



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE METZ

pour obtenir le

DOCTORAT DE SPÉCIALITÉ

EN ECOLOGIE

mention : écologie expérimentale

par

JEAN-PAUL MONGE

PREMIÈRES DONNÉES SUR LES FACTEURS CHIMIQUES DE LA PLANTE HÔTE
(PHASEOLUS VULGARIS L.) INFLUENÇANT L'OVOGÉNÈSE ET LA PONTE DE
LA BRUCHE DU HARICOT (ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY)

soutenue le 21 JUIN 1982 devant la commission d'examen

Monsieur J.M. BLOCH

Président

Monsieur C. CHARARAS

Monsieur V. LABEYRIE

Monsieur M. NOURISSON

Monsieur J. POUZAT

} *Examineurs*

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19820025
Cote	S/M3 82/1
Loc	Magasin

AVANT PROPOS

Avant d'exposer les résultats de cette étude, je voudrais tout d'abord exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu juger ce travail.

Monsieur le Professeur V. LABEYRIE à qui je dois mon initiation à l'écologie et dont les encouragements ont été déterminants pour l'orientation de mes recherches.

Monsieur le Professeur J.M. BLOCH en qui j'ai trouvé un interlocuteur patient et qui m'a fait bénéficier de sa grande compétence en chimie.

Monsieur le Docteur C. CHARARAS, Directeur de Recherche au C.N.R.S. qui m'a fait l'honneur de participer au jury.

Monsieur le Docteur J. POUZAT qui m'a dirigé dans ce travail et à qui va toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, sa compréhension et ses conseils pertinents.

Monsieur le Professeur NOURISSON qui m'a accueilli au Laboratoire d'Ecologie et a bien voulu juger ce travail.

Je ne saurais oublier Madame BRULE, du Laboratoire de Chimie Minérale, pour l'aide qu'elle m'a toujours si aimablement apportée et Madame JASNIEWICZ qui a assuré avec soin et patience la dactylographie de ce travail.

Enfin, je remercie les membres du laboratoire d'Ecologie qui m'ont encouragé au cours de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	5
A. La plante	5
B. L'Insecte	5
C. Le protocole expérimental	8
D. Les données recueillies et leur interprétation	11
E. Les données préliminaires	
. <i>Détermination de la durée de l'expérience</i>	13
. <i>Données sommaires sur la cuticule de la plante hôte</i>	14
<u>Chapitre I : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'EXTRACTION DU STIMULUS CHIMIQUE</u>	18
I. <u>Comment obtenir un extrait actif ?</u>	20
A. En utilisant des téguments	20
B. En utilisant des graines entières broyées	21
C. En utilisant des graines intactes	22
II. <u>Etude de la ponte et de l'activité ovarienne en fonction de la durée de l'expérience</u>	31
<u>Discussion</u>	35
<u>Chapitre II : FRACTIONNEMENT ET CARACTERISATION DES EXTRAITS</u>	38
I. <u>Le fractionnement des extraits</u>	40
A. Le fractionnement sur colonne	40
B. Le fractionnement dans une ampoule à décanter	44
<u>Discussion</u>	47
II. <u>Pourquoi n'obtenons-nous pas une fraction active ?</u>	49
A. Les substances stimulant la ponte sont-elles différentes suivant les femelles ?	49
B. Plusieurs substances sont-elles nécessaires	50
<u>Discussion</u>	52

III. <u>Etude de la fraction grasse</u>	54
A. La fraction grasse du haricot	54
B. La fraction grasse est-elle spécifique ?	56
IV. <u>Quelques caractéristiques des substances extraites</u>	58
A. L'analyse des extraits	58
B. L'analyse des fractions	59
1. <i>Les phases solubles dans les solvants organiques</i>	59
2. <i>Les phases solubles dans l'eau</i>	62
<u>Discussion</u>	70
<u>Chapitre III : QUELQUES DONNEES RELATIVES AUX REGULATIONS DE L'ACTIVITE REPRODUCTRICE</u>	74
I. <u>Existe-t-il une régulation de chacune des étapes de l'activité ovarienne ?</u>	76
A. La perforation des gousses de la plante hôte	76
1. <i>Observation du comportement de quelques femelles en présence de gousse</i>	76
2. <i>Le comportement des femelles en présence de graines</i>	77
3. <i>Le comportement des femelles en présence d'extrait de la plante hôte</i>	78
4. <i>La nature chimique des substances stimulant la perforation</i>	81
B. L'ovoposition et la production ovarienne sont-elles stimulées par les mêmes substances ?	83
II. <u>Etude de la variation de la réactivité des bruches</u>	86
A. Etude des variations individuelles	86
B. Etude des variations entre les générations et les souches	87
<u>Discussion</u>	90
CONCLUSIONS GENERALES	93
BIBLIOGRAPHIE	99

INTRODUCTION

Les larves de certains insectes holométaboles phytophages oligophages, comme les Bruchidae, ont un régime alimentaire si spécifique que peu d'espèces végétales et même de parties de ces espèces leur permettent d'assurer leur développement complet. Cette spécialisation et en particulier celle d'*Acanthoscelides obtectus* qui résulte d'une coévolution entre l'insecte et la plante hôte est souvent le fait, comme le remarque JANZEN (1977), d'adaptations physiologiques (comportementales et métaboliques). Chez ces insectes, la femelle a un rôle d'autant plus important que les possibilités de locomotion et de discernement des larves néonates sont, la plupart du temps, limitées (DETHIER, 1953 ; WIKLUND, 1975). Si le choix de la plante et même du stade phénologique, par la femelle, est essentiellement guidé par des substances dites secondaires ou allélochimiques (DETHIER, 1953 ; FRAENKEL, 1959 ; JANZEN, 1978) la connaissance de ces substances et des régulations des comportements de ponte en dépendant n'est pas très avancée, d'autant plus que, comme le fait remarquer FRAENKEL (1969), ces comportements ont été moins étudiés que ceux des stades consommateurs.

Il faut souligner que cette étude est d'autant plus délicate qu'outre les substances secondaires, il faut si possible prendre également en compte les différents éléments de la biocénose (entomophages, prédateurs, autres végétaux que la plante hôte) ainsi que les facteurs périodiques (LABEYRIE, 1977). Toutefois, différents travaux nous permettent de constater que l'insecte est guidé vers la plante hôte par des facteurs qui ont un effet attractif.

Ceux-ci sont, soit des facteurs chimiques volatils (THORSTEINSON, 1953 ; DAVID et GARDINER, 1962 ; WEARING, 1973 ; NAIR et Mc EVEN, 1976 ; PIERCE et Coll., 1978 ; AUGER et THIBOUT, 1979 ; LECOMTE, 1980 ; VISSER, 1979 ; CHARARAS, 1982), soit des facteurs physiques pas ou peu spécifiques.

L'étude et l'isolement des facteurs chimiques, effectuée par exemple par PIERCE et Coll. (1978), WEARING et HUTCHING (1973), WALLBANK et WHEATLEY (1979), GUERIN et VISSER (1980), ont permis d'identifier des molécules ayant un certain pouvoir attractif. Si les substances volatiles attirent les insectes, il semble que parfois elles stimulent aussi l'ovogénèse (CADEILHAN, 1965 ; HILLYER et THORSTEINSON, 1969 ; DESEÖ, 1970 ; FENEMORE, 1979). Cependant, comme peu de travaux ont été consacrés à ce phénomène, nous ne pouvons savoir s'il s'agit là d'un phénomène courant.

Quant aux facteurs physiques, leur nature est des plus variables : lumière (SAXENA, 1978 ; DOWELL, 1979), forme (PROKOPY et Coll., 1971), humidité (SAXENA, 1978) par exemple.

Lorsque la femelle, grâce aux différents facteurs physiques et chimiques, a localisé sa plante hôte, elle va généralement pondre (LABEYRIE, 1978). Elle dépose ses oeufs au pied de la plante (*Phthorimaea operculella*, *Hylemya brassicae*, *Hylemya antiqua*) ou sur la plante.

A ce stade, deux types de facteurs peuvent affecter la ponte. Pour certaines espèces des facteurs mécaniques spécifiques (GREANY et SZENTESI, 1979), pour d'autres des facteurs chimiques perçus par contact, comme le démontrent de nombreux auteurs (BARLOW, 1965 ; TRAYNIER, 1967 ; YAMAMOTO, 1969 ; THIBOUT, 1974 ; ROBERT, 1977 ; POUZAT, 1977, 1978 ; SAXENA et GOYAL, 1978 ; STÄDLER, 1978 ; DOWELL, 1979 ; HAMILTON, 1979 ; SZENTESI, 1979 ; DINDONIS, 1980, FENEMORE, 1980 ; AUGER et THIBOUT, 1981). Les uns ou les autres sont perçus lors du

contact de l'insecte avec la plante et s'avèrent indispensables à l'oviposition. Cependant, dans de nombreux cas, la présence simultanée de ces facteurs mécaniques et chimiques semble indispensable comme l'indiquent AVIDOV et Coll. (1965), SPAKS (1973), NWANZE et Coll. (1975), POUZAT (1976), ROBERT (1977).

S'il a souvent été possible d'extraire ces facteurs chimiques, en revanche leur isolement et leur identification a rarement été obtenue. En effet, seuls quelques auteurs ont identifié des molécules stimulant l'oviposition. Nous remarquons que ce sont essentiellement des substances solubles dans l'eau : des glucosinabates (glucosinolates des anglo-saxons). (THORSTEINSON, 1953 ; MITCHELL, 1977 ; STÄDLER, 1978).

De ces différents travaux, il ressort que l'identification de la plante hôte par un insecte, surtout lorsqu'il s'agit d'un insecte phytophage oligophage, se fait le plus souvent lors d'un contact, par la "reconnaissance" de substances secondaires (POUZAT, 1977 ; JANZEN, 1978). Il est possible d'ailleurs, que la nécessité d'un tel contact soit plus répandue que ne le font ressortir les publications car elle semble parfois avoir échappé à certains observateurs (DINDONIS, 1980).

Certains de ces insectes phytophages s'attaquent aux pulses (légumineuses à graines alimentaires) qui revêtent une très grande importance dans certains pays tropicaux (LABEYRIE, 1981). Parmi ces insectes, la bruche du haricot, *Acanthoscelides obtectus* Say est l'un des plus répandus. Son comportement de ponte est connu grâce à différents travaux (LARSON et FISCHER, 1938 ; VOUKASSOVITCH, 1949 ; ZACHARIAE, 1958, 1959 ; LABEYRIE, 1962 ; HUIGNARD, 1973 ; POUZAT, 1975, 1977, 1978).

Il a été établi que la plante hôte a une grande importance dans la régulation de l'ovogénèse et de l'oviposition (LABEYRIE, 1960b ; POUZAT, 1974a, 1978). POUZAT a bien montré que l'ovogénèse est finalement arrêtée en l'absence de plante hôte et n'est réactivée que si la bruche entre en contact avec celle-ci. SZENTESI (1976) confirme d'ailleurs ces observations.

L'activité reproductrice paraissant donc régulée, entre autres, par des facteurs chimiques, on a essayé de dissoudre des substances pour vérifier cette hypothèse (POUZAT, 1977 ; MONGE, 1979 ; MARIA, 1980). POUZAT et nous-même, avons montré que l'on peut obtenir un extrait de la plante hôte stimulant la ponte et l'ovogénèse de la bruche bien que les résultats obtenus ne soient ni parfaitement reproductibles ni totalement comparables à ceux obtenus en présence de graine.

Au cours de ce travail où nous avons étudié le comportement de ponte de la bruche du haricot, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux relations chimiques entre l'insecte et sa plante hôte. Afin d'obtenir un extrait induisant le comportement de ponte de la bruche, comme le fait le haricot, nous avons essayé divers solvants et différentes méthodes d'extraction. Nous avons cherché à caractériser, le plus précisément possible, les substances qui induisent l'oviposition et la production ovarienne. Comme POUZAT (1978) a montré que ces activités sont soumises à des régulations différentes, nous avons essayé de déterminer si le même stimulus chimique induit ces deux activités.

Il nous a aussi semblé nécessaire d'analyser la variation des résultats obtenus, phénomène déjà décrit, afin de déterminer si elle dépend des composés chimiques ou du polymorphisme des populations de bruche lié à la complexité des régulations du comportement de reproduction.

MATERIELS ET METHODES

A. LA PLANTE

D'après SOUTHGATE (1981), dans la nature la bruche ne se développerait que dans les graines de trois Légumineuses Phascoleae : *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus* et *Phaseolus lunatus*. Mais, au cours de ce travail nous n'utilisons qu'une seule plante hôte, *Phaseolus vulgaris* L en nous limitant à la variété "Soisson" (à graines blanches et lisses). Les graines dont nous nous servons proviennent du terrain expérimental de l'I.B.E.A.S. à MONTLOUIS (INDRE ET LOIRE).

Après la récolte, les graines sont stockées à + 5°C, puis, peu avant leur utilisation elles sont conservées dans le laboratoire, à température ambiante.

Pour éviter des erreurs liées aux transformations chimiques qui se produisent dans ces conditions de stockage (TOUZARD, 1975) nous employons seulement des graines de un ou deux ans.

B. L'INSECTE

La bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus* - Say) est un Coléoptère phytophagoïde de la famille des Bruchidae.

Rappels biologiques

La femelle pond dans les gousses sèches déhiscentes ou contre les graines stockées (LARSON et FISCHER, 1938 ; ZACHARIAE, 1958, 1959 ; LABEYRIE, 1962). Si la gousse n'est pas déhiscente, l'animal peut pratiquer, sur la ligne de suture dorsale du carpelle, une perforation qui lui permet d'introduire

son ovitube dans la gousse et de déposer des oeufs près des graines. Ensuite, les larves néonates s'introduisent dans la graine par une perforation qu'elles effectuent à travers le tégument.

Le développement larvaire et la mue imaginale se produisent dans la graine où, d'après nos observations, dans nos conditions expérimentales, le jeune imago séjourne environ cinq jours. Au cours de cette période, l'insecte découpe à travers le tégument externe l'opercule qui lui permet de sortir.

A ce moment, les femelles ne possèdent pas encore d'ovocytes mûrs en rétention dans les oviductes latéraux. Mais, après la sortie, qu'elles soient ou non en présence de la plante hôte, elles produisent des ovocytes qui s'accumulent dans les oviductes latéraux. Cette production cesse 6 à 8 jours après la sortie de la graine si la bruche ne rencontre pas la plante hôte. Il y a alors une trentaine d'ovocytes en rétention (POUZAT, 1978b), tout au moins dans les souches qui sont utilisées.

Si en revanche elle se trouve en présence de la plante hôte, l'activité ovarienne se poursuit ou reprend et les femelles inséminées pondent.

Dans les stocks, les bruches vont pondre sur les graines, et, suivant les conditions thermiques plusieurs générations peuvent alors se développer. Mais, lorsque les conditions (température, lumière) le permettent, certaines bruches vont, à partir des stocks pouvoir aller infester les cultures avoisinantes (ARNOULD et Coll., 1958 ; LABEYRIE, 1962 ; JARRY, 1981).

Les caractéristiques des souches utilisées

Nous avons utilisé deux souches :

- l'une a été obtenue à partir de bruches élevées à l'I.B.E.A.S. provenant d'une souche dite "normale" et utilisée par POUZAT (1970),

- l'autre est issue de haricots récoltés dans les Landes, à Pépote, elle est entretenue sans autre sélection dans un élevage "en masse" sur graine. C'est la souche que nous appellerons "sauvage".

La souche "normale" a été sélectionnée par LABEYRIE (1961, 1968) suivant deux critères : ne sont retenus que les oeufs des femelles :

- qui ne pondent pas en l'absence de graine pendant une période de 6 à 8 jours (comptés à partir de la sortie de l'imago de la graine),
- qui pondent le plus dans les 24 heures qui suivent l'introduction d'une graine dans la boîte d'élevage.

Comme POUZAT, qui utilise cette souche, nous n'avons retenu que le premier critère.

Entretien de la souche

Le jour de leur sortie de la graine, nous sexons les bruches et nous formons des couples. Chacun d'entre eux est placé dans une boîte de Pétri où se trouve un abreuvoir contenant un coton imbibé d'eau miellée. A chaque génération, nous isolons ainsi au moins 50 couples. Après une semaine, nous séparons les femelles et nous plaçons celles qui n'ont pas pondu dans une boîte de Pétri contenant 5 à 10 graines de haricot et un nouvel abreuvoir. Les bruches de la génération suivante apparaissent de 35 à 45 jours plus tard.

Les conditions d'élevage

Bien que pendant plusieurs mois (janvier à juillet 1981) nous ayons dû placer les bruches dans des conditions hygrométriques particulières, nous avons eu le souci de pratiquer notre élevage dans des conditions proches de celles que les bruches rencontrent dans leur biotope d'origine. Il s'agit de la zone équatoriale de moyenne altitude d'Amérique du Sud (LABEYRIE, 1962 ; HUIGNARD et BIEMONT, 1978) où les températures diurnes ne dépasseraient pas 30°C.

Ce dernier critère est d'importance car, il a été montré par HUIGNARD et BIEMONT (1974) que des températures élevées pouvaient entraîner la stérilisation des mâles.

En dehors des périodes de manipulation, les bruches sont placées dans une étuve.

La température est de 26°C pendant 12 heures (de 8 h à 20 h), mais, certains jours en été elle dépasse cette valeur. De 20 h à 8 h, après avoir lentement diminué, elle se rapproche de la température ambiante, mais les variations saisonnières de celle-ci (+ 8°C, + 28°C) expliquent la grande différence constatée dans la durée du développement larvaire.

L'hygrométrie est généralement maintenue à 80 % d'H R. Mais, durant le 1^{er} semestre 1981, pour des raisons pratiques, elle a été maintenue à un niveau plus bas. En janvier, elle variait de 30 % à 35 % et atteignait 50 %* en juillet, la nuit elle était bien sûr plus élevée. Ces conditions très particulières ont été maintenues car nous ne pouvions mieux réguler l'hygrométrie (fig. 1 et 2).

Nous n'avons pas soumis les bruches à une photopériode car il nous est impossible de placer toutes les femelles dans des conditions identiques. Les bruches ont donc été élevées à l'obscurité et apparemment cela n'a pas eu d'influence sur le comportement et la physiologie des femelles.

C. LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- La sélection des femelles

Chaque jour, nous isolons les bruches sorties des graines, cette sortie spontanée sera toujours l'origine des

* Ne pouvant effectuer de mesures en continu des différents paramètres, nous n'indiquons ici que des valeurs observées. Les animaux ont peut-être subi des températures extrêmes plus importantes.

temps. Nous plaçons les bruches par couple, généralement le jour même, dans une boîte de Pétri. Nous connaissons ainsi "l'âge" des bruches avec une incertitude de 24 h.

Après quelques jours, avant de les placer en expérience, nous vérifions que les femelles de la souche "normale" n'ont pas pondu et nous comptons les oeufs déposés par celles de la souche "sauvage" qui pondent même en l'absence de la plante hôte. Avec chaque tableau, nous indiquons la durée de l'expérience et l'âge des femelles utilisées.

- L'obtention des extraits

Nous appelons "extrait" l'ensemble des substances de la graine de haricot dissoutes par un ou plusieurs solvants et nous appelons "fraction" les substances qui sont isolées de l'extrait par des méthodes physiques ou chimiques. Les fractions, suivant les méthodes utilisées, sont plus ou moins pures.

Les extraits sont obtenus à partir de graines entières non broyées ou de graines entières broyées ou bien à partir des seuls téguments des graines que nous isolons avant de procéder à l'extraction. Comme la plupart des extractions sont effectuées avec des graines entières non broyées, nous ne précisons l'état des graines que dans les autres cas. Nous n'utilisons que des produits chimiques très purs (RP Normapur pour analyses) et de l'eau distillée au laboratoire.

Nous nous attachons ici à la description des méthodes employées pour extraire des substances. Nous indiquons, avec chaque tableau, le temps d'extraction et le solvant utilisé.

L'extraction :

- *par immersion simple* : les graines placées dans un erlen et recouvertes de solvant sont laissées dans la pièce, sans agitation ni chauffage,
- *par immersion et agitation* : les graines sont recouvertes de solvant et agitées constamment par un agitateur magnétique ou mécanique, (agitateur secoueur Pro-labo à mouvement de va et vient),

- par ébullition : les graines sont placées dans un ballon surmonté d'une colonne réfrigérante. Le solvant qui recouvre les graines est porté à ébullition par un chauffe ballon électrique,
- avec un Soxhlet : les vapeurs du solvant, condensées dans la colonne réfrigérante, tombent sur les graines. Lorsqu'il les recouvre, un siphon permet son évacuation, ainsi que celle des substances dissoutes vers le ballon où le solvant est chauffé. Donc, l'extraction se fait presque à température ambiante, mais la conservation des substances se fait à la température d'ébullition des solvants.

La séparation : - Après extraction, nous séparons les graines du solvant. Lorsque cela est possible, nous filtrons l'extrait puis nous évaporons le solvant pour récupérer les substances extraites.
L'évaporation est effectuée au rotavapor ou en laissant l'ensemble sous une hotte ventilée lorsque le solvant est très volatil.

- Le dispositif expérimental

Nous utilisons des boîtes de Pétri en plastique de 5,5 cm de diamètre, elles sont réutilisées après lavage avec de l'eau additionnée d'eau de javel. Les abreuvoirs sont, après lavage et remplacement du coton, réemployés.

Quant aux extraits, ils sont repris dans un volume connu de solvant et déposés en haut d'un papier filtre (papier filtre Whatman, 64 g/m²) de 3,5 cm sur 2,5 cm, incliné, avec une micropipette. Le solvant et, avec lui, l'extrait, se répandent sur toute la surface. Lorsque nous utilisons un solvant organique, après le dépôt de l'extrait, les papiers sont placés 15 mn dans une étuve à 40°C sous vide.

Pour chaque tableau, nous indiquons à combien de graines correspond l'extrait utilisé. Il faut bien voir que ce n'est qu'à titre indicatif car il est difficile de comparer les substances extraites de l'ensemble du haricot à celles qui se trouvent à la surface du même nombre de graines, tant en quantité qu'en qualité.

Le papier est ensuite enroulé autour d'une lame de verre (2,5 x 3,5 cm), lavée avant réutilisation, fixée au fond de la boîte par un papier collant double face comme le montre le schéma n° 1. Cette disposition est importante car la stimulation mécanique est indispensable à la ponte (POUZAT, 1976).

Pour chaque expérience, les femelles sont réparties au hasard entre les différents lots à raison d'une femelle par boîte. Les femelles de la même souche et de la même génération sont placées individuellement dans une boîte,

- un lot est placé avec une graine,
- un lot est placé soit dans une boîte vide, soit dans une boîte contenant un papier imprégné de solvant pur enroulé autour d'une lame de verre,
- des lots sont placés dans une boîte avec un papier imprégné d'extrait, enroulé autour d'une lame de verre, ou un haricot ayant séjourné dans un solvant.

Comme le nombre de femelles disponibles chaque jour est inférieur au nombre total des femelles nécessaires, nous mettons en route simultanément tous les lots et nous les complétons chaque jour.

D. LES DONNEES RECUEILLIES ET LEUR INTERPRETATION

- Les informations obtenues

Avant d'introduire les femelles dans les boîtes, nous

comptons les oeufs pondus par celles de la souche "sauvage" et nous éliminons les femelles de la souche "normale" qui ont pondu.

A la fin de l'expérience, nous dénombrons les oeufs pondus et les ovocytes en rétention dans les oviductes latéraux.

Nous vérifions aussi que les femelles ont bien été inséminées, l'importance du corps gras et l'état des ovarioles, mais ces deux éléments ne servent qu'à vérifier la cohérence des autres données et ne sont pas reportées dans nos tableaux.

Nous connaissons ainsi pour chaque femelle :

- le nombre d'oeufs pondus : *la ponte*,
- le nombre total d'ovocytes produits : *la production ovarienne*.

- L'interprétation des résultats

Nous utilisons des méthodes statistiques simples pour interpréter les résultats.

Nous calculons la moyenne et l'écart type de la ponte et de la production ovarienne et nous comparons, si nécessaire, ces moyennes à l'aide du test de Student (test t). De plus, nous calculons les moyennes des pourcentages de ponte, ou pourcentage de ponte réel (p) (1), nous donnons ces valeurs dans les tableaux, accompagnées des moyennes des pourcentages corrigés (2) des pontes, cette dernière donnée est accompagnée de l'écart type. La correction de la moyenne du pourcentage de ponte permet d'établir des comparaisons entre les différentes générations.

Nous étudions aussi la distribution des femelles en fonction des pontes et des productions ovariennes, ce qui permet d'apprécier le polymorphisme des échantillons étudiés et d'affiner l'interprétation des résultats.

E. DONNEES PRELIMINAIRES

- Détermination de la durée de l'expérience

Nous avons remarqué que lorsque nous mettons une graine dans la boîte, toutes les femelles ne pondent pas dans les 24 h, aussi nous a-t-il semblé opportun de déterminer le temps nécessaire pour que toutes les femelles, de notre souche "normale", pondent de façon appréciable.

Pour cela, nous avons utilisé quatre groupes dont deux sont mis en présence d'extrait. Sur les papiers filtres d'un groupe, nous avons disposé quatre fois plus d'extrait que sur ceux de l'autre.

Les femelles sont mises à pondre à J₄.

- Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans les tableaux n° 1 et 2.

Parmi les groupes témoins, en l'absence de stimulus chimique, il y a néanmoins ponte de quelques oeufs. Ces pontes sont sans doute induites par les stimulations mécaniques du dispositif expérimental. Mais, en présence du haricot, nous constatons que dès J₅, 94,1 % des femelles ont pondu et qu'à J₆, il y en a 97,0 % et 100 % à J₇.

Ce sont les femelles placées avec l'extrait le moins concentré qui pondent le plus. Avec lui, 50,0 % des femelles ont pondu dès J₅, 61,7 % à J₆ et 64,7 % à J₇, au lieu de 100 % avec la graine. Après J₇, le nombre de femelles stimulées semble stabilisé, celles qui commencent alors à pondre ne déposent qu'un nombre très faible d'oeufs, de l'ordre de 2 à 5.

Ainsi, à J₇, les femelles qui sont stimulées par les facteurs chimiques présentés (graine ou extrait) ont pondu.

De plus, les femelles en présence d'extrait qui n'ont pas pondu à J₈ sont placées dans une autre boîte où se trouve une graine, jusqu'à J₉. Nous constatons que dès le lendemain, toutes ces femelles ont pondu. Donc l'absence de ponte en présence d'extrait est bien la conséquence du manque d'efficacité du stimulus présenté et non d'une incapacité à pondre.

Ces observations nous montrent qu'une durée minimum de 2 jours est nécessaire pour étudier l'influence des extraits sur l'oviposition de la bruche et qu'il est préférable d'utiliser des femelles âgées de 7 à 8 jours afin que la plupart des femelles commencent à pondre dès le premier jour de l'expérience car nous savons qu'à cet âge (POUZAT, 1978b) elles ont une trentaine d'ovocytes mûrs stockés dans les oviductes latéraux.

Cependant, une durée plus longue de l'expérience, 3 à 4 jours, est apparemment nécessaire pour réellement apprécier l'influence de l'extrait sur la production ovarienne.

Enfin, il ne semble pas nécessaire d'utiliser des quantités importantes d'extrait pour vérifier son influence sur l'activité reproductrice de la bruche.

- Données sommaires sur la cuticule de la plante hôte

Si dans la bibliographie nous n'avons pas trouvé d'étude sur la morphologie et les caractéristiques chimiques de la cuticule ou de l'épicuticule de *Phaseolus vulgaris* L, il est néanmoins possible, à partir des travaux consacrés à celles d'autres végétaux, d'en pressentir la constitution.

La cuticule qui recouvre la surface des végétaux influence l'absorption foliaire (LEECE, 1976). Elle limite les pénétrations chimiques ou biologiques (HOCH, 1979) et régule aussi les passages de l'eau (SCHÖNHER et Coll., 1979). Mais c'est

que bien peu de travaux sont consacrés à celle des graines. D'ailleurs, BRISSON et PETERSON (1976) d'après LERSTEN (1979) ne dénombraient que neuf publications comportant des photographies de la surface des graines effectuées au microscope électronique à balayage (S.E.M.).

Si, depuis, quelques travaux ont été publiés, ils sont peu nombreux et aucun ne semble consacré au haricot. A notre connaissance seuls FLORES (1977), STAMOPOULOS (1980) et THIERY (1981) ont joint à leur travail une photographie le 1^e de la surface de la feuille et de la tige, les autres de la graine, mais les grossissements qu'ils utilisent ne donnent pas de renseignement important sur la surface des organes étudiés.

- L'aspect de l'épicuticule -

Comme on peut le supposer, seuls les travaux effectués au S.E.M. permettent de bonnes observations (BAKER et HOLLOWAY, 1971). Sur les photographies, on observe le plus souvent des dômes juxtaposés recouverts de cristaux dont la structure est essentiellement liée à la nature chimique, qui semble d'ailleurs être toujours lipidique (DAVIS, 1971 ; JEFFREE et Coll., 1975). AMELUXEN et Coll. (1967) ont proposé une classification de ces cristaux, basée sur la forme, qui est reprise par la plupart des auteurs étudiant la surface des végétaux. Ils constatent que suivant les plantes étudiées, leur densité et leur répartition peut varier avec les conditions de culture (HULL, 1979 ; BAKER, 1974) et la phénologie (FREEMAN, 1979).

SHARMA (1977) qui a étudié la surface des graines (seed coat) de 3 Phaseoleae (*Ph. mungo*, *radiatus* et *sublobatus*) confirme l'existence dans cette famille des variations interspécifiques de la forme et de la répartition des cristaux de l'épicuticule. Il remarque aussi que des populations de *Ph. sublobatus*, séparées de 125 km ont un "seed coat pattern" différent, cette différence étant liée, selon lui, à des facteurs édaphiques.

De plus, comme l'a montré BLECKMAN (1975) sur *Prosopis*, on retrouve des cristaux à la surface des cotylédons. Mais, selon lui, WORTHMAN (1965) n'aurait pas trouvé de cristaux sur les cotylédons du colza, de la betterave à sucre et du blé, donc seules des observations permettraient de savoir s'il y en a à la surface des cotylédons du haricot.

Ainsi, l'épicuticule est surtout formée de cristaux, mais on constate une très grande variation inter et intraspécifique.

- La structure de la cuticule -

BLECKMAN (1980) décrit chez *Proposis* une cuticule de structure lamellaire, située sous l'épicuticule cireuse, et composée de trois couches.

La première, sous l'épicuticule, est essentiellement formée de cutine, la suivante est très riche en hémicellulose et enfin la troisième est, elle, très riche en cellulose.

Comme KOLATTUKUDY (1969) il ne décrit pas de réseaux de "tubules" dans les lamelles internes et moyennes, à l'inverse de certains auteurs (DAVIS, 1971). Ces tubules permettraient le transport, par un solvant, des précurseurs de la cutine et des cires, synthétisés par les cellules épidermiques, vers les couches supérieures où ils seraient incorporés. En tout état de cause, de tels mouvements ont bien lieu dans la cuticule des feuilles d'*Allium porrum* (CASSAGNE et LESSIRE, 1975), ils se font dans les deux sens, ils sont fréquents et rapides. Mais, en ce qui concerne les graines, nous ne possédons aucune donnée relative à de tels transferts.

Sous la cuticule de *Lathyrus latifolius*, se trouvent des cellules épidermiques, "les cellules de Malpighi" (malpighian cells) (LERSTEN, 1977), qui sont allongées, accolées sur leur plus grande longueur et dont les extrémités forment les dômes observés à la surface. Cette structure n'est pas constante dans l'espèce

et même, semble-t-il, sur un même individu (LERSTEN, 1977 ; SHARMA, 1977). Mais elle semble exister chez le haricot (THIERY, 1981).

- La composition de la cuticule et de l'épicuticule

Lors des études de la composition de l'épicuticule, ce sont surtout des cires qui ont été mises en évidence. KOLATTUKUDY (1969), MARTIN et JUNIPER (1970) mettent en évidence des hydrocarbures, des esters, des alcools lourds, des acides gras libres et aussi des cétones, des alcools secondaires, des aldéhydes, des terpènes et des flavones. Mais la liste ne paraît pas exhaustive, surtout en ce qui concerne les lipides insaponifiables, les moins étudiés. Ces éléments seraient placés sur la couche externe, faite de cutine dans laquelle seraient incorporés des lipides insaturés (MORRISON, 1975). Dans la couche interne, on trouverait, en plus des lipides, des protéines.

La liste des corps extraits de la cuticule est longue et variable. Cette diversité tient autant aux végétaux qu'aux méthodes utilisées et aux buts recherchés. Il faut aussi remarquer qu'une fraction, variable suivant les études, n'est pas identifiée.

A titre indicatif, nous rapportons quelques données relatives à différentes plantes (fig. 3 et 4). Mais nous n'avons pas trouvé d'analyse se rapportant à la cuticule de la graine du haricot (*Ph. vulgaris*. L).

Ces données sommaires nous permettent de mieux comprendre la complexité de la cuticule et de l'épicuticule de la graine. Nous supposons que certaines de ces données peuvent convenir à la description de l'épicuticule de la gousse du haricot, où se trouvent aussi les substances qui influencent le comportement de ponte de la bruche du haricot.

CHAPITRE I

*Mise au point d'un protocole d'extraction
du stimulus chimique.*

On a déjà essayé d'obtenir des extraits de la plante hôte qui stimuleraient la ponte en utilisant différents solvants organiques (POUZAT, 1976 ; JERMY et SZENTESI, 1978 ; MONGE, 1979 ; MARIA, 1980).

Mais si les extraits obtenus stimulent parfois significativement l'activité reproductrice des bruches, nous remarquons que la distribution des femelles selon leur ponte n'est jamais comparable à celle obtenue avec la graine. De plus, la manipulation n'est pas, pour des raisons que nous n'avons pas encore bien élucidées, parfaitement reproductible.

Aussi avons-nous, dans un premier temps, essayé différents solvants et différentes méthodes afin d'obtenir un extrait stimulant la ponte comme le fait la plante hôte.

I. COMMENT OBTENIR UN EXTRAIT ACTIF ?

A. EN UTILISANT DES TEGUMENTS

Il ressort des travaux précédents (POUZAT, 1970, 1977) que les informations ne sont perçues que lorsque la femelle se trouve en contact avec la graine. Nous avons donc, à l'aide de pinces fines, soulevé et isolé le tégument de graines sèches afin qu'il n'y ait pas, dans l'extrait, de substances de réserve qui gêneraient l'analyse chimique. Bien sûr il aurait été souhaitable d'isoler la cuticule, mais cela aurait nécessité l'application de méthodes enzymatiques que nous ne pouvions utiliser.

Cet isolement est assez long. Lors de la manipulation, une fraction des substances externes doit rester sur les doigts, en particulier les cristaux de l'épicuticule. Malgré tout, POUZAT (1978) ayant démontré que les téguments stimulent la ponte, nous pensons que les substances recherchées sont présentes sur la partie isolée.

1. Solvants et méthodes

Nous utilisons soit des solvants organiques, soit de l'eau, soit les deux mélangés.

Les extractions se font par immersion avec ou sans agitation, ou à l'aide d'un Soxhlet.

Mais, lorsque nous utilisons l'eau comme solvant, l'extrait est très hygroscopique. Aussi devons-nous, avant de placer les femelles en présence des papiers imprégnés de ces extraits, bien les sécher et, pour éviter qu'ils ne se réhydratent, nous maintenons dans l'étuve une humidité relative assez basse. Ces précautions nous sont apparues d'autant plus nécessaires que POUZAT (1977) a démontré que la ponte des femelles est inhibée par l'eau.

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont indiqués dans les tableaux 3, 4 et 5.

Nous constatons que même si elle n'est pas nulle, la moyenne des pontes et le pourcentage de ponte en présence d'extrait est toujours très inférieur à la moyenne des pontes et au pourcentage de ponte des femelles en présence de la graine et ceci quels que soient les solvants et les méthodes employés.

De plus, aucun extrait ne stimule l'activité ovarienne. Or, comme nous savons que les téguments isolés stimulent nettement la ponte et l'activité ovarienne, ce n'est pas le matériel biologique mais la méthodologie qui est inappropriée : soit la méthode n'est pas assez efficace, soit la quantité de tégument utilisée n'est pas assez importante.

Ces résultats nous empêchent de déterminer la méthode d'extraction et le solvant les plus favorables. De plus, les difficultés rencontrées lors de la séparation du tégument nous ont amené à rechercher d'autres méthodes.

B. EN UTILISANT DES GRAINES ENTIERES BROYEES

Il n'est pas paradoxal d'utiliser toute la graine alors que le stimulus est à la surface car POUZAT (1978) a montré que la ponte est stimulée par de la poudre ou des fragments de graine et que les femelles pondent sur des cotylédons isolés. Nous avons d'ailleurs nous-même vérifié ce fait et nous avons constaté que le cycle biologique complet peut s'effectuer avec seulement des cotylédons.

Il faut aussi rappeler que nous avons déjà obtenu des extraits actifs à partir de graines broyées (MONGE, 1979).

1. Solvants et méthodes

Nous avons utilisé différents solvants organiques et pratiqué les extractions avec un Soxhlet.

Des extractions en milieu aqueux ont été tentées, mais l'extrait obtenu était inutilisable, quel que soit le pH, car, en plus de l'amidon, une mousse très abondante empêche la filtration de cet extrait fermentescible.

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans les tableaux 6 et 7. Ces résultats sont bien différents de ceux précédemment obtenus (MONGE, 1979). Pourtant, les extraits ont été effectués dans des conditions comparables, seuls la quantité de graines et le matériel utilisé diffèrent.

De telles variations dans les résultats ont déjà été décrites chez la bruche (LABEYRIE, 1977 ; POUZAT, 1974) et chez un autre insecte, *Oscinella frit* (HAMILTON, 1979). Leur origine peut être biologique et (ou) méthodologique. De toute façon, l'importance de ces variations indique bien que les bruches ne sont pas en présence d'un stimulus comparable au stimulus naturel.

C. EN UTILISANT DES GRAINES INTACTES

1. Solvants et méthodes

Nous employons des solvants organiques et des solvants aqueux. Nous pratiquons des extractions dans différentes conditions dont le détail est donné avec chaque tableau et nous varions les mélanges de solvant ainsi que la succession des solvants comme le montre la liste suivante.

. Extraits obtenus avec des solvants organiques

- Solvants utilisés seuls :

- Chloroforme : tableaux 8, 13, 14
- Méthanol : tableau 8
- Diéthoxyde (éther) : tableau 12

- Mélange des solvants avant l'extraction :

- Méthanol - Diéthoxyde (1-1) sans traitement préalable des graines : tableau 1
- Méthanol - Diéthoxyde (1-1) après un traitement préalable des graines avec un mélange eau-diéthoxyde (1-1) : tableaux 10, 11
- Méthanol - Diéthoxyde (1-1) après un traitement préalable des graines par l'éther : tableau 12
- Méthanol - Diéthoxyde (1-1) après un traitement préalable des graines par le chloroforme : tableaux 13, 14
- Mélange des solvants après extraction. Chloroforme et éther : tableau 17.

. Extraits obtenus avec des solvants aqueux

- Sans traitement préalable des graines :

- Solvant acide : tableau 15
- Solvant neutre : tableau 15
- Solvant basique : tableau 15

- Après traitement préalable des graines :

- Solvant neutre après traitement des graines par l'éther : tableau 12
- Solvant neutre après traitement des graines par le chloroforme : tableau 14.

. Extraits obtenus avec des solvants aqueux et organiques :

- Mélange des solvants après l'extraction :

- Chloroforme et eau : tableau 17
- Ether et eau : tableau 17
- Ether, chloroforme et eau : tableau 17

- Mélange des solvants après l'extraction, les graines non traitées au préalable sont passées parfois dans plusieurs solvants :
 - Méthanol-eau (1-1) : tableau 10
 - Ether-eau (1-1) : tableaux 9, 10, 11
 - Eau-ether (1-1) puis ether-méthanol (1-1) : tableaux 9, 11
 - Chloroforme puis (ether-acide) (1-1) HCl 0,1N : tableaux 16, 18
 - Chloroforme puis (ether-eau) (1-1) : tableaux 16, 17
 - Chloroforme puis (ether-base) (1-1) : tableau 16
 - Ether puis (ether-méthanol) (1-1) puis eau : tableau 12
 - Chloroforme puis (ether-eau) (1-1) puis (ether-méthanol) (1-1) : tableau 13

- Mélange des solvants avant l'extraction avec des graines déjà traitées par le chloroforme :
 - Eau-ether (1-1) : tableaux 13, 14

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans les tableaux 1 et 8 à 18.

a) Les extraits obtenus avec des solvants organiques

a.1. Utilisation d'un seul solvant organique :

Le chloroforme, bon solvant des acides gras et des cires, donne des extraits qui peuvent ne pas stimuler l'activité ovarienne et l'oviposition (tableau 8) ou bien les stimuler légèrement (tableaux 13, 14).

L'éther (diéthyloxyde), solvant aux propriétés voisines, donne aussi des extraits dont l'activité n'est pas comparable à celle de la graine (tableau 12). Nous avons montré, avec ce solvant, l'importance des conditions d'extraction. En effet, l'extrait obtenu sans agiter les graines n'est pas actif (pourcentage de ponte : 1,03 %), ce qui est en contradiction avec ce que POUZAT (1976-1978) et nous-même (MONGE, 1979) avons déjà décrit, tandis que l'extrait obtenu à partir de graines agitées dans l'éther stimule la production ovarienne de façon très significative ($t = 0,6$) mais non la ponte (pourcentage de ponte : 57,81 % et $t = 2,68$). Ces résultats obtenus avec la même génération sont particulièrement révélateurs de l'importance des conditions d'extraction.

Le méthanol (tableau 8), fournit un extrait qui stimule l'oviposition et la production ovarienne. Mais il n'a jamais toutes les propriétés stimulatrices de la graine et le pourcentage de ponte est significativement inférieur ($t = 3,72$) à celui observé en présence de graine.

Donc si les solvants organiques solubilisent des substances qui stimulent l'activité ovarienne des bruches à part l'extrait à l'éther (tableau 12) aucun extrait ne stimule la production ovarienne comme le fait la graine. De plus, en présence d'extrait, la ponte n'est jamais significativement stimulée.

a.2. Les extraits obtenus avec un mélange de solvants organiques

Nous avons essentiellement utilisé le mélange éther-méthanol (1-1), le seul qui ait donné des résultats intéressants (MONGE, 1979).

Ce mélange utilisé avec des graines qui n'ont pas été traitées par un autre solvant (tableau 1) donne un extrait qui stimule la ponte et l'oviposition mais les moyennes obtenues sont assez différentes de celles obtenues en présence de graine.

Utilisé après avoir traité les graines par un autre solvant, ce mélange donne des résultats variables.

En effet, si les graines ont été traitées par un solvant organique (tableaux 12, 13, 14) les moyennes et le pourcentage de ponte sont très inférieurs à ceux obtenus en présence de la graine et si les graines ont été préalablement traitées par un mélange (eau-éther, 1-1) (tableaux 10, 11) les moyennes sont alors un peu plus élevées. Mais, de toute façon, les moyennes de ponte et de production ovarienne ne sont jamais totalement comparables à celles obtenues avec la graine. Car (tableau 11) si la production est comparable ($t = 1,26$), la moyenne de ponte ainsi que le pourcentage de ponte ne le sont pas ($t = 3,51$, $t = 5,82$).

Donc, cette méthode donne essentiellement des extraits dont l'activité n'est pas comparable à celle de la graine.

b) Les extraits obtenus avec des solvants aqueux

b.1. Sans traitement préalable des graines :

Quand les graines n'ont pas été traitées au préalable, quel que soit le solvant (tableau 15), le pourcentage de ponte ainsi que les moyennes de ponte et de production ovarienne sont toujours très inférieurs aux valeurs obtenues en présence de la graine.

b.2. Après traitement préalable des graines :

Quand les graines sont traitées au préalable par un solvant organique, les moyennes de production ovarienne sont assez élevées mais ne sont comparables à celle des femelles en présence de graine que dans deux cas (tableau 14). De plus, les moyennes et les pourcentages de ponte en présence d'extrait sont toujours très inférieurs à ceux observés en présence de graine.

Donc, les solvants aqueux ne donnent pas d'extrait à l'activité comparable à celle de la graine. Nous nous demandons en plus, si les résultats intéressants observés en traitant au préalable les graines par un solvant organique, ne sont pas consécutifs à une mauvaise élimination du premier solvant après le traitement préalable.

Il faut noter aussi que l'acidité du solvant semble, malgré tout, favoriser l'extraction des substances qui nous intéressent.

c) Les extraits obtenus avec un mélange de solvants organiques et aqueux

c.1. Mélange des solvants après l'extraction

Nous pratiquons une extraction avec un solvant aqueux sur un lot de graines et avec un solvant organique sur un autre lot. Puis nous mélangeons les extraits (tableau 17). Nous constatons que l'activité de l'extrait est toujours réduite.

c.2. Mélange des solvants avant l'extraction

Si nous mélangeons les solvants avant de faire l'extraction, nous constatons alors que le mélange eau-éther (1-1) utilisé avec des graines déjà traitées par le chloroforme (tableaux 13, 14) donne un extrait avec lequel les moyennes de ponte et de production ovarienne sont comparables à celles obtenues avec la graine. Le pourcentage de ponte, quoique faible est pourtant comparable dans un cas au moins ($t = 1,47$, tableau 13 ; $t = 4,23$, tableau 14).

Donc le pouvoir de solubilisation de ce mélange paraît intéressant, même si le pourcentage de ponte est parfois un peu faible.

Si nous utilisons comme solvant le mélange eau-éther (1-1), tableaux 9, 10 et 11, ou eau-méthanol (1-1), tableau 10, avec des graines qui n'ont pas été traitées au préalable par le chloroforme, nous n'obtenons pas, comme le montrent les moyennes de ponte et de production ovarienne, d'extrait actif.

Nous avons essayé de compléter l'extraction en faisant agir après la première extraction, un mélange de solvants organiques (eau-éther (1-1) puis éther-méthanol (1-1)), tableaux 9 et 11. Mais cela n'a pas augmenté l'activité des extraits.

Ainsi, seul l'extrait obtenu en faisant agir le mélange eau-éther sur des graines préalablement traitées par le chloroforme se révèle actif.

Afin de vérifier si, dans le chloroforme, des substances secondaires actives n'étaient pas déjà solubilisées, nous avons testé le mélange des extraits : extrait chloroforme plus extrait eau-éther (provenant des mêmes graines) (tableaux 13, 16 et 17).

Cet extrait se révèle très actif sur l'ovogénèse et sur la ponte. Mais il faut noter que le pourcentage de ponte n'est pas toujours comparable à celui observé en présence de la graine. Aussi, avons-nous modifié le pH du mélange (tableaux 16, 17, 18).

Nous constatons (tableau 16) que l'extrait basique a une activité inférieure, en particulier sur la ponte, à celle des autres extraits (extrait acide et neutre).

L'extrait acide a une activité comparable à celle de la graine, bien que le pourcentage de ponte soit significativement inférieur à celui observé en présence de la graine (tableau 16) lorsqu'on utilise HCl 0,1N. Par contre l'utilisation d'HCl 0,5N (tableau 18) nous permet d'obtenir un extrait aux qualités remarquables puisque la moyenne de ponte et de production ovarienne des femelles avec graine et surtout le pourcentage de ponte est aussi significativement comparable ($t = 1,37$).

Donc, les résultats obtenus, bien que nous n'ayons utilisé ni tous les solvants ni toutes les méthodes d'extraction, ce qui représenterait un énorme travail, nous permettent d'établir un protocole d'extraction qui aboutit à l'élaboration d'un extrait stimulant la ponte de la bruche comme la stimule la graine.

Il faut donc, pour que l'extrait soit actif agiter les graines pendant une demi-heure dans le chloroforme puis 4 h dans un mélange éther-acide (HCl : 0,5 N) (1-1) et 20 h dans un mélange éther-acide (HCl : 0,1 N) (1-1).

Peut-être est-il possible de simplifier ce protocole qui donne des résultats intéressants, mais nous n'avons pu, dans le cadre de ce travail, le vérifier.

Pour souligner l'intérêt de la méthode proposée, nous devons étudier la distribution des femelles selon leur ponte et leur production ovarienne (tableau 18, courbes 1). Les graphiques nous montrent qu'en présence d'extrait, la distribution des femelles selon leur ponte est homogène et que l'oviposition de toutes les femelles est nettement stimulée. Bien que la distribution ne soit pas absolument gaussienne, elle est comparable à celle obtenue avec les pontes des femelles en présence de graine.

De plus, le décalage très net entre les courbes représentant la production ovarienne des femelles sans stimulus chimique et des femelles avec l'extrait montre bien l'activité des substances extraites. Si la distribution ovarienne des femelles placées avec haricot n'est pas tout à fait normale, phénomène qui sans être exceptionnel contraste avec la régularité des autres courbes, elle est pourtant dans son ensemble proche de celle obtenue avec l'extrait.

Donc, en présence d'extrait, la moyenne de ponte et de production ovarienne et la moyenne des pourcentages de ponte sont comparables à celles obtenues en présence de la graine (tableau 18) et les distributions sont superposables ; ces observations sont bien différentes de celles que POUZAT (1976) et nous-même avons faites (MONGE, 1979) et soulignent bien l'intérêt du protocole d'extraction utilisé.

Il est plus complexe que celui décrit par TRAYNIER (1967), STÄDLER (1978), SAXENA (1978), ROBERT (1977), ANGERILLI

(1980) qui ont aussi isolé des substances agissant sur la ponte. Il est également plus complexe que celui utilisé par POUZAT et nous-même mais amène des résultats plus intéressants. A notre connaissance, seul HAMILTON (1979) a eu besoin d'utiliser, lors de l'étude du comportement de ponte d'un insecte, un mélange de solvants organiques et aqueux.

II. ETUDE DE LA PONTE ET DE L'ACTIVITE OVARIENNE EN FONCTION DE LA DUREE DE L'EXPERIENCE

La quantité d'oeufs pondus en présence de la graine est d'autant plus importante que la femelle reste plus longtemps en sa présence. Nous avons voulu vérifier si on observe le même phénomène en présence d'extrait et donc dans quelle mesure cet extrait a une activité comparable à celle de la graine.

1. Méthodologie

Les femelles sont mises en présence des différents stimulus à l'âge de 8 jours. Régulièrement, nous prélevons un lot homogène pour compter les oeufs pondus et les ovocytes en rétention afin de déterminer la production ovarienne et la ponte.

L'expérience, répétée deux fois (juin 81, juillet 81) a donné des résultats comparables.

2. Résultats et commentaires

Dans les tableaux 19 et 20 nous rapportons les résultats obtenus en juillet. Le pourcentage de ponte et les tests statistiques (t de Student) sont indiqués dans les tableaux 21,22.

Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons reporté les valeurs obtenues sur des graphes (courbes 2).

Avant d'examiner les valeurs de la production ovarienne nous étudierons celles de la ponte.

En premier lieu, nous remarquons que, si les femelles du groupe témoin sans stimulation ont faiblement pondu, celles qui sont placées avec le support imbibé de solvant pur ont notablement pondu (13 oeufs en moyenne). Ce résultat diffère de ceux que nous avons déjà obtenus. Malgré tout, cette moyenne demeure peu élevée et elle est significativement inférieure à la moyenne des pontes des femelles en présence de graine.

Après 24 h de présence du stimulus, la moyenne et le pourcentage de ponte obtenus avec extrait sont inférieurs à ceux obtenus avec la graine. Nous avons fait la même constatation en juin, mais les moyennes étaient alors comparables ($t = 1,12$), ce qui n'est plus le cas ($t = 2,81$).

Pour une durée d'expérience de 2 à 7 jours, les moyennes de ponte des femelles en présence d'extrait et de celles en présence de graine ne sont pas significativement différentes (tableau 22), mais c'est au 3e jour d'expérience qu'elles sont le plus proche ($t = 0,32$).

Pourtant, après 9 jours d'expérience, les moyennes de ponte des femelles avec haricot et avec extrait sont significativement différentes ($t = 2,00$).

Donc, l'oviposition, après 24 h de présence du stimulus a été moins stimulée par l'extrait que par la graine. Cette différence s'atténue, en particulier après 3 jours d'expérience, mais elle réapparaît par la suite, et après 9 jours d'expérience, l'écart entre les moyennes de ponte est de nouveau significatif. De telles observations avaient déjà été effectuées en juin.

De plus, nous remarquons que, aussi bien avec extrait qu'avec haricot, les moyennes des pontes après 9 jours d'expérience sont nettement inférieures à celles observées après 7 jours d'expérience. Logiquement, elles devraient être au moins égales

ou supérieures, le nombre de femelles par lot étant assez élevé pour que des variations individuelles ne provoquent pas de telles différences. Nous pensons que des oeufs ou des chorions ont été consommés par les femelles, bien que notre attention n'ait pas été attirée par des morceaux de chorion. Des observations détaillées du comportement des femelles permettraient de déterminer l'origine de ce phénomène. C'est pourquoi, les dernières valeurs (9 jours d'expérience) ne doivent pas, à notre avis, être retenues.

Quant à l'activité ovarienne, elle est nettement stimulée par l'extrait, la moyenne des productions ovariennes en présence de graines est toujours comparable à celle obtenue en présence d'extrait (tableaux 20 et 22) comme l'indiquent les différentes valeurs de t . En revanche, l'ovogénèse des femelles sans stimulus n'est pas réactivée, les moyennes des productions ovariennes restent constantes et égales à environ une trentaine d'ovocytes, ce qui correspond à la quantité produite par les femelles pendant les 6 à 8 premiers jours de leur vie imaginaire (POUZAT, 1978). Il faut aussi remarquer que la production ovarienne des femelles en présence du stimulus mécanique est comparable ($t = 0,51$) à celle des femelles qui en sont dépourvues. Donc, seule l'oviposition de ces femelles a été stimulée par le stimulus mécanique imprégné de solvants purs.

Pour savoir s'il est possible d'établir une relation linéaire entre le nombre d'oeufs pondus ou d'ovocytes produits et la durée de l'expérience, nous avons calculé, pour chaque groupe, le coefficient de corrélation observé (tableau 23).

Ils démontrent qu'il n'existe pas de très fortes liaisons entre le nombre d'oeufs pondus ou d'ovocytes produits et le temps, bien que nous n'ayons pas pris en compte les valeurs obtenues à J_{17} , à cause des incertitudes pesant sur la validité de ces résultats.

Malgré tout, nous constatons, grâce aux droites de régression (courbes n° 3) que la ponte est moins stimulée par l'extrait que par la graine alors que la production l'est de façon comparable. Mais si ces droites ont un intérêt, elles ne font pas

bien ressortir la complexité des réactions comme le soulignent les valeurs des coefficients de corrélation.

En effet, l'extrait stimule davantage la production ovarienne que le haricot, pendant les trois premiers jours, puis l'action de la graine devient supérieure à celle de l'extrait, bien que les valeurs soient toujours comparables. Pourtant, jusqu'à J₁₁, l'extrait stimule moins l'oviposition que la graine, phénomène d'autant plus évident qu'un plus grand nombre d'ovocytes sont produits. Mais, après J₁₁, il y a une différence de plus en plus grande entre la ponte avec extrait et celle avec haricot. Mais, comme la production des femelles avec extrait est alors plus faible, nous pouvons considérer que la réaction à la stimulation est comparable.

Il apparait que l'action de l'extrait, qui dans un premier temps stimule un peu plus la production que la ponte, est inversée trois jours après. Aussi, sans pouvoir affirmer que l'extrait a les mêmes effets que la graine, du moins pouvons nous constater qu'ils sont le plus souvent très comparables.

Aussi, il semble bien que les principaux facteurs chimiques stimulants soient présents dans cet extrait qui stimule l'activité reproductrice comme le fait la graine.

DISCUSSION

En l'absence d'indications sur leur nature, l'élaboration du protocole d'extraction des substances secondaires est liée à l'utilisation méthodique de différents solvants et de différents protocoles. L'interprétation de chaque expérience repose sur la comparaison entre les moyennes des lots témoins et celles des lots avec extrait. Bien que cette méthode présente deux inconvénients majeurs liés d'une part à la variabilité des lots témoins et d'autre part à l'élaboration des extraits, elle est cependant la seule dont nous disposions.

Les lots témoins sont de deux types :

- les lots où la femelle est en présence du stimulus complet, c'est-à-dire la plante hôte,
- les lots où la femelle n'est en présence d'aucun stimulus (boîte vide) ou du seul stimulus mécanique (boîte avec papier).

Si nous comparons les moyennes de ponte et de production ovarienne dans ces deux conditions expérimentales (boîte avec papier, boîte sans papier), nous constatons qu'elles sont toujours proches (tableau 24) bien que les valeurs obtenues en présence du stimulus mécanique soient légèrement supérieures. Donc ce stimulus a, par sa seule présence, une légère influence sur la reproduction, et plus particulièrement sur celle de la souche sauvage. Bien qu'il introduise une stimulation étrangère à celle du seul extrait, en l'état actuel de nos travaux, nous ne pouvons renoncer à l'utilisation de papier filtre.

En effet, lorsque nous avons essayé de déposer les extraits directement au fond de la boîte de Petri, les femelles s'y sont engluées. Le taux de mortalité qui était alors impressionnant (47 % en 3 jours) ôtait toute valeur aux résultats, même si les femelles survivantes avaient parfois pondu.

Néanmoins, le faible écart constaté entre les moyennes montre que l'influence de la stimulation mécanique provoquée par le papier filtre demeure trop faible pour modifier les résultats

et l'utilisation de groupes témoins sans stimulus (boîte vide) permet malgré tout une bonne appréciation de l'activité des extraits.

Dans l'utilisation des 2 lots témoins, nous rencontrons d'autres difficultés qui tiennent à la variabilité des moyennes de ponte et surtout de production ovarienne au cours des générations. Ce phénomène, déjà signalé (POUZAT, 1974), gêne considérablement l'interprétation. Nous allons ainsi jusqu'à obtenir des moyennes de ponte comparables entre celles induites par la graine et celles induites par le papier avec solvant (tableau 17). Cette variabilité peut avoir une origine physique, dans la mesure où l'indépendance vis-à-vis des facteurs externes (température, humidité de la pièce où est située l'étuve) est loin d'être réalisée, ou biologique, à moins que ce ne soit la conjonction des deux types de causes.

Les difficultés d'interprétation peuvent aussi avoir d'autres origines, en particulier l'utilisation de certains solvants et de certaines méthodes d'extraction.

Les solvants que nous utilisons peuvent avoir une influence sur l'ovogénèse et l'oviposition en la stimulant ou en l'inhibant. En effet, POUZAT (1977) démontre que la présence d'eau inhibe la ponte, or les extraits aqueux sont hygroscopiques. De plus JEFFERSON et AGUIRRE (1980) montrent que la présence de méthanol stimule, dans certaines conditions, l'oviposition de *Drosophila pachea*.

C'est pour ces raisons que nous avons pris le soin de placer les papiers imprégnés d'extrait ou de solvant dans une étuve sous vide avant de les utiliser.

Nous estimons que, dans ces conditions, la quantité résiduelle de solvant est négligeable et n'a pas d'influence sur l'ovogénèse comme le démontre en partie le tableau 24, et qu'en maintenant dans l'étuve une humidité relative très basse, la quantité d'eau absorbée par les extraits n'inhibe pas l'oviposition.

En incluant parmi les solvants de l'eau et de l'acide, nous amenons une source considérable d'erreurs d'interprétation.

JERMY et SZENTESI (1978) indiquent qu' H_2SO_4 a une action répulsive, comme NaOH, mais qu'HCl, si la solution a un pH de 5,9, a une légère action stimulatrice. Bien que leur protocole expérimental soit succinctement décrit, nous pouvons penser que les solvants aqueux que nous utilisons modifient légèrement le comportement de la bruche. Afin de limiter les incertitudes, nous avons décidé de ne pas modifier, après extraction, le pH de l'extrait. Nous n'ajoutons pas de soude pour neutraliser l'acide car nous augmenterions la concentration en NaCl, qui, en solution 0,1M du moins, est un répulsif pour la bruche.

En outre, nous n'ignorons pas que des sels doivent se trouver dans la graine et que d'autres doivent se former lors de l'extraction, mais au moins n'augmentons-nous pas leur concentration. C'est important car, les mêmes auteurs ont montré que si $Mg SO_4$ stimule la ponte, beaucoup d'autres sels ont une action répulsive. Il serait d'ailleurs intéressant d'étudier l'influence des différents composés minéraux qui se trouvent dans les extraits, car leur action sur l'oviposition de certains insectes a été démontrée (ZAIM et NEWSON, 1979 ; MUSCHINEK et Coll., 1976 ; TRIMBLE et WELLINGTON, 1979).

Mais, si les solvants eux-mêmes amènent des incertitudes sur l'interprétation des résultats, il faut ajouter que leur mode d'utilisation les augmente.

En effet, le temps d'extraction (24 h) est si long que les solvants pénètrent dans tout le haricot dont le volume augmente considérablement.

Donc des substances "répulsives" éventuellement présentes à l'intérieur de la cuticule ou de la graine, non perçues normalement par la bruche, sont peut-être alors extraites. Cette hypothèse est d'autant moins à exclure que STAMOPOULOS (1980) a montré l'existence de substances toxiques pour les larves, dans le tégument du haricot et que GIROLAMI et Coll. (1981) ont décrit

des substances provenant de la plante hôte de *Dacus oleae* et ayant une action répulsive. Aussi, nous ne pouvons exclure la possibilité de recueillir dans l'extrait, des substances dissuadant la ponte.

De plus, nous ne savons pratiquement rien de ce stimulus de ponte. S'il est composé de plusieurs substances, comme nous le supposons, l'effet de chacune d'entre elle est peut-être conditionné par sa concentration par rapport aux autres. Il est possible que lors de l'extraction, nous modifions ce rapport. Il n'est pas surprenant dans ces conditions que l'activité reproductrice ne soit pas aussi bien stimulée par l'extrait que par la plante hôte.

Enfin, nous n'excluons pas, non plus, une possible dégradation des molécules recherchées lorsqu'elles sont isolées.

Toutes ces remarques soulignent bien les nombreuses incertitudes que les solvants et les méthodes utilisées peuvent amener sur l'interprétation de l'activité des extraits, d'autant plus que cette activité varie avec les individus et les générations. Malgré tout, avec le protocole utilisé, l'extrait et la graine stimulent l'activité reproductrice des femelles de la souche normale et de la souche sauvage d'une manière qui ne sont pas significativement différentes, ce qui était un préalable indispensable à toute étude de ce type.

CHAPITRE II

Fractionnement et caractérisation des extraits

Les solvants utilisés et la durée de l'extraction permettent d'obtenir un extrait qui stimule la ponte et l'activité ovarienne de la bruche.

Mais la diversité probable des substances extraites ne permet pas d'identifier directement les molécules ainsi séparées de la graine. Aussi, devons-nous fractionner l'extrait pour pouvoir envisager la caractérisation des molécules induisant ces activités.

I. LE FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS

A. LE FRACTIONNEMENT SUR COLONNE

1. Méthodologie

L'extrait est obtenu à partir de graines intactes placées dans un mélange de solvants (éther-méthanol-1-1) porté à ébullition pendant 24 h. Cette méthode a donné des résultats intéressants (tableau 1). En juin 1980, nous refaisons une extraction et nous fractionnons cet extrait.

Nous en diluons une partie correspondant à 350 g de graines entières dans 1000 ml d'un mélange éther-méthanol (1-1). Nous prélevons 100 ml de cette solution que nous concentrons à froid. L'extrait est alors dilué et dispersé dans l'hexane. Nous versons la solution sur une colonne de gel de Silice imprégnée d'hexane (silice de particules de 0,5 mm de diamètre). Cette colonne a 1,25 m de long et 7,5 cm de diamètre. Nous fractionnons la solution suivant deux méthodes.

Nous faisons passer 400 ml d'hexane, puis 600 ml de benzène, puis 500 ml de chloroforme, puis 500 ml d'éther. Nous constatons alors que la colonne change d'aspect, de translucide, elle devient opaque. Nous faisons alors passer 500 ml de méthanol. La solution d'abord opaque devient limpide lorsque l'éther qui imprégnait la silice a été éliminé par le méthanol. La partie trouble, que nous avons pu isoler, est soluble dans l'eau.

Enfin, nous faisons passer 400 ml d'eau. Un léger trouble apparaît dans le récipient, il floccule et se dépose.

Dans une nouvelle manipulation, seule la succession des solvants est modifiée.

Nous utilisons de nouveau 100 ml de solution, nous faisons passer 300 ml d'éther, 200 ml d'un mélange éther-méthanol (1-1). Nous observons alors, dans le récipient, un précipité blanchâtre. Puis nous versons 300 ml de méthanol et 500 ml d'eau.

Chaque fraction est recueillie séparément et testée. La quantité de substance déposée sur chaque papier correspond à environ trois graines de haricot. Même s'il y a, lors des manipulations, des pertes de substance, la quantité récupérée est encore assez importante pour éventuellement stimuler la ponte.

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans les tableaux 25, 26.

Avec la 1er série (Aout 80, tableau 25) l'extrait a une activité comparable à celui de janvier 80 (tableau 1) et juin 80.

L'oviposition n'est pas stimulée par les fractions solubles dans l'hexane, le benzène et le chloroforme, ce qui confirme les observations que nous avons déjà faites avec des extraits obtenus par ces solvants.

En revanche, en présence des fractions solubles dans l'éther, le méthanol et l'eau, certaines femelles pondent. Si la moyenne de ponte du groupe est faible, la moyenne de ponte des femelles ayant pondu nous montre que ces fractions stimulent de façon non négligeable certaines bruches.

Stimulus de ponte	Moyenne de ponte	N'
un haricot	37,51	29
papier avec extrait (1e lot)	28,88	18
papier avec extrait (2e lot)	24,05	19
papier avec la fraction éther	33,25	4
papier avec la fraction eau	21,75	8

Moyenne de ponte des femelles ayant pondu (tableau 25).

Bien que ces résultats n'aient qu'une valeur indicative, ils attestent bien que ces fractions comportent des molécules qui stimulent la ponte de quelques femelles.

En présence d'extrait, la production ovarienne est assez peu stimulée. Mais, avec les fractions elle est dans tous les cas inférieure à celle obtenue avec le groupe témoin qui n'est pas stimulé, et le pourcentage de ponte est toujours très faible. Nous remarquons, de plus, qu'avec les fractions solubles dans le chloroforme et le méthanol, elle est très basse (avec méthanol $m = 18,44$, avec chloroforme $m = 20,29$, la moyenne du témoin est de $31,74$). Cette différence est significative car la comparaison des moyennes donne des valeurs de t élevées (t méthanol = $3,06$, t chloroforme = $2,20$). Les autres moyennes obtenues avec extrait sont comparables au groupe témoin (tableau 25).

Avec la 2e série (tableau 26), nous constatons que l'extrait stimule peu l'oviposition et l'activité ovarienne. Pourtant il s'agit bien du même extrait déjà utilisé dans des conditions identiques (tableaux 1, 25). De surcroît, nous remarquons que la production ovarienne des témoins est extrêmement faible, le protocole suivi ne peut expliquer ce phénomène, car si elles sont mises à pondre à J₄, elles ne sont disséquées qu'à J₈, et à cet âge, même si l'ovogénèse n'est pas stimulée, il y a au moins une trentaine d'ovocytes en rétention.

De plus, il faut remarquer que le nombre de femelles utilisées est pour chaque série supérieur à trente, mais lors de la dissection, nous avons constaté que beaucoup n'étaient pas inséminées : nous n'avons pas tenu compte de ces dernières pour le calcul des moyennes. Nous voyons qu'il existe donc des incertitudes sur l'interprétation à donner aux résultats obtenus avec cette génération anormale à beaucoup d'égards.

Néanmoins, c'est la fraction soluble dans l'éther et le méthanol qui est active, elle est la seule à stimuler l'oviposition de sept femelles, dont la moyenne de ponte est de 12,28 oeufs. Les autres fractions n'ont pas d'effet significativement supérieur à celui du stimulus mécanique. Il faut souligner que nous retrouvons, malgré les réserves émises plus haut, des résultats comparables à ceux de la précédente manipulation. De plus, la production ovarienne des femelles n'est pas nettement stimulée. Enfin, nous ne relevons pas, dans cette expérience de valeurs significativement inférieures à celles obtenues avec les groupes témoins.

B. LE FRACTIONNEMENT DANS UNE AMPOULE A DECANTER

1. Méthodologie

Pour obtenir cet extrait (schéma n° 3), nous agitons 30 mn les graines (200 g) dans du chloroforme, nous récupérons

l'extrait et nous le remplaçons par un mélange eau-éther (1-1). Les graines sont agitées pendant 24 h dans ce nouveau solvant.

Nous récupérons le 2e extrait et nous le mélangeons au premier. L'extrait total est alors placé, après concentration, dans une ampoule à décanter. Nous lavons trois fois l'extrait avec du chloroforme et trois fois avec de l'éther.

Nous mélangeons la fraction soluble dans le chloroforme et celle soluble dans l'éther, cela forme la fraction grasse. Les solvants sont évaporés sous hotte ventilée. Après évaporation complète des solvants, nous reprenons par trois fois cette fraction par l'éther. Le résidu, non soluble dans l'éther, est repris par l'eau et replacé dans l'ampoule à décanter avec la fraction que nous appelons aqueuse.

Il est déjà apparu un trouble blanchâtre dans l'ampoule à décanter, nous l'accentuons par addition de méthanol. Puis nous séparons par centrifugation les deux fractions.

Ainsi, nous obtenons trois fractions :

- une fraction soluble dans le chloroforme et l'éther,
- une fraction soluble dans le mélange eau-méthanol mais qui est aussi soluble dans l'eau,
- une fraction insoluble dans l'éther, le chloroforme et le mélange eau-méthanol.

Nous testons l'activité de chaque fraction.

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans le tableau 27.

Seules les moyennes des pontes et des productions ovariennes des femelles en présence d'extrait ne sont pas significativement différentes de celles observées en présence de la graine et la moyenne corrigée du pourcentage de ponte est aussi significativement comparable. De plus, aucune des fractions ne stimule

la ponte ou l'activité ovarienne comme l'extrait. Mais, parmi les trois fractions, c'est la fraction aqueuse qui se révèle la plus active, bien que la moyenne des pontes (19,67) ne soit pas très importante. Et que l'étude de la répartition des pontes des femelles de ce lot (courbe 4) montre qu'en fait peu d'entre elles (13 sur 33 soit 39 %) ont dépassé la moyenne de ponte du lot qui est d'environ 20 oeufs.

La fraction grasse, elle, n'a qu'une faible activité sur l'oviposition des bruches. Quant à la fraction insoluble, son action semble négligeable bien que son rôle dans l'extrait soit peut-être important.

Avec ces trois fractions, même si la production ovarienne est stimulée, les valeurs moyennes sont toujours inférieures à celles observées en présence d'extrait complet.

Ainsi, aucune fraction n'induit la ponte et l'activité ovarienne comme l'extrait complet.

DISCUSSION

Quelle que soit la méthode de fractionnement, aucune des fractions n'est aussi active que l'extrait complet. Donc, en suivant ces méthodes, nous ne pouvons isoler une ou des substances stimulant la ponte et l'activité ovarienne comme le fait la graine, ce qui semble indiquer que c'est un mélange de substances qui est actif.

Parmi les fractions testées, la fraction chloroformique a une activité particulière. En effet, la moyenne des productions ovariennes des femelles en présence de cet extrait est significativement inférieure à celle des femelles en présence du papier avec solvant, phénomène d'autant plus singulier qu'il a été observé à plusieurs reprises (tableaux 7, 25, 32). Ces observations ne peuvent s'expliquer qu'en attribuant aux extraits un effet inhibiteur sur l'ovogénèse. Comme la femelle est mise en présence d'extrait chloroformique avant l'arrêt naturel de l'ovogénèse, le nombre d'ovocytes en rétention est donc plus important dans le lot témoin où l'ovogénèse "spontanée" se poursuit normalement jusqu'à J7, J8 que dans celui où les femelles sont mises en présence d'extrait.

Cette action est remarquable bien qu'elle ne soit pas systématiquement constatée. Seules des expériences complémentaires permettraient peut-être de vérifier cette hypothèse.

Au vu de ces résultats, nous pouvons supposer que la ponte de certaines femelles est stimulée par la fraction grasse ou par la fraction aqueuse. Donc différentes substances stimuleraient bien la ponte et les femelles seraient sensibles à l'une ou à l'autre. Pour vérifier cette hypothèse, nous pouvons placer la femelle d'abord en présence d'une fraction puis de l'autre et voir si avec cette méthode toutes les femelles pondent.

Mais si l'association de plusieurs substances est nécessaire pour stimuler la ponte et si certaines femelles sont plus sensibles à l'une qu'à l'autre, elles peuvent alors déposer des oeufs en présence d'une fraction mais elles ne pondent toutes

qu'en présence de l'extrait complet. Bien évidemment, nous pouvons aussi supposer qu'une partie des substances est perdue lors du fractionnement ; il faut donc tester les fractions séparément et les réunir ensuite pour vérifier qu'aucune information n'a disparu. Car les substances secondaires sont généralement présentes en quantité si faible que, s'il y a des pertes, elles se retrouvent dans la fraction en dessous du seuil de sensibilité de la bruche, ce qui expliquerait les réactions que nous obtenons.

II. POURQUOI N'OBTENONS NOUS PAS UNE FRACTION ACTIVE ?

A. LES SUBSTANCES STIMULANT LA PONTE SONT-ELLES DIFFERENTES SUIVANT LES FEMELLES ?

1. Méthodologie

Les femelles sont placées en présence de haricot, de papier avec solvant, d'extrait ou de la fraction grasse. Après deux jours d'expérience, nous comptons les oeufs pondus par les femelles et nous disséquons celles qui sont en présence de haricot, de papier et d'extrait. Par contre nous plaçons les femelles qui étaient en présence de la fraction grasse dans d'autres boîtes, en présence de la fraction aqueuse. Deux jours plus tard, nous comptons les oeufs qui sont pondus en présence de cette fraction et nous disséquons les femelles.

La manipulation est répétée avec des femelles de la même génération sur les mêmes papiers. Nous avons évidemment pris soin d'enlever les oeufs pondus avant de renouveler l'expérience.

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans les tableaux 28 et 29.

A nouveau, nous remarquons que les valeurs obtenues avec cette génération sont inférieures à celles observées avec les générations précédentes.

Comme seulement deux femelles témoins (dans les boîtes où il n'y a pas de stimulus) pondent et que la durée de l'expérience est assez courte, nous pensons que même si certaines femelles ont peu pondu en présence d'extrait, cela correspond néanmoins à une réaction à la stimulation chimique.

Seuls les résultats obtenus en présence d'extrait total sont comparables à ceux que donnent les femelles en présence de graine.

Mais, les moyennes de ponte en présence de la fraction grasse ou de la fraction aqueuse sont, pour la même génération bien différentes. Pourtant, les femelles étaient en présence du même stimulus puisque nous avons réutilisé les mêmes papiers. Et si les moyennes observées avec la 2e série peuvent faire penser que notre hypothèse est exacte, celles de la première série l'infirmement.

De plus, l'analyse de la répartition des pontes nous montre que 20 femelles sur 69 ne pondent sur aucun papier et que 17 pondent sur les deux papiers recouverts d'extrait. La fraction aqueuse qui provoque l'essentiel des pontes est peut-être celle qui contient les substances stimulant l'oviposition. Cependant, cette ponte peut être liée à la succession adoptée : les femelles étant plus âgées, elles pondent plus facilement. En tout état de cause, les valeurs des pontes sont faibles et la répartition ne correspond pas à celle que nous aurions dû observer si notre hypothèse avait été exacte.

Il faudrait peut-être présenter les différentes fractions en même temps et si possible au même endroit pour que la femelle soit stimulée. C'est ce que nous avons essayé de faire dans un second temps.

B. PLUSIEURS SUBSTANCES SONT ELLES NECESSAIRES ?

1. Méthodologie

L'extrait est obtenu à partir de 400 g de graines agitées dans du chloroforme pendant une demi-heure et ensuite dans un mélange eau-éther (1-1) pendant 24 h. L'extrait complet est fractionné par lavages successifs dans une ampoule à décanter.

La quantité déposée sur chaque papier correspond à environ 4 graines.

2. Résultats

Les résultats sont consignés dans le tableau 30.

Si l'extrait stimule peu la production ovarienne de cette génération, il stimule significativement la ponte.

Ni la fraction grasse, ni la fraction aqueuse ne stimulent autant la ponte que l'extrait. Par contre leur réunion est aussi active que ce dernier.

Donc, la ponte de la bruche est induite par plusieurs substances qui doivent être présentes ensemble sur le substrat pour que la ponte soit stimulée.

DISCUSSION

Plusieurs essais de fragmentation avec différents solvants démontrent que les fractions ont toujours une activité moins importante que l'extrait mais que leur réunion a une activité aussi importante sans atteindre celle de la graine. Donc, parmi les hypothèses élaborées, il semble bien que celle faisant appel à plusieurs substances agissant en même temps soit la plus vraisemblable. Mais il convient peut-être de moduler cette affirmation car nous avons bien remarqué que certaines femelles pondent en présence de l'une ou de l'autre des fractions.

Nous pouvons supposer que la méthode de fractionnement est d'autant moins efficace que le mélange est plus complexe. Aussi, une infime partie de chaque fraction serait-elle restée avec l'autre. Dans ces conditions, ces "impuretés", difficilement décelables à l'analyse pourraient stimuler certaines femelles ayant un seuil de sensibilité très bas. Cette hypothèse est étayée par des observations faites avec d'autres insectes lors de l'étude des facteurs volatiles de la plante hôte induisant un comportement, ou de phéromones.

Mais, des différentes manipulations, nous pouvons conclure que les deux fractions doivent être présentes pour que la ponte de toutes les bruches soit nettement stimulée. Pourtant, POUZAT et nous-même avons constaté que des extraits effectués avec seulement de l'éther, stimulent un peu la ponte. Donc, certaines des substances sont solubles dans l'eau et l'éther mais leur affinité pour l'eau est plus importante que pour l'éther.

Etant donné les propriétés et la complexité de ces substances, pour pouvoir les étudier, il faut suivre un protocole qui prenne en compte les particularités de leur action.

Nous pensons qu'il faut avoir des groupes témoins avec extrait et extrait "reconstitué" par réunion des fractions, et, qu'il faut bien évidemment tester la fraction isolée, séparément et en présence des autres. Dans ces conditions, les manipulations deviennent imposantes, le travail est ralenti par le très grand nombre de groupes que la complexité du phénomène nous oblige à utiliser.

III. ETUDE DE LA FRACTION GRASSE

A. LA FRACTION GRASSE DU HARICOT

Elle est surtout composée d'esters d'acides gras qui, d'après MONTE et MAGA (1980) tableau 31, ne sont pas particulièrement spécifiques. Nous trouvons des chaînes carbonées de C₁₆ à C₂₄ dont certaines ont des doubles liaisons. Il existe des monoglycérides, des diglycérides et des triglycérides. C'est peut être dans ces associations que l'on pourrait découvrir des molécules spécifiques, mais leur étude ne semble pas avoir été effectuée. Dans les analyses, nous remarquons la présence d'esters d'acides gras liés avec des alcools autres que le glycérol.

De plus, on décrit dans les fractions grasses provenant d'autres plantes que le haricot (MORDRET, 1971) des aldéhydes, des cétones, du carotène, des tocophérols et des stérols. C'est dans cette fraction que se trouvent souvent, à l'état de traces, les substances secondaires, et de tels corps doivent aussi exister dans la fraction grasse qui nous intéresse.

1. Méthodologie

Nous avons saponifié la fraction grasse pour isoler les acides gras des autres corps.

La méthode de saponification

Deux kilogrammes de haricot sont agités pendant 30 mn dans le chloroforme pur pour analyse à température ambiante. Le solvant est évaporé, sous hotte ventilée, et l'extrait est repris par du chloroforme à température ambiante. Le poids des substances solubles est de 0,31 g. L'extrait est chauffé sous reflux pendant 8 h dans la soude alcoolique (N/2). Nous versons la solution dans une ampoule à décanter, nous ajoutons une solution saturée en NaCl afin d'éviter les émulsions. Nous extrayons plusieurs fois au chloroforme. Ainsi nous récupérons la fraction insaponifiable. Nous acidifions et nous extrayons à nouveau au chloroforme. Nous

récupérons alors les acides gras libérés par la saponification.

L'utilisation des fractions

Nous suivons le protocole décrit au paragraphe précédent. Les fractions sont placées sur un papier où a été déposée la fraction aqueuse d'un extrait qui stimule significativement la ponte.

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans le tableau 32.

Pour des raisons pratiques, le nombre de femelles dans les groupes avec l'extrait complet et l'extrait chloroforme n'a pas pu être plus élevé. Mais les moyennes de ponte obtenues sont identiques à celles que nous avons obtenues dans des conditions comparables.

La fraction aqueuse est encore peu active. Quant au mélange fraction aqueuse - fraction chloroformique, il stimule la ponte comme la graine, ce qui confirme nos observations précédentes et souligne l'importance du protocole pour vérifier l'efficacité des extraits.

Mélangées à la fraction aqueuse les deux fractions, saponifiable et insaponifiable, stimulent bien la ponte comme l'indiquent les valeurs de t (tableau 33). Il est surprenant, après ce que nous avons constaté précédemment que les deux fractions soient actives. Mais nous voyons, en observant la valeur de la production ovarienne (tableau 32) que la fraction saponifiable stimule mieux la ponte des bruches que la fraction insaponifiable. De plus, l'examen de la répartition des pontes (graphes 5 et 6) nous indique qu'avec la fraction insaponifiable, 31 % des femelles pondent plus de 40 oeufs alors que 59 % des femelles en présence de la fraction saponifiable et 68 % des femelles en présence de haricot pondent plus de 40 oeufs. De surcroît, la courbe de répartition des pontes montre bien que les résultats obtenus

avec la fraction saponifiable sont plus proches des résultats obtenus avec la graine que des résultats obtenus avec la fraction insaponifiable, ce qui est confirmé par le pourcentage de ponte.

Mais la différence entre les deux groupes est moins évidente lorsqu'on s'intéresse à la production ovarienne (tableau 32, graphe 5). La moyenne est un peu plus élevée sans pour autant être significativement différente ($t = 0,82$). En outre, les courbes de distribution sont peu différentes.

Les incertitudes que l'on rencontre dans l'interprétation des résultats sont peut-être liées à la méthode de fractionnement employée. En effet, il se peut que la saponification qui détruit certains corps comme les chlorophylles et les pigments phénoliques (MORDRET, 1971), dégrade aussi les substances actives. C'est pourquoi, aucune des fractions n'agit comme l'extrait. Cependant, les deux fractions ayant une activité sensiblement comparable, on peut supposer qu'elles ont en commun un élément stimulant. Comme par la méthode utilisée, nous séparons les acides et les alcools qui ont la même chaîne carbonée, il est très probable que celle-ci est un des facteurs actifs.

En dépit de ces inconvénients, la fraction grasse est trop réduite pour envisager dans l'immédiat d'autres méthodes de fractionnement.

B. LA FRACTION GRASSE EST-ELLE SPECIFIQUE ?

Nous voulons vérifier si les molécules qui participent à la stimulation de l'activité reproductrice des bruches, en particulier celles solubles dans un solvant organique, se rencontrent communément chez les végétaux.

1. Méthodologie

Nous mélangeons à la fraction aqueuse déjà testée une huile du commerce. Nous avons choisi trois huiles de la marque "Lesieur", d'abord, de l'huile d'arachide, Légumineuse non

attaquée par la bruche du haricot mais par une autre espèce de bruche, de l'huile de maïs, de l'huile d'olive.

Nous avons procédé à deux manipulations, une en juin 1981 et une autre en juillet 1981.

2. Résultats et commentaires

Les résultats consignés dans les tableaux 34 et 35 sont représentés sous forme de graphes (courbes 7 et 8).

Comme la fraction grasse, l'huile d'arachide toute seule ne stimule pas l'activité reproductrice de la bruche (tableau 35). La fraction aqueuse, quant à elle, a toujours une légère influence sur la ponte. Mais le mélange de l'huile à la fraction aqueuse stimule toujours la ponte et l'activité ovarienne (tableau 35), moins que la fraction grasse, mais de façon importante malgré tout. De plus, il y a contradiction entre ces résultats et ceux du tableau 34 où nous remarquons que l'huile d'arachide remplace parfaitement la fraction grasse provenant du haricot. Cette variation des résultats doit, ici aussi, être liée à la bruche qui, en l'absence des stimuli naturels "complets", a un comportement variable suivant les générations.

Il semble bien que le "facteur lipidique" soit spécifique du haricot car aucune huile (tableau 36) ne permet d'avoir des résultats comparables à ceux obtenus en présence d'extrait ou de graine. Mais, il doit exister, dans ces huiles, des corps voisins car elles ont toutes augmenté significativement l'activité de la fraction aqueuse.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons penser qu'un ou plusieurs éléments, dont un acide gras, ont un rôle important dans la stimulation de l'activité reproductrice. Il faut souligner que nous ne pouvons étayer nos hypothèses et nos expériences par aucune référence car nous n'avons pas trouvé d'indications, dans la bibliographie, sur des corps non volatils et solubles dans le chloroforme, stimulant l'activité reproductrice d'un insecte.

IV : QUELQUES CARACTÉRISTIQUES DES SUBSTANCES EXTRAITES

L'analyse chimique a essentiellement été pratiquée sur des extraits stimulant l'activité ovarienne.

A. L'ANALYSE DES EXTRAITS

Les méthodes d'extraction utilisées mettent en solution de très nombreuses substances. Aussi leur étude a-t-elle d'abord été abordée en spectrométrie infrarouge.

1. La méthode

Les échantillons sont examinés sous forme de pastilles obtenues en comprimant un mélange de l'extrait complet (chloroforme 30 mn, eau-éther (1-1) 24 h) avec du K Br. Elles sont placées dans un spectrographe IR 457 Perkin Elmer. Nous étudions les enregistrements des spectres.

2. Les résultats

l'extrait complet présente les caractéristiques suivantes (fig. 5) :

- une large bande à $3200-3400\text{ cm}^{-1}$ due à la présence de nombreux groupements OH liés,
- une bande à $2880-2980\text{ cm}^{-1}$ qui indique que des groupements CH_2 et CH_3 sont présents,
- une bande à 1650 cm^{-1} qui correspond à l'absorption du groupement CONH_2 ,
- une bande à $1380-1390\text{ cm}^{-1}$ due aux groupements CH_2 , C-CH_3 ,
- une bande à 1240 cm^{-1} qui correspond au groupement COOH ,
- une bande à $1020-1080\text{ cm}^{-1}$ qui indique la présence des radicaux OH.

Ces spectres interprétés grâce aux ouvrages de BELLAMY (1975) et ZHBANKOV (1966) confirment la présence de très nombreuses substances et en particulier des protéines et des polysaccharides.

L'importance de ces molécules ne permet pas de distinguer la présence d'autres groupements comme le groupement NH_2 vraisemblablement dissimulé par les fonctions hydroxyles vers $3100, 3150 \text{ cm}^{-1}$.

A cause de ces difficultés, nous n'avons poursuivi nos analyses que sur des fractions et après purification.

B. L'ANALYSE DES FRACTIONS

1. Les phases solubles dans les solvants organiques

La fraction chloroformique participe à la stimulation de l'activité reproductrice. Les produits qui s'y trouvent sont plus purs que ceux solubles dans l'éther, bien que les solvants aient des propriétés assez proches.

Nous avons obtenu 0,31 g d'extrait à partir de 2 kg de haricots entiers. Le rendement qui est de 0,15 % est donc assez faible.

La composition centésimale

Après purification, la composition centésimale est la suivante :

- C : 77,1 %
- H : 16,0 %
- N : 0,0 %

et par différence, la proportion d'oxygène est de 6,9 %.

Donc, dans cette fraction il n'y a pas de composés azotés. Il n'est pas surprenant que les proportions se rapprochent de celles des cires (WILHEM, 1974), la cuticule étant recouverte de cires.

L'analyse spectroscopique

Les échantillons examinés en spectrométrie infrarouge présentent les caractéristiques suivantes (fig. 6) :

- une bande à 3300, 3400 cm^{-1} qui est liée à la présence de groupements hydroxyles (OH),
- des bandes à 2840 et 2920 cm^{-1} qui sont provoquées par des groupements CH_2 , CH_3 ,
- une bande à 1730, 1740 cm^{-1} liée à la présence de carboxyle d'esters aliphatiques,
- une bande à 1460 cm^{-1} liée à la présence de chaînes $(\text{CH}_2)_n$,
- une bande à 1380 cm^{-1} qui est provoquée par le groupement $\text{CH}_3 - \text{C}$,
- une bande à 1260 cm^{-1} qui indique aussi la présence de groupements CH,
- une bande à 1170-1180 cm^{-1} qui marque la présence de liaisons C-O, ou de liaisons P-O,
- une bande à 720, 730 cm^{-1} qui est caractéristique des groupements CH_2 , lorsque la chaîne $(\text{CH}_2)_n$ contient n supérieur à 4.

Ces absorptions confirment la présence de composés lipidiques à longue chaîne.

Le spectre obtenu à partir d'une fraction soluble dans l'éther est assez comparable.

Seules de nombreuses bandes entre 1175 cm^{-1} et 1460 cm^{-1} dénotent l'existence de composés ayant des groupements particuliers, peut-être des liaisons P=O ou P-O-C.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPV)

Comme nous l'avons précédemment décrit, après avoir saponifié la fraction grasse, nous séparons la phase dont les

molécules ont un caractère acide (fraction saponifiable) et d'autre part, la fraction insaponifiable.

Les deux phases sont étudiées en chromatographie en phase gazeuse (CPV) par injection directe sur colonne capillaire en silice fondue de 25m de long. Comme phase stationnaire, on utilise la silicone OV 101 car elle permet d'obtenir de bons chromatogrammes avec les esters méthyliques d'acides gras et les éthers triméthyl silylés des alcools gras et des stérols. Un intégrateur électronique Intersmat ICR 1 permet d'obtenir le pourcentage de chaque constituant. Nous avons obtenu la séparation des termes de C₉ en C₃₄.

Avec la fraction saponifiable, nous observons la présence de nombreux corps dont les principaux ont été identifiés. Nous notons la présence de corps en :

- C₉, l'acide pélargonique, à l'état de trace,
- C₁₂, l'acide laurique à l'état de trace,
- C₁₄, l'acide myristique à l'état de trace,
- C₁₆, l'acide palmitique dans la proportion de 3,32 %,
- C₁₈, les acides linoléique, oléique et linoléique dans la proportion de 2,91 %,
- C₁₈, l'acide stéarique dans la proportion de 5,52 %,
- C₂₀, l'acide arachidique dans la proportion de 5,80 %,
- C₂₂, l'acide bœhénique dans la proportion de 4,16 %,
- C₂₄, l'acide tétracosanoïque dans la proportion de 9,40 %,
- C₂₆, l'acide céroïque dans la proportion de 10,75 %,
- C₂₈, l'acide octacosanoïque dans la proportion de 4,13 %.

De nombreux corps n'ont pas été identifiés. De plus, le chromatogramme, fig. 7, montre qu'il existe, à l'état de trace d'autres acides gras.

Avec la fraction insaponifiable, nous obtenons essentiellement des alcools en C₁₆, C₁₈, C₂₀, C₂₂, C₂₄, C₂₆, C₂₈ en quantité appréciable ainsi qu'un groupe de stérols (fig. 8).

Nous remercions M.J.C.WILHEM qui a effectué l'analyse en CPV.

Il faut noter la présence d'alcools à poids moléculaire élevé. Nous notons aussi la présence d'une quantité importante de stérols (18 %) qui sortent à la fin du chromatogramme.

Ces résultats confirment en partie ceux de MONTE et MAGA (1980). S'il existe des différences, elles sont liées à la fraction étudiée : ils ont étudié la fraction grasse de toute la graine tandis que nous, nous n'avons pris en compte que la fraction grasse présente à la surface de la graine. De plus, les méthodes employées ne sont pas tout-à-fait comparables.

Cette analyse met en évidence la diversité des substances présentes mais ne permet pas de déceler de molécules qui n'aient été rencontrées chez d'autres végétaux (tableau 37).

2. Les phases solubles dans l'eau

a. Après une extraction acide (HCl, 0, 1N)

Les haricots sont agités dans le chloroforme pendant une demi-heure puis dans un mélange éther-acide (1-1) pendant 24 heures.

L'extrait obtenu est lavé trois fois par le chloroforme et trois fois par l'éther dans une ampoule à décanter.

a.1. Les caractères généraux

En spectrométrie de flamme, on distingue du Calcium, du Potassium, du Sodium.

Avant destruction sulfonitrique il y a 1 % de phosphore, et après, 2,2 %.

Le dosage par NaOH à 0,5 N montre une faible acidité libre, 48 meq % g.

Nous notons que le réactif de BOUCHARDAT, réactif général des alcaloïdes, donne une réaction positive.

a.2. La composition centésimale

Plusieurs analyses ont été pratiquées, les résultats indiqués en pourcentage sont les suivants :

C	H	N
29,8	5,3	3,9
29,3	5,3	3,9
30,4	5,3	3,2
29,3	5,2	3,2

Les résultats sont constants. On note la présence d'azote et une proportion de carbone plus faible que celle trouvée dans la fraction grasse. Cette composition ne correspond ni à une composition moyenne de protéine ni à une composition moyenne de sucre. Elle montre bien que la fraction est composée de plusieurs corps de nature différente.

a.3. Etude du spectre infrarouge

Cette fraction est trop complexe pour que le spectre soit interprétable. Aussi a-t-elle été fractionnée.

Le produit, soluble dans l'eau, qui a un pH initial voisin de 4,5, est acidifié avec HCl 0,5 N. A pH 3 nous observons un précipité, il est recueilli pour analyse. Puis la fraction est neutralisée par NaOH 0,1N. Nous observons un précipité important lorsque le pH est de 7. Il est isolé. Lorsqu'on introduit du méthanol dans le surnageant, nous observons une floculation importante. Nous le séparons du surnageant. C'est dans ce

dernier que restent d'ailleurs les molécules les plus actives.

Nous analysons donc les quatre fractions ainsi obtenues :

- La fraction précipitée à pH 3 (fig. 9).

Les principales bandes d'absorption sont les suivantes :

- entre 3200 et 3450 cm^{-1} une bande indique la présence de groupements hydroxyles,
- une bande d'absorption à 2850-2950 cm^{-1} montre qu'il y a des groupements CH_2 et CH_3 ,
- une légère absorption à 2350 cm^{-1} montre qu'il existe des groupements NH_3^+ ,
- une bande à 1620 cm^{-1} indique la présence de groupes CONH_2 ,
- une bande à 1520 cm^{-1} indique la présence de groupements CONH ,
- une large bande à 1400 cm^{-1} démontre qu'il existe un groupement COO^- ,
- l'absorption à 1040-1060 cm^{-1} est due aux groupements OH.

- La fraction précipitée à pH 7 (fig. 10).

Nous remarquons principalement :

- une large bande à 3250-3450 cm^{-1} montre la présence de groupements OH,
- une bande à 2920 montre qu'il existe des CH, mais en quantité peu importante,
- une bande importante à 1620-1650 cm^{-1} marque la présence de groupes NH_2 ,
- une bande à 1400 cm^{-1} marque l'existence du radical COO^- ,
- une bande à 990-1020 cm^{-1} montre la présence de groupements OH,
- une bande à 830-860 cm^{-1} montre la présence de groupements NH_2 .

Il existe entre ces deux fractions une certaine similitude. Les spectres sont comparables à ceux d'une albumine témoin (fig. 11) et les groupements mis en évidence confirment ces ressemblances. Les substances recueillies sont essentiellement des protéines.

- La fraction précipitée par le méthanol (fig. 12).

Le spectre montre les caractéristiques suivantes :

- une très large bande à 3300, 3550 cm^{-1} qui montre l'existence de groupements OH,
- une bande à 1650 cm^{-1} qui indique la présence de groupements CO,
- une large bande à 1000-1100 cm^{-1} qui indique la présence de nombreux groupes OH.

Ce spectre, comparable à celui de l'amidon témoin (fig. 13), indique que cette fraction contient essentiellement des polysaccharides. Il peut s'agir de substances amylacées, comme des celluloses, des hémicelluloses ou des glucides.

- La fraction soluble résultante.

Le spectre IR montre quelques groupements (fig. 14) :

- une bande à 3200-3500 cm^{-1} qui indique la présence de groupes OH,
- une bande à 2880-2960 montre les groupements CH_2 , CH_3 ,
- une bande assez large à 1580-1650 cm^{-1} montre les groupes CONH_2 ,
- une bande à 1380-1420 cm^{-1} indique qu'il y a des groupes $\text{CH}_3\text{-C}$,
- une large bande 1020-1090 cm^{-1} montre de nombreux groupes CO et OH.

Donc ce spectre apporte peu de précisions car il s'agit d'un mélange complexe où se trouvent encore des protéines, des polysaccharides et sûrement d'autres molécules.

a.4. L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les déplacements chimiques δ exprimés en ppm sont mesurés par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence.

Nous voyons (fig. 15) un pic peu important de 1,0 à 1,25 ppm qui montre l'existence de radicaux $\text{CH}_3\text{-CH}_2$.

Il y a un pic très net à 1,9 ppm qui est dû au groupement $(\text{CH}_3)_2 = \text{N}$ ou $\text{CH}_3 \text{CN}$. Le groupe $\text{CH}_3\text{-C}$ provoque le pic observé à 2,40 ppm et le groupe $\text{CH}_3\text{-O-C=O}$ ceux observés à 4,20 ppm.

a.5. Existe-t-il, dans l'extrait, des lécithines ?

Comme seuls certains des extraits qui présentent une mousse importante lors de la filtration et de la concentration ; stimulent l'activité reproductrice des bruches, nous avons pensé que cette manifestation pouvait être liée à la présence d'un corps stimulant l'activité des bruches. Comme en dehors des protéines (SATHE et SALUNKHE, 1981), et des saponines (APPLEBAUM et BIRH, 1979) la lécithine provoque un tel phénomène, nous avons cherché à la caractériser.

La composition centésimale de la lécithine est :

C : 65 % ; O : 22,6 % ; H : 6,84 % ; N : 1,65 % et P : 3,77 %

Non seulement cette composition est théorique, mais encore, s'il y a de la lécithine dans l'extrait elle est mélangée à d'autres corps. Aussi, ne retrouverons nous pas des pourcentages identiques en analysant les fractions, cependant, nous pouvons retenir de ces chiffres l'importance du phosphore qui se trouve précisément en quantité non négligeable dans les fractions analysées.

Dans le spectre de la lécithine les bandes d'absorption à 1090, 1175 et 1245 cm^{-1} indiquent la présence de liaisons $\text{P} \begin{smallmatrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{smallmatrix}$, P-O-C et $\text{O} \begin{smallmatrix} \diagup \text{P} \\ \diagdown \text{O} \end{smallmatrix} = \text{O}$. Celles-ci sont parfois présentes sur les spectres de la fraction grasse (fig. 6) mais si elles existent sur les spectres de la fraction aqueuse, elles sont dissimulées par d'autres groupements. Donc il n'est pas impossible que de la lécithine soit présente dans les différentes fractions, en particulier dans la fraction aqueuse.

De plus, dans le spectre RMN de la fraction aqueuse (fig. 15) un groupement $\text{CH}_3\text{-O-P} = \text{O}$ donnerait un pic entre 3,40 et 4,20 ppm. Il est en effet observé, mais comme ce pic peut aussi être provoqué par le groupe $\text{CH}_3\text{-O-P} = \text{O}$, il n'est pas possible de confirmer la présence du groupe $\text{CH}_3\text{-O-P} = \text{O}$, mais nous ne pouvons en aucun cas l'infirmier. De surcroît, dans le spectre, nous ne voyons pas de pic massif vers 0,85 ppm, caractéristique de chaînes composées de nombreux atomes de carbone, et les pics observés

vers 1,2 ppm ne sont pas assez importants.

Enfin, nous avons vu que les réactifs des alcaloïdes donnaient une réaction positive : mais le précipité obtenu, après purification et analyse, a donné une réaction négative, ce qui nous force à conclure à l'absence d'alcaloïdes.

Cependant, la lécithine précipite avec le réactif de BOUCHARDAT, et il est possible que ce soit une fois de plus cette substance qui ait donné une réaction positive avant purification des précipités.

Ainsi, les méthodes classiques d'analyse, si elles ne démontrent pas l'existence de lécithine, n'infirment jamais cette hypothèse. Mais nous pouvons penser que cette molécule doit être en partie dégradée lors de l'extraction et que les chaînes aliphatiques, en particulier, sont séparées du reste de la molécule, ce qui explique la présence de phosphore dans la fraction aqueuse alors que la lécithine est insoluble dans l'eau.

Donc, ce résidu qui tend à donner un vernis par dessiccation contient des acides aminés, des protéines, des matières amylacées partiellement dégradées et d'autres substances. En outre, la présence de lécithine, en petite quantité, est plausible bien que la présence d'eau au cours de l'extraction diminue la solubilisation de cette dernière et qu'on ne retrouve jamais dans les spectres de la fraction aqueuse de chaîne $(CH_2)_n$.

b. Après extraction dans la soude

L'extrait se dégrade rapidement. Il semble que se dégagent des amines grasses dont l'odeur est caractéristique.

En présence d'éther, il se forme une énorme émulsion qui est brisée par le méthanol.

b.1. Etude de l'extrait

- L'observation des spectres RMN et infrarouge n'apporte rien de plus à ce qui a été observé avec une extraction acide.

- Les réactifs des alcaloïdes donnent une réaction positive, mais cela doit correspondre à une substance azotée non alcaloïdique : le précipité obtenu avec le réactif de BOUCHARDAT en milieu légèrement acide, est dissous dans la soude et ne réapparaît plus après élimination de l'iode en excès par le thiosulfate, lorsqu'on repasse en milieu acide. Donc la réaction observée montre bien que s'il n'y a pas d'alcaloïde, il peut exister de la lécithine.

b.2. Le fractionnement

Nous séparons encore facilement des fractions au caractère protéique ou amylicé, mais celles-ci ne stimulent en aucune façon la bruche.

De plus, leur analyse ne fait apparaître aucune particularité notable.

Donc, si l'extraction sodique est plus complète, l'extrait n'est pas stable, le pH basique déterminant une désamination même à froid (+ 2°C). Cette réaction se produit sans doute au dépend des aminoacides ou peut-être des lécithines.

c. Après extraction par l'eau

Cet extrait est assez peu stable, même à froid, et nous avons même pu observer le développement de moisissures.

c.1. L'analyse de l'extrait

L'étude des spectres RMN et infrarouge ne permet pas de trouver des particularités qui n'auraient pas été observées avec l'extrait effectué en milieu acide.

c.2. Le fractionnement

Nous isolons des fractions présentant les mêmes caractéristiques que celles déjà étudiées.

Donc cet extrait peu stable, car il se dégage assez facilement des amines grasses, ne montre pas dans sa composition de particularités par rapport aux autres extraits.

Les différentes méthodes d'analyse utilisées ont permis de mettre en évidence de très nombreuses caractéristiques des corps étudiés. Parfois les renseignements ne sont pas très précis car les méthodes utilisées ont leurs limites. En effet, si nous possédons des indications sur la nature des facteurs présents dans la fraction grasse, nous ne possédons que quelques indications sur les groupements des substances dissoutes dans l'eau mais aucune indication précise sur la nature des facteurs recherchés.

Afin de pouvoir améliorer notre connaissance des substances, il faut faire appel à d'autres méthodes. Mais elles ne peuvent être utilisées qu'avec des solutions assez purifiées, d'où la nécessité d'affiner le fractionnement de l'extrait. Cette purification doit être accompagnée de vérifications biologiques pour garder tout son intérêt.

DISCUSSION

Nous avons mis en évidence dans ce chapitre la complexité du système régulant l'activité reproductrice de la bruche. On aurait pu s'attendre à découvrir un stimulus plus simple dans la mesure où, lorsque la femelle le perçoit, elle est déjà en contact avec la plante et que l'étude du comportement d'autres insectes (*Pieris brassicae*, *Plutella maculipennis*, *Hylemya antiqua*) a permis d'établir, assurent les auteurs des publications, que la ponte est stimulée par une seule substance, un glucosinolate. Mais nous pouvons remarquer que ces insectes là sont guidés vers la plante par des substances volatiles, parfois identifiées (THORSTEINSON, 1953 ; MATSUMOTO et THORSTEINSON, 1968 ; WEARING et Coll., 1973 ; VERNON et Coll., 1977 ; PIERCE et Coll., 1978 ; HAMILTON et Coll., 1979 ; WALLBANK et Coll., 1979). Donc, la stimulation gustative n'intervient qu'après une stimulation qui induit non seulement l'attraction mais aussi parfois l'ovogénèse (HILLYER et THORSTEINSON, 1969 ; FENEMORE, 1979). Dans ces conditions, la comparaison du comportement de la bruche et de celui de ces insectes n'est sans doute pas probante. De plus, leurs plantes hôtes sont des Crucifères, végétaux à la chimie spécifique, bien différente des Légumineuses auxquelles les bruches sont généralement inféodées. Il ne serait donc pas surprenant que ce soient d'autres mécanismes physiologiques qui aient rendu possible la coévolution de la bruche avec ses plantes hôtes et qui aient permis sa réussite.

Néanmoins, diverses observations (POUZAT, 1974 ; JARRY, 1981) laissent à penser que la bruche pourrait être sensible à certaines substances volatiles plus ou moins spécifiques provenant du haricot, les données sur ce sujet ne sont pas suffisantes pour aboutir à des certitudes.

Afin d'expliquer certains des mécanismes de la régulation, nous devons fractionner l'extrait actif. Ce travail ne peut être guidé par aucun protocole rapporté par les ouvrages de chimie, car la plupart des méthodes préconisées sont élaborées pour isoler une molécule connue. Or nous ne connaissons pas la nature

de ce que nous cherchons à isoler. C'est pourquoi il est nécessaire de se référer à des travaux guidés par une démarche expérimentale similaire à la nôtre (DYER et SEABROOK, 1978 ; PIERCE et Coll., 1978 ; WALLBANK et WEATLEY, 1979 ; HAMILTON et Coll., 1979 ; MARSHALL et coll., 1979 ; GIROLAMI et Coll., 1981). Mais les publications ne décrivent que les méthodes spécifiques qui ont abouti à des résultats concluants et passent sous silence l'ensemble de la démarche suivie et ses tâtonnements.

Pour notre part, malgré les méthodes simples de fractionnement que nous avons utilisées, nous nous heurtons à de nombreux problèmes d'interprétation, qui, comme nous l'avons déjà dit précédemment, peuvent avoir des causes multiples. Le principal écueil, à nos yeux, est la complexité du stimulus qui jusqu'ici n'a pas été remarquée à propos de facteurs uniquement gustatifs.

Malgré cela, il est possible de présumer la nature des facteurs. En effet, une partie du stimulus est soluble dans le chloroforme et l'autre dans l'eau.

Nous pouvons dès l'abord remarquer que ces propriétés s'accordent en partie avec celles des constituants de l'épicuticule ; à savoir qu'elle est essentiellement formée de cristaux de nature lipidique solubles dans le chloroforme. Il est bien évident que la position occupée par ces molécules les prédisposait à jouer un rôle dans la reconnaissance de la plante par l'insecte pour autant que leur nature et les mécanismes physiologiques potentiels le permettent. En revanche, dans la bibliographie il n'est pas fait état de substances solubles dans l'eau, soit qu'elles fassent partie des molécules négligées par les chimistes, soit que lors de l'extraction leurs propriétés soient modifiées, à moins qu'elles ne proviennent de la cuticule. Nous pouvons malgré tout, souligner une fois encore, que la structure de la cuticule des graines a été peu étudiée et que leur physiologie l'a été encore moins, ce qui suffit à expliquer notre ignorance au sujet de telles molécules.

Pourtant, il est possible, après les analyses chimiques de cerner la nature des substances stimulant l'activité reproductrice de la bruche.

Comme le facteur lipidique est présent dans les deux fractions, saponifiable et insaponifiable, il peut être formé d'une chaîne carbonée terminée par un radical alcool ou acide, cette chaîne sous ses deux formes aurait des propriétés stimulantes comparables. Mais nous n'éliminons pas une hypothèse plus complexe selon laquelle la molécule comporterait plusieurs chaînes carbonées dont la combinaison produirait l'activité (MARSHALL et Coll., 1979). Nous ne rejetons pas non plus la possibilité que la spécificité provienne de la présence de liaisons insaturées qui confèreraient à la molécule son activité. Dans ce cas, sa caractérisation et son isolement serait problématique.

Quant au second facteur, hydrosoluble, nous ne possédons que quelques données à son sujet. Il n'est pas volatil et ne précipite pas, du moins aux différents pH utilisés. De plus, les spectres nous laissent à penser qu'il peut s'agir d'une protéine, d'un polysaccharide, d'une glycoprotéine ou d'une molécule aux caractéristiques voisines.

Etant donné la nature lipidique d'un des facteurs au moins, nous sommes en droit de nous demander, comme POUZAT (1978) 'comment sont perçues des substances sèches et insolubles dans l'eau'.

Au vu de différentes descriptions, nous pouvons affirmer que la salive imprègne l'extrémité des palpes qui sont fréquemment en contact avec la plante et où se trouvent les récepteurs (SZENTESI, 1976 ; POUZAT, 1970, 1978). Cette donnée, bien qu'elle ne résolve pas la question de la solubilité permet de connaître le milieu dans lequel se trouvent les substances. Mais, après concentration, l'extrait complet ne forme qu'une phase, qui est aqueuse, les solvants organiques étant évaporés. Pourtant un lavage par le chloroforme permet d'isoler des substances grasses, insolubles dans l'eau, celles-ci sont donc en suspension dans l'eau. Ce phénomène peut être favorisé par des substances, comme des lécithines, qui par ailleurs provoquent la formation

d'une importante quantité de mousse. Il n'est donc pas impensable qu'il existe, à la surface de la graine, des substances qui favoriseraient la mise en suspension de ces facteurs, d'autant plus que la salive peut contenir des molécules, comme des enzymes ou même des lécithines qui peuvent accentuer ce phénomène.

Pour ce qui concerne le facteur soluble dans l'eau, sa mise en suspension semble pouvoir se produire facilement dans la salive, son détachement de la cuticule est moins explicable, à moins qu'il ne soit facilité par certaines enzymes.

Les manipulations effectuées amènent à conclure que les facteurs, pour être actifs, doivent agir ensemble, cette observation n'éclaire pas leur mode d'action mais laisse présager d'un mécanisme de régulation de l'activité reproductrice particulièrement complexe.

CHAPITRE III

*Quelques données relatives aux régulations de
l'activité reproductrice*

Nous avons montré la complexité de la régulation chimique de l'activité reproductrice mais nous n'avons pas mis en évidence, avec l'extrait ou ses fractions, de régulation spécifique à chacune des étapes. Pourtant POUZAT a montré, par d'autres méthodes, que l'activité ovarienne et l'oviposition semblent soumises à des régulations différentes. Aussi avons-nous essayé, à partir des extraits de la plante hôte, de retrouver ces observations.

A côté de l'oviposition et de l'activité ovarienne, nous avons également pris en considération la perforation de la gousse car ce phénomène fait aussi partie de l'activité reproductrice et est aussi induit par des substances (MONGE, 1979).

De plus, à partir d'un même protocole nous avons observé des réactions différentes et nous avons essayé de vérifier si cette différence de comportement était liée à la sensibilité des femelles ou à la complexité des régulations.

I. EXISTE-T-IL UNE REGULATION DE CHACUNE DES ETAPES DE L'ACTIVITE OVARIENNE ?

A. LA PERFORATION DES GOUSSES DE LA PLANTE HÔTE

Lorsque la gousse n'est pas déhiscente, la femelle pratique une perforation, souvent sur la ligne de suture dorsale du carpelle (LARSON et FISCHER, 1938 ; LABEYRIE, 1962). Ce comportement permet à la bruche de déposer ses oeufs près des graines, comme le font généralement les Acanthoscelides (JOHNSON, 1981). Ce comportement de perforation a été observé sur des gousses de *Phaseolus vulgaris*, mais également sur des gousses de *Phaseolus lunatus* (STAMOPOULOS, 1980). Par contre, nous n'avons jamais observé de perforation de papier filtre non imprégné d'extrait.

1. Observation du comportement de quelques femelles en présence de gousse

Nous avons placé des femelles inséminées sur des gousses de *Phaseolus vulgaris* et nous avons constaté que toutes les gousses présentées, bien que sèches et non déhiscentes, ne sont pas perforées. Si certaines le sont plusieurs fois (trois au maximum dans nos observations), d'autres ne le sont pas, même si la femelle reste plus d'une semaine en présence de la gousse.

En outre toutes les perforations ont été pratiquées sur la ligne de suture dorsale.

Bien que ces observations effectuées en laboratoire sur une dizaine de gousses ne soient certainement pas représentatives des comportements pouvant être observés dans la nature, il en ressort que certaines femelles ne perforent pas les gousses de haricot. STAMOPOULOS a d'ailleurs constaté le même phénomène lorsqu'il a mis des bruches en présence de gousses de *Phaseolus lunatus*.

2. Le comportement des femelles en présence de graines

Pour des raisons pratiques, déjà exposées, nous travaillons avec des graines. POUZAT (1978) a déjà constaté qu'au fond des boîtes, on observe assez souvent des particules blanchâtres. Celles-ci proviennent de la graine et sont détachées de la zone du hile, par la femelle. Nous avons pu constater qu'elle peut dégager cette zone jusqu'à ce que les cotylédons soient bien visibles. A ce stade, si l'espace entre les deux cotylédons est suffisant, elle peut y introduire son ovitube et pondre. Donc le comportement de la femelle en présence de la graine qui est bien comparable à celui décrit en présence de la gousse n'est pas un comportement alimentaire.

Nous avons dénombré les graines ainsi attaquées. Mais, il faut souligner que l'observation est délicate car si la bruche n'a prélevé qu'un ou deux fragments, c'est difficilement décelable. Aussi, les informations que nous donnons ne rendent-elles pas exactement compte de l'importance du phénomène, mais comme toutes les observations sont faites dans les mêmes conditions, les résultats peuvent néanmoins être comparés. De plus, il ne nous a pas été possible de classer les attaques en fonction de leur importance.

Nous avons essayé d'établir la proportion de graines attaquées et ses variations en fonction de la durée de l'expérience.

Les résultats sont consignés dans le tableau 38 et sont transcrits sur la courbe 9.

Malgré une certaine variation de la proportion de graines attaquées, il n'y a pas de différence notable. Par exemple, pour une durée de trois jours nous obtenons 28,12 % et 23,52 %. Donc, environ un quart des graines est attaqué.

Mais si nous étudions la courbe, nous constatons que les valeurs sont proches bien que les deux observations ponctuelles, de fin juin 1981 et fin juillet 1981 en soient éloignées. Pour une même génération, il y a pour un temps de plus en plus long, un nombre plus ou moins important d'attaques. Il n'y a pas de relation entre le nombre d'attaques et la durée de l'expérience.

Ces différentes observations ne peuvent être expliquées que si seul un nombre faible et variable de femelles (17 à 35 %) est stimulé et attaque les graines, sans qu'au fil des jours les stimulations se cumulent et induisent un comportement de perforation chez la plupart des femelles.

Si la graine induit bien le comportement de perforation comme la gousse, seule une fraction des femelles en expérience est stimulée, mais nous ne savons pas si, chez les femelles non stimulées, ce comportement serait induit par une autre graine ou si, quel que soit le stimulus, le comportement ne serait jamais induit. L'expérience consistant à placer la femelle qui n'a pas attaqué la graine sur une autre graine ne résoudra pas le problème car, du fait de son évolution physiologique, ses réactions n'auraient plus les mêmes origines et son comportement ne pourrait donc être comparé au précédent.

3. Le comportement des femelles en présence d'extrait de la plante hôte

a) Les perforations et la ponte

Nous avons déjà décrit le comportement de perforation de la bruche (MONGE, 1979). Nous savons que certaines femelles se contentent de dégager quelques fibres sans achever la perforation et que d'autres, en revanche, perforent complètement le papier et déposent leurs oeufs soit sur la lame qui est sous la perforation soit contre le papier.

Nous avons remarqué que la plupart du temps, la forme des perforations est variable. Souvent circulaires, elles peuvent être ovales ou très allongées.

Les perforations circulaires ont été pratiquées en tirant sur les fibres. Mais lorsque la fente est allongée la bruche semble avoir coupé les fibres avant de les dégager, car les bords sont nets et les morceaux de fibre se retrouvent au fond de la boîte.

Nous avons émis l'hypothèse (MONGE, 1979) que la différence de forme entre les perforations des gousses et celles des papiers était liée à la structure des substrats.

Mais cela ne se vérifie pas car les femelles font aussi, dans le papier, des perforations allongées. Il faudrait rechercher d'autres causes à cette différence de comportement qui n'est peut-être liée qu'à une variation locale de la structure du papier.

De plus, il n'est pas rare de trouver plusieurs perforations sur un même papier. Nous avons compté jusqu'à huit perforations effectuées par la même bruche en sept jours sur le même papier. N'ayant pas de données relatives à un tel comportement sur la gousse, nous ne savons pas s'il se produit.

Si les perforations sont souvent effectuées sur la zone la plus plate du papier, nous en trouvons aussi dans la partie pliée. Donc, la topographie du papier support n'est pas déterminante dans le choix du lieu de perforation.

Pourtant sur la gousse, les perforations sont essentiellement observées sur la suture dorsale. D'autres facteurs que ceux présents sur le papier doivent donc guider la bruche dans le choix de la zone à perforer.

b) Les pourcentages d'attaques

Nous avons étudié, pour des durées d'expérience plus ou moins longues, le pourcentage d'attaques. Ces observations, répétées sur plusieurs générations, ont été effectuées avec des femelles inséminées et des femelles vierges pour déterminer si ce

comportement est spécifique des femelles inséminées.

Nos observations sont regroupées dans le tableau 39 et les résultats transcrits dans les courbes 10 et 11.

Avant d'aller plus loin dans la discussion, il faut souligner que le pourcentage d'attaques est plus élevé en présence d'extrait qu'en présence de graine. C'est peut-être lié à la difficulté, que nous avons signalé de repérer toutes les attaques de la graine, à moins qu'une plus grande concentration de substance sur le papier induise un plus grand nombre d'attaques. De plus chez les femelles inséminées de la souche "normale", le nombre de perforations est toujours inférieur au nombre d'attaques non menées à leur terme, alors que chez les femelles inséminées de la souche "sauvage" le rapport est inversé. Donc le stimulus de perforation n'est pas spécifique à la souche "normale" et certaines souches semblent avoir une sensibilité plus élevée que d'autres, à ce stimulus.

La courbe 10 suggère que le pourcentage d'attaques, en présence d'extrait, croît avec le temps. Mais cette progression n'est pas évidente lorsqu'on étudie la courbe 11. De surcroît lorsque nous regardons les différentes valeurs de l'intervalle de confiance, et les résultats obtenus en présence du stimulus naturel, nous constatons qu'il n'y a pas ou peu de progression du pourcentage d'attaques avec le temps.

Donc il ne semble pas y avoir de relation entre le nombre d'attaques et la durée de l'expérience mais d'autres études paraissent nécessaire pour confirmer ces premières observations.

Contrairement à ce que POUZAT (1978) a précédemment constaté avec des femelles vierges de la souche "normale" mises sur gousses sèches, non seulement les femelles vierges perforent les papiers mais encore elles les perforent dans une proportion bien plus élevée que les femelles inséminées.

Ce comportement n'est donc pas lié à un état physiologique particulier créé par l'insémination ni à l'oviposition car ces femelles ne pondent pas et de plus la production ovarienne de ces femelles, ($m = 33,4$) n'est pas significativement différente de celle du groupe témoin sans stimulus ($m = 28,93$; $t = 1,38$).

Mais en revanche, parmi toutes les femelles inséminées ayant perforé un papier, une seule n'a pas pondu, ce qui est peut-être lié à des malformations anatomiques que nous n'avons pas décelées.

Bien que toutes les femelles ne perforent pas les papiers, nous retrouvons parmi celles qui le font des femelles vierges et inséminées. Donc nous pouvons affirmer que ce comportement n'est pas en relation directe avec la fécondation, mais seulement avec la présence de la plante hôte. Comme d'un autre côté les femelles inséminées qui perforent pondent, nous pouvons en déduire que le comportement de perforation induit celui de ponte, lorsque les conditions physiologiques le permettent.

4. La nature chimique des substances stimulant la perforation

Nous désirons déterminer si la perforation est stimulée par une substance spécifique.

Dans ce but, nous n'avons pas effectué de fractionnement particulier des extraits, mais nous avons noté le comportement des femelles sur les papiers imprégnés des différentes fractions. De plus, après avoir séché les graines utilisées pour faire les extraits, nous les avons présentées aux femelles.

Les observations sont consignées dans le tableau 40.

Les papiers, où nous avons déposé un extrait complet ou plusieurs fractions, sont les plus attaqués. Parmi les mélanges, c'est celui de la fraction aqueuse avec la fraction saponifiable qui est le plus actif. Donc la stimulation de la perforation s'avère complexe.

Par contre, l'extrait (eau-acétone) qui ne stimule pas ou peu la perforation (tableau 40) stimule très bien l'oviposition et la production ovarienne. Donc un facteur stimulant, spécifique de la perforation, paraît peu soluble ou insoluble dans le mélange eau-acétone.

Nous remarquons également que, lorsque la fraction est peu active, les bruches qui ont perforé le papier ont pondu, mais la moyenne de ponte et de production ovarienne (tableau 41) de ces femelles qui perforent et pondent n'est pas, à une exception près, très différente de la moyenne de ponte de l'ensemble du lot.

Donc, la ponte de ces femelles n'est pas la conséquence d'une sensibilité et d'une réaction plus importante à une stimulation de l'oviposition.

Mais, pour les femelles qui perforent, aux stimulations chimiques de la ponte s'ajoutent des stimulations mécaniques. En effet, lors du percement, la femelle essaie à de nombreuses reprises d'enfoncer l'ovipositeur dans la perforation, probablement pour se rendre compte des possibilités de ponte. Les nombreuses stimulations mécaniques provoquées par cette activité peuvent alors provoquer la ponte (POUZAT, 1975). Ces dernières, qui sont de toute façon indispensables (POUZAT, 1976, 1978), peuvent devenir prépondérantes. L'importance de ce facteur mécanique a été mise en évidence tant pour la bruche par POUZAT (1975) que pour d'autres insectes (NISHIJIMA, 1960 ; AVIDOV et Coll., 1965 ; NWANZE et Coll., 1975 ; FENEMORE, 1978 ; RUSSO, 1978 ; GREANY et SZENTESI, 1979).

Même si toutes les femelles qui perforent pondent, il n'est donc pas évident que la ponte soit provoquée par les mêmes substances secondaires que la perforation.

En effet, dans chaque lot de graines ayant séjourné plus ou moins longtemps dans un ou plusieurs solvants, il y a des graines attaquées (tableau 40). Et l'observation des pourcentages d'attaques montre que les graines donnant un extrait actif sont moins attaquées que les autres (20 % au lieu de 34,2 % pour

les graines témoins). Mais le pourcentage est malgré tout important, ce qui est notable puisque l'extrait est aussi actif que la graine tant sur la stimulation de la ponte que sur celle de la perforation.

Nous pouvons en déduire que la stimulation de la perforation paraît, par divers aspects, assez spécifique. Ce comportement, assez délicat à étudier, révèle des relations particulières entre les diverses phases de l'activité reproductrice qui seront certainement assez difficiles à dissocier et à analyser.

B. L'OVIPOSITION ET LA PRODUCTION OVARIENNE SONT-ELLES STIMULEES PAR LES MÊMES SUBSTANCES ?

Les extractions qui n'utilisent qu'un seul solvant donnent un extrait incomplet et par conséquent inactif. Cependant, quoique nous ayons éliminé certaines substances de la surface de la graine, ces haricots demeurent beaucoup moins incomplets que l'extrait.

Aussi, nous a-t-il semblé particulièrement judicieux d'utiliser ces graines traitées pour étudier les conséquences d'un stimulus incomplet sur l'activité reproductrice. Seul ce protocole permet d'appréhender l'influence des différentes substances sur les différentes phases de l'activité reproductrice, puisque, comme nous l'avons vu, la méthode de fractionnement utilisée n'a jamais donné de fraction à l'activité remarquable.

1. Méthodologie

Lorsque nous avons effectué des extractions, après la manipulation, nous avons conservé les graines. Une fois séchée sous hotte ventilée, chaque graine est placée dans une boîte avec une femelle. Ainsi, nous pouvons étudier leur comportement au contact de graines plus ou moins dépourvues de certaines molécules qui sont solubles dans l'eau, dans un acide ou dans un autre solvant.

2. Résultats et commentaires

Les résultats sont consignés dans les tableaux 42 et 42 bis.

Paradoxalement alors que l'extrait chloroformique est indispensable à la constitution d'un extrait actif, les graines sont presque toujours actives après l'action de ce solvant. Pourtant la fraction grasse située à la surface des végétaux est rapidement dissoute (BERNAYS et Coll., 1975). Mais ceci n'est pas pour nous surprendre car d'une part ces solvants sont utilisés pour désinfecter les graines dans les élevages et d'autre part POUZAT (1978) qui a utilisé des graines lavées à l'éther, a constaté que leurs qualités ne semblaient pas amoindries.

Donc, les facteurs de la fraction grasse ne sont pas tous facilement éliminés. Ce phénomène est peut-être lié à leur mode de fixation, à moins qu'ils ne soient remplacés si la graine est toujours vivante après une action du solvant (MUCHOVEZ et DHINGRA, 1980).

Les haricots ayant séjourné dans un solvant aqueux (acide, neutre ou basique) ne stimulent plus l'activité de la bruche comme la graine témoin. L'oviposition est stimulée, mais l'activité ovarienne ne l'est plus.

Les graines qui ont séjourné dans un solvant aqueux acide puis dans un solvant aqueux basique, ou inversement, ne stimulent plus ni l'oviposition, ni l'activité ovarienne. Ces résultats obtenus avec des femelles de la souche normale ont été reproduits à plusieurs reprises. Les deux activités semblent donc stimulées de façon différente et cette conclusion n'est pas étonnante. SZENTESI (1976) et POUZAT (1970) étaient arrivés aux mêmes conclusions en observant le comportement de femelles amputées de leurs antennes ou de leurs palpes.

Mais, le point le plus important, en dehors de la nécessité de faire appel à des solvants particulièrement efficaces pour éliminer tout stimulus, c'est que, quelle que soit la méthode utilisée, c'est toujours la même activité qui disparaît la première. Nous ne pouvons émettre l'hypothèse qu'un facteur stimulant l'oviposition est soluble dans l'acide et qu'un facteur stimulant l'ovogénèse est soluble dans la base car nous constatons que, d'une part la graine ne stimule plus l'ovogénèse après avoir séjourné dans l'acide et ne stimule plus la ponte et l'ovogénèse après avoir séjourné dans l'acide et la base, et que, d'autre part après avoir séjourné uniquement dans la base, la graine ne stimule plus l'ovogénèse et qu'elle ne stimule plus la ponte et l'ovogénèse après avoir séjourné dans la base et l'acide.

Ainsi, la stimulation de ces deux activités est le fait de stimuli distincts mais cela n'implique pas que ceux-ci soient totalement indépendants.

II. ETUDE DE LA VARIATION DE LA REACTIVITE DES BRUCHES

A. ETUDE DES VARIATIONS INDIVIDUELLES

1. Méthodologie

Pour que le stimulus présenté à plusieurs femelles soit identique ou presque, nous réutilisons les boîtes après les avoir repérées. Bien évidemment, après chaque expérience les oeufs sont éliminés.

2. Résultats et commentaires

Nous donnons les résultats des pontes observées avec un extrait dont l'activité n'est pas toujours comparable à celle de la graine, et les résultats des pontes observées avec l'extrait "reconstitué" effectué à partir du même extrait (tableau 30).

Les résultats sont consignés dans les tableaux 43 et 44.

Il faut souligner que certains oeufs fixés assez solidement éclatent lors de la manipulation. Nous avons considéré cet incident comme peu important et réutilisé malgré tout les boîtes. Nous n'ignorons pas que les bruches, par leur séjour dans la boîte, peuvent modifier le stimulus et que l'extrait peut évoluer, mais nous avons pensé que ces actions pouvaient être considérées, dans le cadre de nos expériences, comme négligeables.

A chaque manipulation, de nombreux papiers restent sans effet, ou presque, sur l'oviposition. Mais, après cinq manipulations, chaque papier a stimulé au moins une fois l'oviposition de façon assez évidente.

Donc, sur cinq générations, tous les papiers ont eu, une fois au moins, une action comparable à celle de la graine.

Ce phénomène exclut assurément une différence dans la composition des extraits et montre que dans la population utilisée, existe une importante variation individuelle.

B. ETUDE DES VARIATIONS ENTRE LES GENERATIONS ET LES SOUCHES

1. Méthodologie

Nous pouvons, à partir de stimulations identiques, établir des comparaisons entre les résultats des différentes générations (courbe 12).

2. Résultats et commentaires

L'importante variation des valeurs des témoins et la légère variation des conditions expérimentales excluent l'utilisation de méthodes statistiques pour comparer les résultats. Il nous semble malgré tout que les graphiques mettent en évidence des variations et qu'il est possible de les utiliser comme point de départ de la réflexion.

Ces résultats montrent que la population étudiée manifeste une grande variation dans la sensibilité ou plutôt dans la réaction aux stimuli. Cette variation est visible lorsque nous observons la réaction de chacune des femelles mais aussi lorsque nous prenons en considération les différentes générations. A l'intérieur de notre souche "normale" persiste donc une variabilité de caractères. Si les conditions d'élevage permettent parfois d'expliquer une variabilité des résultats, nous pensons qu'il faut chercher chez les insectes la cause principale de celle qui apparaît ici.

Outre les caractéristiques des insectes, ces manipulations mettent en évidence certaines caractéristiques des extraits.

Déposés sur le papier, ils sont "goûtés" par plusieurs générations, et, après 5 utilisations successives ils contiennent encore assez de substances stimulantes pour activer la production ovarienne et l'oviposition. Comme il est probable que les molécules goûtées ne sont pas redéposées sur le papier, celles-ci sont donc présentes en assez grande quantité.

De plus, les extraits déposés sont actifs quatre mois après leur élaboration et leur dépôt donc toutes les substances sont bien stables et non volatiles même après l'extraction.

Il faut aussi remarquer que les bruches pondent sur des papiers où d'autres femelles ont déjà déposé des oeufs. Donc, il ne semble pas que la bruche dépose un dissuadant sur son lieu de ponte comme d'autres insectes le font (PROKOPY, 1977 ; PROKOPY, 1978 ; LUNDGREN, 1977 ; HONDA, 1980 ; d'après PIMBERT, 1980) ou s'il existe, il est volatil. Bien sûr, il est difficile de rejeter complètement l'existence d'un dissuadant car la situation expérimentale est particulière ; la seconde femelle n'ayant pas la possibilité de pondre ailleurs que sur le papier présenté. Mais d'autres constatations et en particulier l'observation de pontes sur des graines d'où sont déjà sortis des adultes ne plaide pas en faveur de l'existence d'un dissuadant (POUZAT comm. pers.) déposé par la femelle. Nous n'excluons pas non plus que la dissuasion provienne de la larve, soit qu'elle émette un dissuadant, soit que la plante hôte attaquée par la larve, comme cela se produit avec *Dacus oleae*, (GIROLAMI, 1981) émette une substance dissuadante. Mais là aussi, nos résultats et l'observation de pontes sur des graines déjà infestées par des larves (POUZAT, comm. pers.) permet d'exclure aussi, à notre avis cette hypothèse.

Nous voyons que les résultats variables que nous ne parvenons pas à expliquer, se retrouvent quand nous renouvelons nos expériences avec des protocoles identiques. L'étude biologique devrait mieux élucider ces variations qui jusqu'ici n'ont fait l'objet que de très rares descriptions.

DISCUSSION

Pour étudier la stimulation chimique, il faut un extrait qui provoque un comportement comparable à celui observé avec le témoin, c'est-à-dire la graine ou la gousse. En modifiant alors l'extrait ou le stimulus, nous ne retrouvons plus tout-à-fait ce comportement car il est lui-même modifié. Ainsi, nous pouvons étudier la nature et le rôle des différentes composantes de ce stimulus.

Quoique le stimulus chimique détermine une activité de ponte, la réalisation de cette dernière est dépendante d'une stimulation mécanique dont la nécessité a été montrée chez la bruche du haricot (LABEYRIE, 1962 ; POUZAT, 1975, 1976) et chez d'autres Bruchidae (AVIDOV et Coll., 1965a ; NWANZE, 1975). Bien évidemment, nous n'apportons à l'étude du stimulus que des éléments partiels : d'une part la comparaison des réactions de la bruche face à un papier enduit d'extrait ou non, et d'autre part sa réaction de perforation après qu'elle soit entrée en contact avec la graine. Il est logique que la bruche essaie moins souvent de perforer la graine qui a une structure différente de la gousse et du papier et qui n'est pas un organe naturellement attaqué. Mais l'étude détaillée de nos résultats confirme que l'action du stimulus mécanique n'est pas seulement une condition de la réalisation d'un comportement donné, mais parfois un facteur important la déterminant, et dans le cas de la perforation, un facteur primordial inducteur de l'action de ponte.

Mais le stimulus chimique présente des particularités intéressantes. Si chez certains insectes, dont : *Pieris brassicae*, *Hylemya brassicae* et *Plutella maculipennis* la ponte est stimulée par un glucosinolate (comme la sinigrine) et l'attraction, puis parfois l'ovogénèse, par un produit d'hydrolyse d'un glucosinolate :

l'allyl isothiocyanate qui dérive peut-être du même glucosinolate qui stimule la ponte (DAVID et GARDINER, 1962 ; HILLYER et

THORSTEINSON, 1971 ; NAIR et Mc EWEN, 1976 ; MITCHELL, 1977 ; STÄDLER, 1978), la stimulation de chaque activité ne paraît pas, chez la bruche du haricot, provoquée par une seule substance. Que ce soit la perforation, la ponte ou l'ovogénèse, ce n'est que lorsque l'extrait est complexe que le comportement est induit. Mais chaque phase semble induite par un groupement de substances, au moins en partie, spécifique. Et le mode d'action des substances paraît complexe comme le laissent prévoir les difficultés rencontrées et les observations de POUZAT. Comparée à celle d'autres insectes la stimulation chimique peut paraître très complexe, d'autant plus que dans ce cas, l'insecte a trouvé sa plante hôte lorsqu'il perçoit les stimuli. Mais c'est peut-être lié à l'oligophagie de la bruche et aussi aux mécanismes qui l'ont provoquée. De plus comme les travaux relatifs à ces problèmes sont peu abondants, cette complexité est peut-être assez répandue.

Les substances comme le montrent POUZAT (1970, 1978) et SZENTESI (1976) sont perçues par les palpes. Nous constatons, nous aussi, que les informations perçues par l'ovipositeur ne sont pas déterminantes car, lorsque la bruche a percé le papier, elle dépose ses oeufs sur la plaque de verre qui n'est recouverte d'aucune substance et ne peut donc provoquer la ponte comme le ferait la paroi interne de la gousse ou la graine (POUZAT, 1975).

Mais si nous trouvons dans la complexité de la régulation une explication à nos observations et à nos difficultés d'interprétation, nous ne négligeons pas non plus l'importance de la bruche et de sa physiologie.

Nous pensons qu'on ne peut ignorer la variation de la sensibilité des récepteurs mis en jeu. La régulation ne doit être ni constante ni identique chez toutes les femelles. Mais il faut aussi avoir à l'esprit que les influx sont intégrés avant de mettre en jeu d'autres mécanismes qui conduiront à la réaction observée. Ces phases qui précèdent la réaction sont probablement complexes et certainement influencées par des facteurs externes.

Aussi n'est-il pas surprenant que les réactions observées soient délicates à interpréter.

L'étude de la stimulation chimique doit commencer par l'étude des substances mais ne peut être menée qu'en tenant compte de l'ensemble des facteurs externes et peut-être internes, chimiques mais aussi mécaniques.

CONCLUSIONS GENERALES

Parmi les nombreux travaux consacrés à l'activité reproductrice des insectes, on trouve peu d'études approfondies sur la stimulation chimique de l'oviposition et de l'activité ovarienne et rares sont les auteurs qui ont mis en évidence des molécules induisant ces activités. Les quelques travaux qui ont pourtant abordé ce problème ont révélé les relations particulières liant la bruche du haricot à sa plante hôte. La gustation paraît le principal moyen d'identification de la plante. Par ce travail, nous avons tenté de définir les facteurs stimulants ainsi que la régulation de l'activité reproductrice.

L'ensemble de notre étude a été effectuée en laboratoire. Nous avons conscience des difficultés que pose l'extension d'observations effectuées sur quelques animaux au comportement des populations naturelles. Mais l'éthologie de l'insecte et notre souci constant de travailler dans les conditions les plus proches possible des conditions naturelles, en particulier en reproduisant certaines manipulations avec des souches "sauvages", nous permettent de penser que nous avons, en partie du moins, évité cet écueil, et que les résultats obtenus présentent une certaine fiabilité.

Faute de pouvoir utiliser les méthodes classiques d'extraction qui se sont avérées inefficaces, nous avons élaboré un protocole mieux approprié. Son originalité réside d'une part dans l'utilisation d'un mélange de solvants, acide dilué et éther en proportion égale, et d'autre part dans un traitement préalable des graines au chloroforme qui améliore l'action du mélange. Bien que l'étude de l'évolution de l'oviposition dans le temps nous oblige à quelques réserves, l'extrait obtenu stimule l'activité reproductrice de la bruche à peu près comme la plante hôte.

Différentes méthodes classiques d'analyse nous ont permis, dans une certaine mesure, de cerner la nature et parfois la structure des substances actives.

Tout d'abord un premier facteur, soluble dans le chloroforme, possède une longue chaîne carbonée. C'est cette partie, qui, selon toute vraisemblance, est active, que la chaîne soit terminée par un radical acide ou alcool, car l'activité de ces substances est voisine.

Ensuite, il existe un second facteur, soluble dans l'eau, dont la caractérisation est plus délicate. Les différentes méthodes d'analyse employées ont démontré l'existence de molécules comme

des polysaccharides ou des protéines. Pourtant ceux que nous avons isolé par fractionnement ne stimulent plus la bruche. Mais nous avons montré que la méthode utilisée laisse persister dans la fraction active des protéines et des polysaccharides dont les liaisons et les groupements sont bien mis en évidence par l'analyse RMN et IR. Aussi, dans l'état actuel de notre étude, nous ne pouvons émettre que des hypothèses, soit le facteur en cause est une protéine, un polysaccharide ou une glycoprotéine, soit, lors de l'étude en IR ses groupements caractéristiques sont dissimulés par ceux des autres molécules présentes dans la fraction.

De plus, la variabilité des résultats et les nombreuses observations effectuées nous amènent à supposer que chaque phase de l'activité reproductrice est régulée par plusieurs substances. Comme la régulation de chacune des phases paraît spécifique, il est logique de penser que de nombreuses substances interviennent dans la stimulation de l'activité reproductrice. On peut imaginer, au vu de certaines observations, que des substances participent à la stimulation de plusieurs phases, ce qui diminue d'autant le nombre des facteurs à isoler mais non la complexité de la régulation.

Ces éléments laissent présager qu'au niveau de centres nerveux, ces stimulations sont interprétées. Outre les stimuli d'origine chimique, ils intègrent naturellement tous ceux d'origine externe tels les stimuli mécaniques et peut-être d'autres encore qui auraient une origine interne. L'ensemble détermine alors la réaction, seul phénomène que nous puissions observer. Cette hypothèse est étayée entre autres par l'absence de réaction à un stimulus simple qui par ailleurs, associé avec d'autres, est indispensable à la stimulation.

De plus, les protocoles expérimentaux et les résultats nous ont conduit à penser que la bruche n'utilise pas de dissuadant pour éviter à la génération fille une concurrence néfaste. Si nos observations rendent cette hypothèse plausible, des observations plus approfondies permettraient peut-être d'en acquérir la certitude.

Cette étude nous a permis de révéler la spécificité des relations bruche-haricot.

En effet chaque étape de l'activité reproductrice paraît, du moins en partie sinon totalement, introduite par un stimulus chimique. Mais comme nous l'avons montré il est la résultante de l'action de plusieurs substances. Nous avons constaté que toutes les substances doivent être présentes pour induire la

stimulation, ce qui, avec le protocole utilisé complique l'expérimentation. De plus, l'induction de chaque étape paraît être le fait d'un stimulus, au moins en partie, spécifique.

Cette complexité rendra difficile l'élaboration de méthodes de lutte qui auraient pour but d'empêcher la ponte de la bruche sur la plante hôte.

Malgré les éléments de réponse que nous apportons à certaines des questions que posent une telle spécificité, une étude plus approfondie passe non seulement par l'utilisation de techniques élaborées, mais également par des études comparatives.

En effet, l'identification des différentes substances secondaires stimulantes nécessite non seulement la mise au point de méthodes de purification plus fines, mais aussi l'utilisation de tests biologiques rapides, en particulier, des tests électrophysiologiques. Malheureusement, en l'état actuel de la technique de tels tests sont difficiles à mettre en oeuvre. Pourtant eux seuls nous permettraient de savoir quelles substances induisent ou non une stimulation sans être obligé pour cela de reconstituer un stimulus de ponte.

Parallèlement, des études comparatives menées dans deux directions offriraient d'intéressantes perspectives.

Tout d'abord la comparaison des compositions chimiques des cuticules des autres plantes hôtes de la bruche du haricot révélerait peut-être un ensemble de substances secondaires communes à ces trois *Phaseoleae* (*Ph vulgaris*, *Ph lunatus* et *Ph coccineus*). Ce qui permettrait d'orienter plus précisément les recherches.

Ensuite l'analyse comparée des comportements d'autres bruches qui infestent soit la même plante hôte (*Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus*) soit d'autres légumineuses (par exemple *Bruchus pisorum*, *Bruchus rufimanus*, *Bruchidius atrolineatus*, *Bruchus lentis*...) nous conduirait à mieux comprendre le comportement d'*Acanthoscelides obtectus*.

De telles études nous permettraient également de saisir avec plus de précision les mécanismes qui déterminent la spécificité des relations insecte oligophage-plante hôte. Enfin elles nous permettraient d'essayer d'éclairer les mécanismes de la coévolution de l'insecte et de sa plante hôte.

BIBLIOGRAPHIE

- ANGERILLI N.P.D., 1980.- Influences of extracts of freshwater vegetation on the survival and oviposition by *Aedes aegypti* (Dipt : *Culicidae*). Can. ent. 112, pp. 1249-1252.
- AMELUXEN F., MORGENROTH K. and PICKSAK T., 1967.- Untersuchungen an der epidermis mit dem stereoscan. elektronenmikroskop Z. Pflanzenphysiol 57, pp. 79-95.
- ARNOULD J., LABEYRIE V., MAISON P., 1958.- Influence de la température et de l'insolation sur la migration des Bruches du haricot (*Acanthoscelides obtectus* Say). CR Acad. science, 247, pp. 2343-2345.
- APPLEBAUM S.W., BIRK Y., 1979.- Saponins in herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites. ed by Rosenthal G. A., JANZEN D.H. Acad. press.
- AUGER J. et THIBOUT E., 1979.- Actions des substances soufrées volatiles du poireau (*Allium porrum*) sur la ponte d'*Acrolepiopsis assectella* (Lep : *Hyponomeutoidea*) : prépondérance des thiosulfates. Can. J. Zool. 57 pp. 2223-2229.
- AUGER J. et THIBOUT E., 1981.- Influences comparées du contact avec les substances volatiles spécifiques d'*Allium porrum* et avec leurs précurseurs sur la ponte de la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lep. *Hyponomeutoidea*). Acta oecologia, vol. 2, 3, pp. 267-276.
- AVIDOV Z. et Coll., 1965.- Physiological aspects of host specificity in the Bruchidae. III effects of curvature and surface area on oviposition. Anim. behavior 13, pp. 178-180.
- AVIDOV Z. et Col., 1965.- Physiological aspects of host specificity in the Bruchidae : II Ovipositional preference and behaviour of *Callosobruchus chinensis* L. Ent. exp. & appl. 8, pp. 96-106.
- BAKER E.A. and HOLLOWAY P.J., 1971.- Scanning electron microscopy of waxes on plant surfaces. Micron. 2, pp. 364-380.
- BAKER E.A., 1974.- The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* var *gemnifera*. New phytol. 73, pp. 955-966.

- BARLOW C.A., 1965.- Stimulation of oviposition in the seed-corn maggot fly, *Hylemya cilicrura* Rond. (Dipt : anthomyiidae). Ent. exp. & appl. 8, pp. 83-95.
- BELLAMY L.J., 1975.- The infrared spectra of complex molecules. CHAPMAN and HALL. London. P. 433.
- BERNAYS E.A., BLANEY W.M., CHAPMAN R.F., 1975.- The problems of perception of leaf surface chemicals by locust contact chemoreceptors. DENTON D.A. and LOGHLAN J.P. (ed) : olfaction and taste. Academic press. NY p. 227.
- BERNAYS E.A., BLANEY W.M., CHAPMAN R.F. and COOK A.G., 1976.- The ability of *Locusta migratoria* to perceive plant surface waxes. Symp Biol. Hung. 16, pp. 35-40.
- BIANCHI G. et CORBELLINI M., 1977.- Epicuticular wax of *Triticum aestivum* Demar 4. Phytochemistry vol. 16, pp. 943-945.
- BLECKMANN C.A., HULL H.M., 1975.- Leaf and cotyledon surface ultrastructure of five *Prosopis* species. J. Arizona Acad. Sci. 10, pp. 98-105.
- BLECKMANN C.A., HULL H.M., HOSHAW R.W., 1980.- Cuticular ultrastructure of *Proposis velutina* and *Acacia greggii* leaflets. Bot. Gaz vol. 1, 141, pp. 1-8.
- BRISSON J.D. and PETERSON R.L., 1976.-A critical review of the use of scanning electron microscopy in the study of the seed coat. In Scanning Electron Microscopy. Proceeding of the Workshop on plant Science applications of the SEM. III. Inst. Technol. Res Inst. Chicago III. Part VII, vol. 2, pp. 477-496.
- CADEIHAN L., 1965.- Action de la plante hôte sur l'ovogénèse de l'adulte d'*Acrolepia assectilla* Zell (Lep). CR Acad. Sc. Paris, 261, pp. 1910-1913.
- CASSAGNE C., LESSIRE R., 1975.- Mouvements des cires entre la couche épicuticulaire et la cellule d'épiderme d'*Allium porrum*. CR. Acad. Sc. Paris, vol. 280, série D, pp. 2537-2540.
- CHARARAS C., 1982.- Les insectes parasites des forêts. La recherche n° 132. pp. 440-453.

- DAVID WAL et GARDINER BOC, 1962.- Oviposition and the hatching of the eggs of *Pieris brassicae* L in the laboratory culture. Bull ent. res. 53, pp, 91-109.
- DAVIS D.G., 1971.- Scanning electron microscopic studies of wax formations on leaves of higher plants. Can. J. Bot. 49, pp. 543-546.
- DESEÖ K. V., 1970.- The effect of olfactory stimuli on the oviposition behaviour and egg production of some microlepidopterous species. Coll. int. CNRS, 189, pp. 163-174.
- DETHIER V.C., 1953.- Host plant perception in phytophagous insects. Trans 9 th Int. Cong. Ent. Amsterdam 2, pp. 81-89.
- DINDONIS L.L., MILLER J.R., 1980.- Host finding responses of onion and seedcorn flies to healthy and decomposing onions and several synthetic constituents of onion. Environ. entomol. 9, pp. 467-472.
- DOWELL D., 1979.- Host selection by the citrus blackfly *Aleurocanthus woglumi* (Homop. *Aleyrodidae*). Ent. exp. & appl. 25, pp. 289-296.
- DYER L.J., SEABROOK W.D., 1978.- Some aspects of oviposition site selection in *Monochamus notatus* and *M. scutellatus* (Col. *Cerambycidae*). J. chem. Ecol. vol. 4, 2, pp. 199-210.
- ELLIS P.R., et Coll., 1980.- The relationship between cabbage root fly egg laying and volatile hydrolysis product of radish. Ann Appl. biol. 95, pp. 283-289.
- FENEMORE P.G., 1978.- Oviposition of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lep.: *Gelechiidae*) ; the physical nature of oviposition substrate. New Zealand journal of Zool vol. 5, pp. 591-599.
- FENEMORE P.G., 1979.- Oviposition of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell (Lep. *Gelechiidae*) ; the influence of adult food, pupal weight, and host-plant tissue on fecundity. New Zealand Jour. of zool, vol. 6, pp. 389-395.
- FENEMORE P.G., 1980.- Oviposition of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zell (Lep. *Gelechiidae*) ; identification of host plant factors influencing oviposition response. New Zealand Jour. of Zool., 7, pp. 435-439.



- FLETCHER B.S., WATSON C.A., 1974.- The ovipositional response of the Tephritid fruit fly, *Dacus tryoni*, to 2 chloro ethanol in laboratory bioassays. Ann of entomol. soc. of am. vol. 67, 1, pp. 21-23.
- FLORES E.M. et Coll., 1977.- Estudio ultraestructural de la epidermis foliar de *Phaseolus vulgaris* L. Turrialba 27, pp. 117-124.
- FRAENKEL G.S., 1959.- The raison d'être of secondary plant substances. Science 129, pp. 1466-1470.
- FRAENKEL G.S., 1969.- Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. 2nd Int Symp. Insects and host plant. Wageningen. pp. 473-486.
- FREEMAN B., ALBRIGO L.G., BRIGGS R.M., 1979.- Ultrastructure and chemistry of cuticular waxes of developing citrus leaves and fruits. J. Amer Soc. Hort. Sci. vol. 6, 104, pp. 801-808.
- GIROLAMI V., VIANELLO A., STRAPAZZON A., RAGAZZI E. and VERONESE G., 1981.- Ovipositional deterrents on *Dacus oleae*. Ent. exp. & appl. 29, pp. 177-188.
- GREANY P.D. and SZENTESI A., 1979.- Oviposition behavior of laboratory-reared and wild caribbean fruit flies (*Anastrepha suspensa* : Dipt : tephritidae). II Selected physical influences. Ent. exp. & appl. 26, pp. 239-244.
- GUERIN P.M., VISSER J.H., 1980.- Electroantennogram responses of the carrot fly, *Psila rosae*, to volatile plant components. Physiol entomol. 5, pp. 111-119.
- GUPTA P.D. and THORSTEINSON A.J., 1960.- Food plant relationships of the diamond backmoth (*Plutella maculipennis* Curt). Ent. exp. & appl. 3, pp. 305-314.
- HAMILTON R.J. et Coll., 1979.- The identification of chemicals involved in the interaction of *Oscinella frit* with *Avena sativa*. Ent. exp. & appl. 25, pp. 328-341.
- HANIOTAKIS GE. and VOYADJOGLOU A. , 1978.- Oviposition regulation in *Dacus oleae* by various olive fruit characters. Ent. exp. & appl. 24, pp. 387-392.
- HILLYER R.J., THORSTEINSON R.J., 1969.- The influence of the host plant or males on ovarian development or oviposition in the diamond-back moth (*Plutella maculipennis* Curt). Can; jour. of zool, vol. 47, pp. 805-816.

- HYLLYER R.J., THORSTEINSON A.J., 1971.- Influence of the host plant or males on programming of oviposition in the diamond-back moth (*Plutella maculipennis* Curt = *Lepidoptera*). Can. jour. of Zool, vol. 49, pp. 983-990.
- HOCH H.C., 1979.- Pénétration of chemicals into the malus leaf cuticle. An Ultrastructural analysis. *Planta.* 147, pp. 189-195.
- HONDA H., SAKAI A., TANAKA K., GOKHALE V.G., YAMAMOTO I., 1980.- Chemical factors involved in population ecology of bean weevils. XVIIe Congrès international d'entomologie de Kyoto.
- HUIGNARD J., 1973 .- Influence de quelques stimulations externes dues à la copulation sur la fonction reproductrice des femelles chez *Acanthoscelides obtectus* Say (Col. *Bruchidae*). Thèse Tours.
- HUIGNARD J. et BIEMONT J.C., 1974.- Influence d'une augmentation de la température sur la capacité reproductrice des mâles chez la bruche du Haricot, *Acanthoscelides obtectus* Say. Ann. Zool. et Ecol. Anim. vol. 4, 6, pp. 561-574.
- HUIGNARD J. et BIEMONT J.C., 1978.- Comparison of 4 populations of *Acanthoscelides obtectus* (Coléopt. : *Bruchidae*) from different colombian ecosystems. Assay of interpretation. *Oecologia* 35, pp. 307-318.
- JANZEN D., 1977a.- The interaction of seed predators and seed chemistry. Coll. int. CNRS. 265, pp. 415-428.
- JANZEN D., 1978.- The ecology and evolutionary biology of seed chemistry as relates to seed predation. in Biochemical aspects of plant and animal coevolution W Harborne JB (ed) Acad. press. p.435.
- JARRY M., 1981.- Evolution of spatial pattern of attacks by *Acanthoscelides obtectus* (Col. *Bruchidae*) of *Phaseolus vulgaris* L pods in south west France in the ecology of bruchids attacking legumes (pulses), ed by LABEYRIE V. Dr W Junk publishers, série entomologica 19, pp. 131-141.

- JEFFERSON M.C. and AGUIRRE M., 1980.- Méthanol tolerances and the effects of methanol on longevity and oviposition behaviour of *Drosophila pachea*. *Physiological entomology* 5, pp. 265-269.
- JEFFREE B.C., Coll., 1975.- Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular wax. *New phytol.* 75, pp. 539-549.
- JERMY T and SZENTESI A., 1978.- The role of inhibitory stimuli in the choice of oviposition site by phytophagous insects. *Ent. exp. & appl.* 24, pp. 458-471.
- JOHNSON C.D., 1981.- Relations of *Acanthoscelides* with their plant hosts. in the ecology of bruchids attacking legumes (pulses). Ed V. LABEYRIE, séries entomologia, DR W, Junk publishers, vol. 19, pp. 73-83.
- KOLATTUKUDY P.E., 1969.- Plant waxes. *Lipids*. vol. 5, 2, pp. 259-275.
- LABEYRIE V., 1960b.- Action de la présence de grains de haricot sur l'ovogénèse d'*Acanthoscelides obtectus* Say. *CR Acad. Sci.* 250, pp. 2626-2628.
- LABEYRIE V., 1961.- Obtention d'une souche "astime" chez *Acanthoscelides obtectus* Say. *Soc. biologie, Paris*, vol. 6, 155, pp. 1366-1369.
- LABEYRIE V., 1962.- Les *Acanthoscelides*. In *Entomologie Appliquée à l'Agriculture. Traité publ., sous la direction de A.S. BALACHOWSKY, Tome I Coléoptères. MASSON et Cie, Paris. Premier vol.* p. 564.
- LABEYRIE V., 1968.- Longévité et capacité reproductrice de lignées d'*Acanthoscelides obtectus* sélectionnées en fonction de la réponse aux stimuli de ponte. *C.R. Soc. biol.* 162, vol. 12, p. 2203.
- LABEYRIE V., 1977.- Environnement sensoriel et coévolution des insectes. *Coll. int. CNRS.* 265, pp. 15-35.
- LABEYRIE V., 1981.- Ecological problems arising from weevil infestation of food legumes. In *The ecology of bruchids attacking legumes (pulses)*. Ed by LABEYRIE V., Dr W Jund ed. *Séries entomologica* 19, pp. 1-15.
- LARSON A.O. et FISHER C.K., 1938.- The bean weevil and the southern cowpea weevil in California. *US Dept. Agric. Tech. Bull.*, 593, p. 70.

- LECOMTE C., 1980.- Recherche de la plante hôte, *Allium porrum* L. par les imagos d'*Acrolepiopsis assectella* Zell (Lep. *Hyponomeutoidea*), rythme et comportement reproducteur, attraction par le végétal en espace restreint. Thèse spécialité, Tours, p. 78
- LEECE D.R., 1976.- Composition and ultrastructure of leaf cuticles from fruit trees, relative to differential foliar absorption. Aust J. Plant Physiol. 3, pp. 833-847.
- LE MAGNEN, 1977.- Chimioréception et comportement alimentaire des insectes. Coll int CNRS. 265, pp. 37-60.
- LERSTEN N.R., 1979.- A distinctive seed coat pattern in the *Vicieae* (*Papilionoideae* ; *Légumineusae*). Proc. Iowa Acad. Sci. 86, vol. 3, pp. 102-104.
- MA W.C. et SCHOONHOVEN L.M., 1973.- Tarsal contact chemosensory hairs of the large white butterfly *Pieris brassicae* and their positive role in oviposition behaviour. Ent. exp. & appl. 16, pp. 343-357.
- MARIA J., 1980.- Influence d'extraits de graines de la plante hôte : *Phaseolus vulgaris* L. sur l'ovogénèse et la ponte des femelles vierges d'*Acanthoscelides obtectus* Say. DEA Tours.
- MARSHALL D.L., BEATTIE A.J., BOLLENBACHER W.E., 1979.- Evidence for diglycerides as attractants in an ant-seed interaction. Jour. of chem. ecol. vol. 5, 3, pp. 335-344.
- MARTIN J.T., JUNIPER B.E., 1970.- The cuticles of plants. Edward Arnold ed.
- MATSUMOTO Y. et THORSTEINSON A.J., 1968.- Effect of organic sulfur compounds on oviposition in onion maggot *Hylemya antiqua* Meig (Dipt : *Anthomyiidae*). Appl. ent. Zool. 3, pp. 5-12.
- MITCHELL N.D., 1977.- Differential host selectio by *Pieris brassicae* (the large white butterfly) on *Brassica oleracea* subsp *oleracea* (the wild cabbage). Ent. exp. et appl. 22, pp. 208-219.
- MONGE J.P., 1979.- Influence d'extraits de la plante hôte sur la ponte de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus* Say). DEA Tours.

- MONTE W.C., MAGA J.A., 1980.- Extraction and isolation of soluble and insoluble fiber fractions from the Pinto bean (*Ph. vulg.*). *Agricultural and food chemistry*. vol 27, pp. 1169-1174.
- MORDRET F., 1971.- Etude de l'insaponifiable des huiles de colza, soja et tournesol. Thèse. Institut des corps gras. Paris.
- MORRISON I.N., 1975.- Ultrastructure of the cuticular membranes of the developing wheat grain. *Can. jour. of Bot.* vol. 53, 18, pp. 2077-2087.
- MUCHOVEJ J.J. and DHINGRA O.D., 1980.- Acétone, benzène and éthanol for treating *Phaseolus* bean seeds in the dry state with systemic fungicides. *Seed Sci. et technil.* 8, pp. 351-356.
- MUSCHINEK G., SZENTESI A and JERMY T., 1976.- Inhibition of oviposition in the bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* Say, Col. *Bruchidae*). *Acta phytopathologica Acad. Sci. Hung* vol. 11 (1-2) pp. 91-98.
- NAIR K.S.S. and Mc EWEN F.L., 1976.- Host selection by the adult cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Dipt : *anthomyiidae*): effect of glucosinolates and common nutrients on oviposition. *Can., ent.*, 108, pp. 1021-1030.
- NISHIJIMA Y., 1960.- Host plant preference of the soy bean pod borer *Grapholitha glycinivorella* Matsumura (Lep. *Eucosmidae*). *Ent. exp. et appl.* 3, pp. 38-47.
- NWANZE K.F., HORBER E., PITTS C.W., 1975.- Evidence for ovipositional preference of *Callosobruchus maculatus* for cowpea varieties. *Environ. entomol.* vol. 4, 3, pp. 409-412.
- PIERCE H.D., VERNON R.S., BORDEN J.H. and OEHLISCHLAGER A.C., 1978.- Host selection by *Hylemya antiqua* (Meig). Identification of three new attractants and oviposition stimulants. *J. Chem. Ecol.* vol. 4, 1, pp. 65-72.
- PIMBERT M., 1980.- Etude du comportement de ponte et de l'activité reproductrice des femelles de *Zabrotes subfasciatus* Boh (Col. *Bruchidae*). DEA Tours.
- POUZAT J., 1970.- Rôle des organes sensoriels céphaliques dans l'ovogénèse et l'émission chez la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus* Say). *Coll. int. CNRS.* 189, pp. 381-400.
- POUZAT J., 1974 a.- Comportement de la bruche du haricot femelle (*Acanthoscelides obtectus* Say) soumise à différents stimuli olfactifs. *C.R. Acad. sci. Paris. Série D*, pp. 2173-2176.

- POUZAT J., 1974 b.- Effets de la destruction de certains récepteurs de l'ovitube sur l'ovogénèse de la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus*, Say. C.R. Acad. Sci. Paris 273, pp. 2554-2556.
- POUZAT J., 1974.- Interactions entre la plante hôte, *Phaseolus vulgaris* L, et l'insémination dans la régulation de la vitellogénèse chez la bruche du haricot. *Acanthoscelides obtectus* Say (Coléoptéra, Bruchidae) ; modifications provoquées au cours des générations. C.R. Acad. Sci. 279, pp. 339-342.
- POUZAT J., 1975.- Analyse expérimentale du rôle de l'ovitube dans le comportement de ponte de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus* Say, Col. Bruchidae). Behaviour, 54 (3-4), pp. 258-277.
- POUZAT J. 1976.- Le comportement de ponte de la bruche du haricot en présence d'extrait de la plante hôte. Mise en évidence d'interactions gustatives et tactiles. C.R. Acad. Sc. 282, pp. 1971-1974.
- POUZAT J., 1977.- Effets des stimulations provenant de la plante hôte, le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) sur le comportement de ponte de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus* Say). Coll. int. CNRS. 265, pp. 115-131.
- POUZAT J., 1978.- La régulation de l'activité reproductrice des femelles de bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus* Say) : influence de quelques facteurs externes (plante hôte, activité locomotrice). Thèse Tours.
- POUZAT J., 1981.- The role of senses organs in the relations between bruchids and their host plants. In the ecology of bruchids attacking legumes (pulses). ed by V. LABEYRIE. Dr W. JUNK ed. Série entomologica 19, pp. 61-72.
- PROKOPY R.J., BOLLER E.F., 1971.- Stimuli eliciting oviposition of european cherry fruit flies *Rhagoletis cerasi* (Dipt : Tephritidae) into inanimate objects. Ent. exp. & appl. 14, pp. 1-14.
- PROKOPY R.J., REISSING W.H., MOERICHE V., 1976.- Marking pheromone deterring repeated oviposition in *Rhagoletis* flies. Entomol. exp. Appl. 20, pp. 170-178.
- PROKOPY R.J., ZEIGLER J.R., WONG T.T.Y., 1978.- Deterrence of repeated oviposition by fruit marking pheromone in *Ceratitis capitata* (Dipt. Teph) J. Chem. Ecol. 4, pp. 55-63.

- RENWICK J.A.A., RADKE C.D., 1980.- An oviposition deterrent associated with frass from feeding larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia* (Lep. Noctuidae). Environ. Entomol. 9, pp. 318-320.
- ROBERT, 1977.- Action stimulante de la plante hôte sur l'activité reproductrice chez la teigne de la betterave (*Scrobipalpa ocellatella* Boyd (L. Gelechiidae). Coll. int. CNRS. 265, pp. 147-162.
- RUSSO R.J., 1978.- Substrate texture as an oviposition stimulus for *Aedes vexans* (Dipt. culicidae). J. Med. entomol. vol 15, 1, pp. 17-20.
- SATHE S.K. et SALUNKHE D.K., 1981.- Functional properties of the great Northern bean (*PH. vulg. L.*). Proteins : emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. J. Food Sc. 46 (1). pp. 71-74.
- SAXENA K.N., 1978.- Role of certain environmental factors in determining the efficiency of host plant selection by an insect. Ent.exp. & appl. 24, pp. 666-678.
- SAXENA K.N., GOYAL S., 1978.- Host plant relations of the citrus butterfly *Papilio demoleus* L. orientational and ovipositional responses. Ent. exp. & appl. 24, pp. 1-10.
- SCHÖNHERR J., SCHMIDT H.W., 1979.- Water permeability of plant cuticles : dependence of permeability coefficients of cuticular transpiration on vapor pressure saturation deficit. Planta 144, pp. 391-400.
- SHARMA S.K., BABU C.R., JOHRI B.M., HEPWORTH A., 1977.- SEM studies on seed coat patterns in *Phaseolus mungo - radiatus - sublobatus* complex. phyto-morphology. 27, pp. 106-111.
- SOUTHGATE B.J., 1981.- Univoltine and multivoltine cycles in the ecology of bruchids attacking legumes (pulses). Ed. V. LABEYRIE, séries entomologica, vol. 19, Dr W. JUNK publishers. pp. 17-22.
- SPAKS M.R., 1973.- Physical and chemical stimuli affecting oviposition preference of *Manduca sexta* (Lep. Sphingidae). Ann entomol. Soc. Amer. 66, pp. 571-573.

- STÄDLER E., 1978.- Chemoreception of host plant chemicals by ovipositing females of *Delia (Hylemya) brassicae*. Ent. exp. & appl. 24, pp. 711-720.
- STAMOPOULOS D.C., 1980.- Influence de quelques facteurs liés à la plante hôte agissant sur le développement post embryonnaire et la reproduction d'*Acanthoscelides obtectus* Say (Coléoptère : *Bruchidae*). Thèse Tours.
- SZENTESI A., 1976.- The effect of the amputation of head appendages on the oviposition of the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say (Col. : *Bruchidae*). Symp. Biol. Hung. 16, pp. 275-281.
- SZENTESI A. et Coll., 1979.- Oviposition behavior of laboratory-reared and wild caribbean fruit flies (*Anastrepha suspensa* ; Dipt : *Tephritidae*). I Selected chemical influences. Ent. exp. & appl. 26, pp. 227-238.
- THIBOUT E., 1974.- Influences respectives de la plante hôte et de la copulation sur la longévité, la ponte, la production ovarienne et la fertilité des femelles d'*Acrolepia assectella* Zell (Lep. : *Plutellidae*). Ann. Zool. Ecol. Anim. 6, pp. 81-96.
- THIERY D., 1981.- Etude du comportement des larves néonates d'*Acanthoscelides obtectus* Say (Col. : *Bruchidae*) en présence des graines de leur plante hôte *Phaseolus vulgaris* L. Thèse Doc. de spécialité. Univ. de Tours, p. 83.
- THOMPSON A.C., KNIGHT W.E., 1978.- Surface lipids of *Trifolium* species. Phytochemistry, vol. 17, pp. 1755-1756.
- THORSTEINSON A.J., 1953.- The chemotactic responses that determine host specificity in an Oligophagous insect (*Plutella maculipennis* Curt (Lep.)). Can. Jour. of Zool. 31, pp. 52-72.
- TOUZARD J., 1975.- La germination des semences. Gauthier-Villars. Bordas p. 232.
- TRAYNIER R.M.M. , 1967.- Stimulation of oviposition by the cabbage root fly *Erioishia brassicae*. Ent. Exp. & appl. 10, pp. 401-412.
- TRIMBLE R.M. and WELLINGTON W.G., 1979.- Effects of salinity on site selection by ovipositing *Aedes togoi* (Dipt. *Culicidae*). Vol. 57, 3, pp. 593-596.

- VERNON R.T., BORDEN J.H., PIERCE H.D., OEHLISCHLAGER J.R. and A.C., 1977.- Host selection by *Hylemya antiqua* laboratory bioassay and methods of obtaining host volatiles. *J.Chem.Ecol.* 3, pp.359-368.
- VISSER J.H., 1979.- Olfaction in the Colorado beetle at the onset of host plant selection. Pudoc, Wageningen. p. 88.
- VOUKASSOVITCH P., 1949.- Facteurs conditionnels de la ponte chez *Acanthoscelides obtectus* Say. *Bull. Museum Hist Nat Belgrade, B* (1-2). pp. 224-234.
- WALLBANK B.E., WHEATLEY G.A., 1979.- Some responses of cabbage root fly (*Delia brassicae*) to allyl isothiocyanate and other volatile constituents of Crucifers. *Ann. appl. biol.* 91, pp. 1-12.
- WEARING C.H., HUTCHINS R.F.N., 1973.- α farnasene, a naturally occurring oviposition stimulant for the codling moth, *Laspersia pomonella*. *J. insect physiol.* vol. 19, pp. 1251-1256.
- WIKLUND C., 1975.- The evolutionary relation ship between adult oviposition preferences and larval host plant range in *Papilio machaon*. *Oecologia* 18, pp. 185-197.
- WILHEM J.C., 1974.- Contribution à l'étude des cires de tourbes et d'acides humiques. Thèse 3e cycle Metz.
- YAMAMOTO R.T., JENKINS R.Y., Mc CLUSKY R.K., 1969.- Factors determining the selection of plants for oviposition by the tobacco horn worn *Manduca sexta*. *Ent. exp. & appl.* 12, pp. 504-508.
- ZACHARIAE G., 1958.- Das Verhalten des Speisebohnenkäfers *Acanthoscelides obtectus* Say (col. *Bruchidae*) im freien in Norddeutschland *Zeit. ang. Entomol.*, 43, pp. 345-365.
- ZACHARIAE G., 1959.- Kann sich der Speisebohnenkäfer *Acanthoscelides obtectus* als Freilandschadling in Nord-Deutschland einburgern ? - *Z.ang. Entomol.*, 45-50, pp.225-267.
- ZAIM M., AND NEWSON H.D., 1979.- Larval development and oviposition behavior of *Aedes triseriatus* (Dipt. *Culicidae*) as affected by varying concentrations of sodium chloride and calcium nitrate in the water. *Environ. entomol.* 8, pp. 326-329.
- ZHBANKOV R.G., 1966.- Infrared spectra of cellulose and its derivatives. Consultants bureau New-York. p.333.