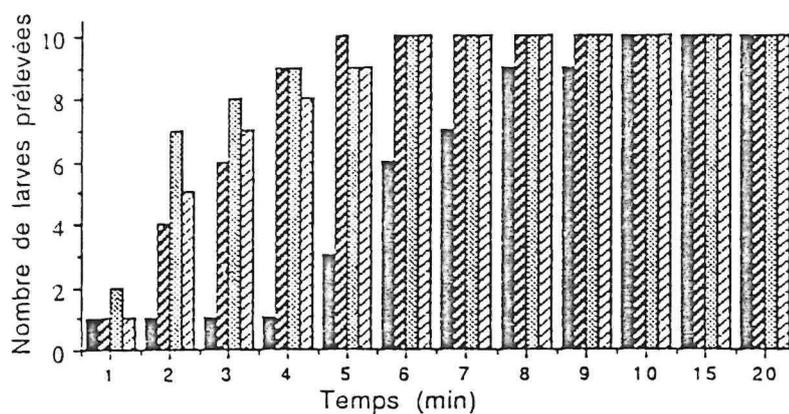
Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

c - Extrait H2O - Méthanol (30:70)



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

d - Extrait Méthanol



Différence significative entre prédation des larves traitées et témoins (Test de Wilcoxon, seuil de 5%)

2 - Comparaison entre extraits

( Total cumulé du nombre moyen de larves traitées et témoins prélevées après 3 minutes)

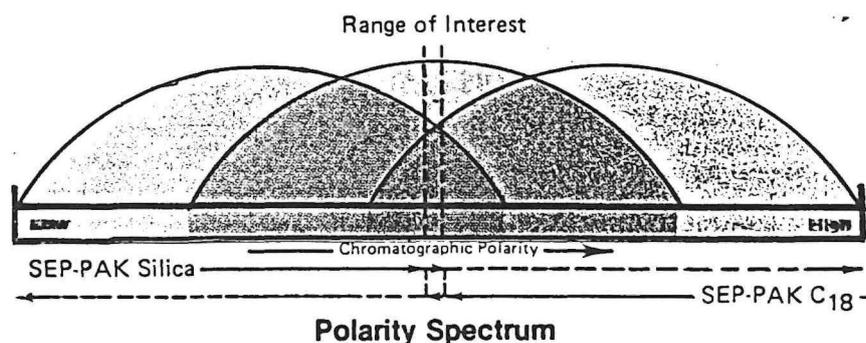
# Sample Preparation Made Easy With SEP-PAK Cartridges

The purpose of sample preparation is to simplify the analysis of one or more compounds by removing interferences from a complex sample matrix. This cannot be accomplished by extraction alone. A typical sample extract contains compounds of varying chromatographic polarity. Compound(s) of interest could fall anywhere in the polarity spectrum.

SEP-PAK cartridges enable the isolation of a narrower range of compounds than possible by extraction alone. What used to take hours to accomplish by liquid/liquid partitions and/or column chromatography, now takes only minutes with SEP-PAK cartridges.

Waters offers two SEP-PAK cartridges, each packed with different chromatographic separating materials. SEP-PAK Silica cartridges and SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridges can accommodate a wide variety of different sample preparation problems. The general sample preparation strategy presented to the right can be readily tailored to suit the number and nature of components of interest and the characteristics of different sample matrices.

## SEP-PAK Cartridge Sample Preparation Strategy



Assume that your compound(s) is in the range of interest shown on the polarity spectrum above. Here's how to prepare your compound(s) for analysis using SEP-PAK Silica or C<sub>18</sub> cartridges.

### SEP-PAK Silica Cartridge Sample Preparation Strategy

After placing the sample on the cartridge:

**Step 1** Eliminate low polarity compounds by washing the SEP-PAK cartridge with a *non-polar* solvent. The *non-polar* solvent should be chosen so that the compound(s) of interest is retained on the cartridge.



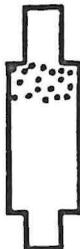
Compounds in the red (low) polarity region on the polarity spectrum have now been removed.

**Step 2** Remove the compound(s) of interest by washing the SEP-PAK cartridge with a *more polar* solvent.



The cartridge eluent collected can now be brought to a known volume for final analysis.

**Step 3** The polar compounds contained in the blue region on the polarity spectrum still remain on the cartridge. Additional compounds from this polarity range can be eluted with a still *more polar* solvent, or discarded along with the spent cartridge.



### SEP-PAK C<sub>18</sub> Cartridge Sample Preparation Strategy

After placing the sample on the cartridge:

**Step 1** Eliminate high polarity compounds by washing the SEP-PAK cartridge with a *polar* solvent. The *polar* solvent should be chosen so that the compound(s) of interest is retained on the cartridge.



Compounds in the blue (high) polarity region on the polarity spectrum have now been removed.

**Step 2** Remove the compound(s) of interest by washing the SEP-PAK cartridge with a *less polar* solvent.



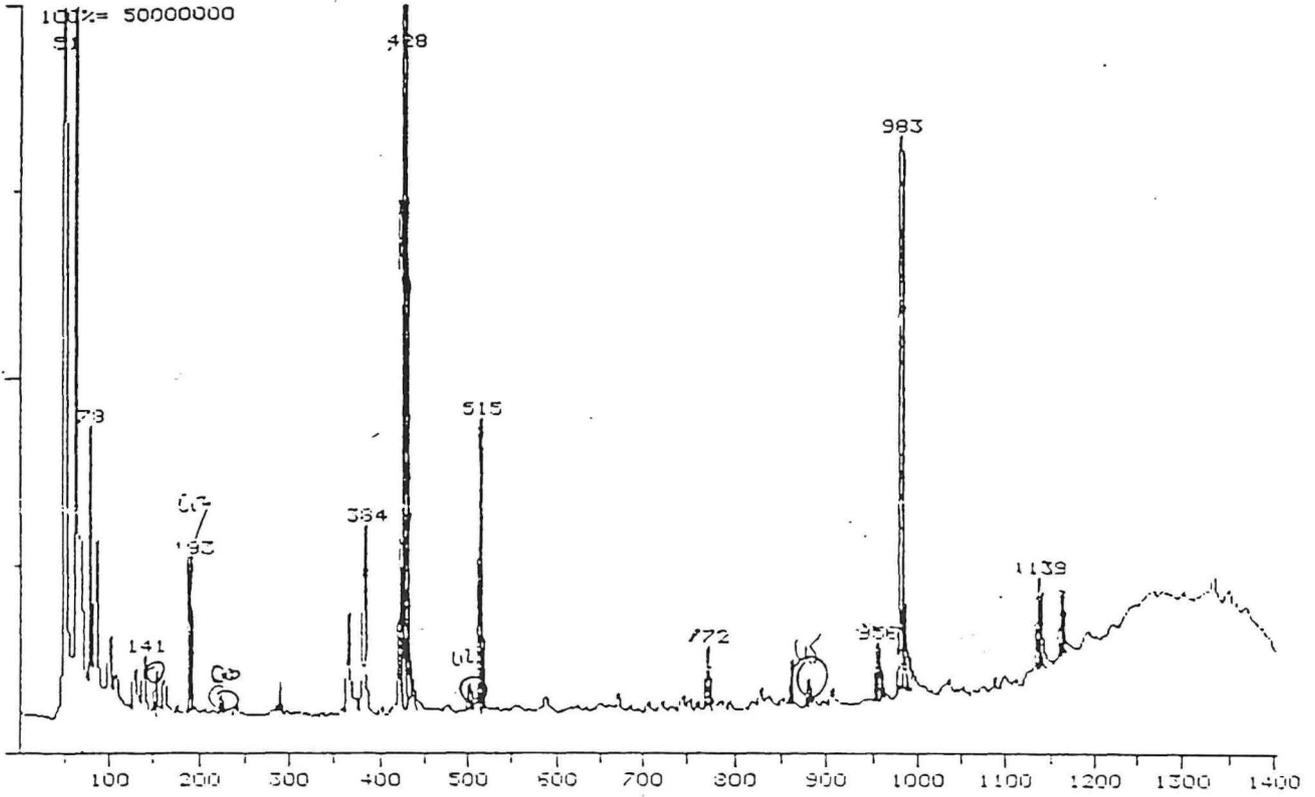
The cartridge eluent collected can now be brought to a known volume for final analysis.

**Step 3** The non-polar compounds contained in the red region on the polarity spectrum still remain on the cartridge. Additional compounds from this polarity range can be eluted with a *non-polar* solvent, or discarded along with the spent cartridge.



# ANNEXE 5

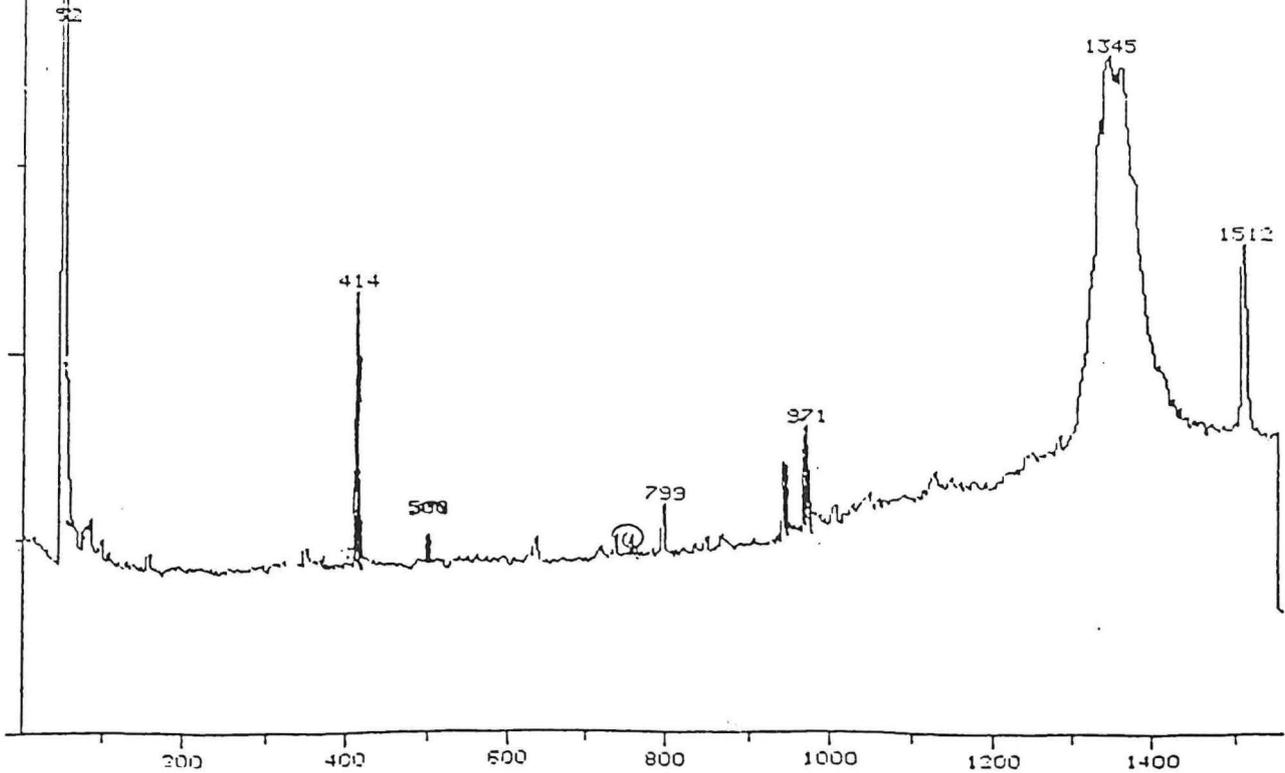
## Mâles non gorgés



## Femelles non gorgées

10 FEM. NC PIPETÉES A.U.

100% = 10000000



**Nymphes gorgées**

ERMAG/SIDAR U 3.1

LE A: AMBLYOS

DASH-24-11-89 17-XI-89

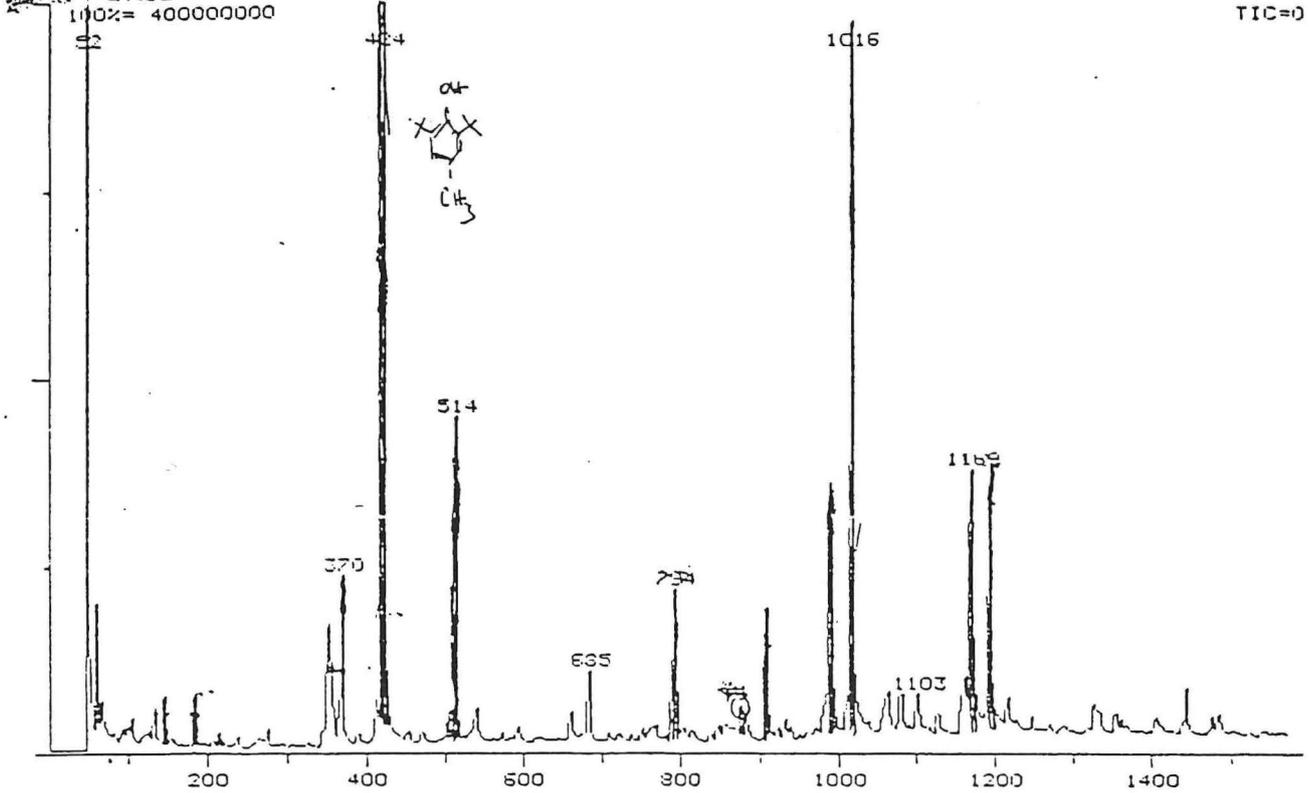
[ 64, 8 ]

12-JAN-90 13:53

12-JAN-90 11:12

CPSILSCB 140(5MIN)---240XC 10XC\MN \*

TIC=0



**Nymphes non gorgées**

ERMAG/SIDAR U 3.1

LE A: AMBLYOS

DASH-24-11-89 15-XI-89

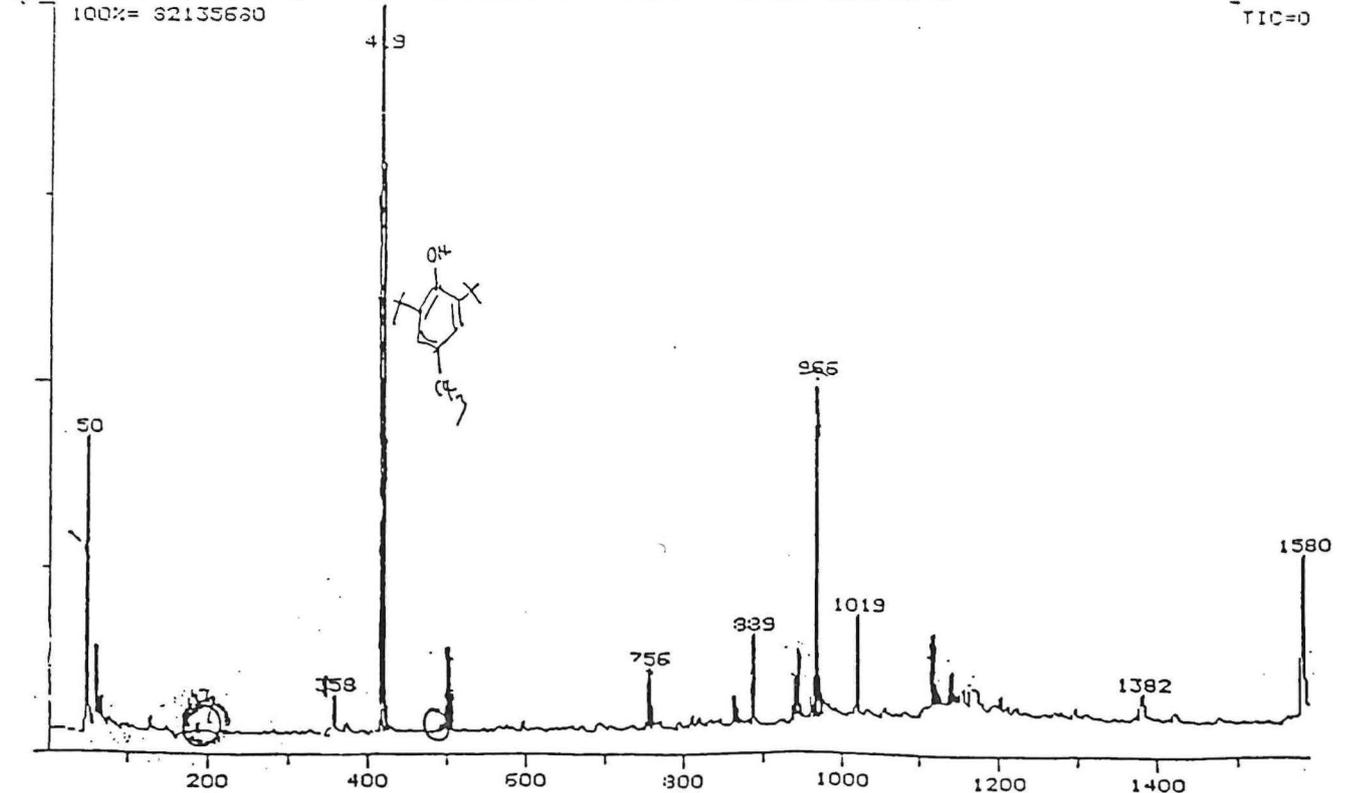
[ 64, 8 ]

12-JAN-90 15:15

12-JAN-90 09:46

CPSILSCB 140(5MIN)---240XC 10XC\MN \*

TIC=0



# ANNEXE 6

## COMPOSITION DES GELS

### Gel de migration

(13 %)

Sol.mère d'acrylamide 30%	13,0 ml
Eau distillée	9,5 ml
Tampon tris 1,5 M pH 8,8	7,5 ml
S.D.S. 10%	300 µl
A.P.S. 10%	110 µl
TEMED	11 µl

### Gel de concentration

(Spacer, 3% d'acrylamide)

Solution mère d'acrylamide 30%	1,25 ml
Eau distillée	8,1 ml
Tampon tris 0,5M pH 6,8	3,12 ml
S.D.S. 10%	125 µl
A.P.S. 10%	37,5 µl
TEMED	12,5 µl

### Solution mère d'acrylamide 30%

Acrylamide	150 g
Bisacrylamide	4 g
Eau Q.S.P.	500 ml

## TAMPONS ET SOLUTIONS

### Tampon cuve protéines

Tris	6,0 g
Glycine	28,8 g
S.D.S.	2,0 g
Eau q.s.p.	2,0 l

### Tampon de Leamly

Glycérol	75 ml
b-mercaptoéthanol	25 ml
S.D.S. à 10 %	100 ml
Tris 1 M	25 ml
Ajuster le pH à 6,8	
Eau q.s.p.	500 ml
Bleu de bromophénol	environ 0,1%

### Colorant protéines totales

Coomassie R 250	500 mg
Coomassie G 250	500 mg
Méthanol	500 ml
Acide acétique	100 ml
Eau	400 ml

### Décolorant protéines totales

Méthanol	500 ml
Acide acétique	100 ml
Eau	400 ml

# ANNEXE 7

## MATERIEL D'ELECTROPHORESE

Cuve à électrophorèse

1 plaque de 18,4 cm sur 17,7 cm

1 plaque à oreilles de 18,5 cm sur 18 cm

1 jeu de trois joints de 23 cm environ

1 peigne de 13 dents (5 mm de large)

1 jeu 6 pinces

Spectrophotomètre et petites cuves de 1 ml

1 générateur

Agarose

Micropipettes de 20 et 1000  $\mu$ l

Seringues Hamilton

Béchers pour la préparation des solutions