

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE ES SCIENCES (ENVIRONNEMENT)

PAR

CLAUDE LALIBERTE

B. SP. SCIENCES (BIOCHIMIE)

INFLUENCE DE L'INANITION, DE LA SOUS-ALIMENTATION, DE L'INFECTION VIRALE
ET BACTERIENNE SUR LA PHYSIOLOGIE, LES RESERVES ET LE METABOLISME DE
MALACOSOMA DISSTRIA HUBNER (LÉPIDOPTERA: LASIOCAMPIDAE).

OCTOBRE 1978

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

INFLUENCE DE L'INANITION, DE LA SOUS-ALIMENTATION, DE L'INFECTION VIRALE
ET BACTERIENNE SUR LA PHYSIOLOGIE, LES RESERVES ET LE METABOLISME DE
MALACOSOMA DISSTRIA HUBNER (LEPIDOPTERA: LASIOCAMPIDAE).

RESUME

Dans ce travail nous entreprenons de déterminer les effets de la sous-alimentation quantitative, de l'inanition, de l'infection bactérienne (Bacillus thuringiensis var. Kurstaki) et de la polyédrise nucléaire de Malacosoma disstria sur plusieurs paramètres clés des éléments énergétiques, des minéraux, des enzymes, des caractères physiologiques et physiques de Malacosoma disstria Hubner; la Livrée des Forêts. Nos investigations portent notamment sur la mortalité, le poids, l'eau, les lipides, les protéines, le glucose, le glycérol, l'azote uréique, le calcium, le potassium le sodium, le chlore, le phosphore, le pH, l'aldolase, l'isocitrate déshydrogénase, la lactate déshydrogénase, le glucose-6-phosphate déshydrogénase, la phosphatase acide et alcaline, la glutamate-pyruvate et la glutamate-oxaloacétate transaminase. Les résultats sont évalués en fonction du taux d'infection de la population étudiée ou du temps de soumission à la pathologie des larves (IV^o et V^o stade) ou des chrysalides. On y discute aussi des hypothèses de mécanismes par lesquels ces différentes pathologies peuvent influencer le taux des constituants étudiés. Toutes ces pathologies affectent plus ou moins le taux de chacun des éléments, mais de façon générale, on peut dire que la sous-alimentation et l'inanition affectent principalement les éléments énergétiques de réserve, que l'infection bactérienne perturbe l'équilibre des minéraux et l'infection virale exerce son action surtout sur l'activité enzymatique.

Claude Laliberté

Claude Laliberté

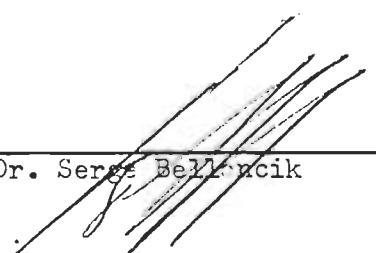

Dr. Serge Belknapik

TABLE DES MATIERES:

REMERCIEMENTS:.....	p. i
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES:.....	p. ii
NOMENCLATURE ET ABREVIATIONS:.....	p. iv
INTRODUCTION:.....	p. 1
MATERIEL ET METHODES:	
A. Insecte et microorganismes pathogènes:.....	p. 3
B. Conditions expérimentales:.....	p. 4
C. Investigations physiologiques:.....	p. 5
D. Investigations biochimiques:.....	p. 6
RESULTATS ET DISCUSSION:	
A. Inanition et sous-alimentation:	
1) Résultats:.....	p. 13
2) Discussion:.....	p. 36
B. Infection bacillaire:	
1) Résultats:.....	p. 48
2) Discussion:.....	p. 52
C. Infection virale:	
1) Résultats:.....	p. 57
2) Discussion:.....	p. 61
CONCLUSION:.....	p. 63
REFERENCES:.....	p. 65

REMERCIEMENTS

Je tiens à prendre ces quelques lignes afin d'exprimer ma reconnaissance au Dr. Wladimir A. Smirnoff (Environnement Canada, C.R.F.L.) et au Dr. Serge Belloncik (U.Q.T.R.) qui ont tous deux su si bien m'éclairer et m'orienter tout au long de ce travail.

De plus, je veux remercier les autorités de l'U.Q.T.R. et du C.R.F.L. qui ont permis cette collaboration et je souhaite que celle-ci se poursuive afin que d'autres étudiants en bénéficient.

En terminant, je désire souligner l'excellent travail et appui technique fournis par messieurs José A. Valéro, Serge Gauthier, Richard Mimault et Robert Roy.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAU I:	TL ₅₀ des larves soumises à l'inanition au début du IV ^e et Ve stade.....	p. 20
TABLEAU II:	Variations de quelques constituants énergétiques et de quelques minéraux dans l'hémolymphé de larves du Ve stade infectées par <u>Bacillus thuringiensis</u> (infection <u>per os</u>).....	p. 50
TABLEAU III:	Variations du pH et de l'activité enzymatique dans l'hémolymphé de larves du Ve stade infectées par <u>Bacillus thuringiensis</u> (infection <u>per os</u>).....	p. 51
TABLEAU IV:	Variations de quelques constituants énergétiques, de quelques minéraux et du pH de l'hémolymphé de larves du Ve stade infectées par le virus de <u>Malacosoma disstria</u> par atomisation sur le feuillage.....	p. 58
TABLEAU V:	Variations de l'activité enzymatique dans l'hémolymphé de larves du Ve stade infectées par le virus de <u>Malacosoma disstria</u> par atomisation sur le feuillage.....	p. 59
Figure 1:	Schéma général des voies métaboliques.....	p. 7
Figure 2:	Variation du poids des larves soumises à l'inanition au début du IV ^e et Ve stade	p. 21
Figure 3:	Effets de différentes températures constantes sur les variations journalières du poids des larves soumises au début du Ve stade à l'inanition.....	p. 22
Figure 4:	Variations journalières du poids des larves en relation avec la quantité de nourriture ingérée....	p. 23
Figure 5:	Poids sec de nourriture ingérée en relation avec le poids sec d'excréments pour des larves du IV ^e et Ve stade soumises à la température de 12° ^C , 18° ^C et celles du biotron.....	p. 24

Figure 6:	Influence de la quantité de nourriture ingérée au Ve stade larvaire sur le temps de maturation et sur le taux de mortalité.....	p. 25
Figure 7:	Influence de la quantité de nourriture ingérée sur la concentration de quelques constituants énergétiques et métabolites de l'hémolymphé de larves du Ve stade après 16 jours d'alimentation contrôlée.....	p. 26
Figure 8:	Influence de la quantité de nourriture ingérée sur le taux de lipides et d'eau dans l' <u>organisme</u> entier de larves du Ve stade après 16 jours d'alimentation contrôlée.....	p. 27
Figure 9:	Influence de la quantité de nourriture ingérée sur le pH et la concentration en minéraux de l'hémolymphé de larves du Ve stade après 16 jours d'alimentation contrôlée.....	p. 28
Figure 10:	Influence de la quantité de nourriture ingérée sur l'activité de quelques enzymes dans l'hémolymphé de larves du Ve stade après 16 jours d'alimentation contrôlée.....	p. 30
Figure 11:	Influence du poids des chrysalides sur leur contenu en constituants énergétiques et en métabolites.....	p. 31
Figure 12:	Influence du poids des chrysalides sur le pH et la concentration en minéraux de leur contenu.....	p. 32
Figure 13:	Influence du poids des chrysalides sur l'activité enzymatique de leur contenu.....	p. 34
Figure 14:	Influence du poids des chrysalides sur le taux de mortalité.....	p. 35
Figure 15:	Taux d'infection des larves du Ve stade alimentées avec du feuillage atomisé avec le virus de <u>Malacosoma disstria</u>	p. 60

NOMENCLATURE ET ABREVIATIONS:

La nomenclature et les abréviations utilisées dans ce travail sont celles couramment employées en biochimie clinique. Pour faciliter la compréhension de tous les lecteurs, nous avons dans cette partie l'expression complète de l'abréviation et entre parenthèse, la nomenclature systématique internationale ainsi que le numéro de la classification enzymatique (s'il y a lieu).

ADP : Adénosine diphosphate.

Aldolase : Fructose-diphosphate aldolase (D-Fructose-1,6-diphosphate, D-glycéraldéhyde-3-phosphate ligase)(E.C. 4.1.2.13).

ATP : Adénosine triphosphate.

DAP : Dihydroxyacétone phosphate.

GAP : Glycéraldéhyde-3-phosphate.

GDH : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Glycérol-3-phosphate: NAD⁺ 2-oxydoréductase)(E.C. 1.1.1.8).

GK : Glycérol kinase (Glycérol-3-phosphotransférase)(E.C. 2.7.1.30).

GOD : Glucose oxydase (β -D-glucose: oxygène-1-oxydoréductase)(E.C. 1.1.3.4).

GOT : Glutamate-oxaloacétate transaminase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransférase)(E.C. 2.6.1.1).

G-6-P : Glucose-6-phosphate.

G6P-DH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase (D-glucose-6-phosphate: NADP⁺ 1-oxydoréductase)(E.C. 1.1.1.49).

GPT : Glutamate-pyruvate transaminase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransférase)(E.C. 2.6.1.2).

ICDH : Isocitrate déshydrogénase (t-D-Isocitrate: NADP⁺ oxydoréductase) (E.C. 1.1.1.42).

LDH : Lactate déshydrogénase (L-lactate: NAD⁺ oxydoréductase) (E.C. 1.1.1.27).

MDH : Malate déshydrogénase (L-malate: NAD⁺ oxydoréductase) (E.C. 1.1.1.37).

NAD⁺ : Nicotinamide-adénine dinucléotide oxydée.

NADH : Nicotinamide-adénine dinucléotide réduite.

NADP⁺ : Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate oxydée.

NADPH : Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduite.

PEP : Phosphoénol pyruvate.

Phosphatase acide : (Orthophosphorique monoester phosphohydrolase (acide optimale)) (E.C. 3.1.3.2).

Phosphatase alcaline : (Orothophosphorique monoester phosphohydrolase (alcaline optimale)) (E.C. 3.1.3.1).

PK : Pyruvate kinase (Pyruvate-3-phosphotransférase) (E.C. 2.7.1.40).

POD : Peroxyde oxydase (Hydrogène-peroxyde oxydoréductase) (E.C. 1.1.1.7).

TIM : Triosephosphate isomérase (D-glycéraldéhyde-3-phosphate cétol-isomérase) (E.C. 5.3.1.1).

TL₅₀: Temps léthal médian.

Uréase : (Urée amidohydrolase) (E.C. 3.5.1.5).

INTRODUCTION

La biochimie clinique est couramment utilisée en pathologie humaine pour caractériser un état de santé ou détecter une maladie par la mise en évidence de déviations métaboliques par rapport au fonctionnement normal de l'organisme. Par contre en pathologie des insectes, cette exploration systématique n'est pas encore utilisée avec une telle ampleur.

Plusieurs travaux sur les caractères biochimiques, physiologiques et physiques d'insectes en relation ou non avec un état pathologique tel que l'inanition ont été effectués (Baud, 1967, 1973; Beament, 1958, 1959; Bosquet, 1976; Candy et Kilby, 1975; Chauvin, 1956; Christie et al., 1974; Fast, 1964; Gowda et Ramaiah, 1976; Grison et LeBerne, 1953; Hoyle, 1954; Jansen et al., 1966; Ludwing et Cullen, 1956; Mellanby, 1932; Newton, 1954; Niemerko, 1955; Po-Chedley, 1958; Rudolf, 1926, 1926a, 1927, 1929; Schwalbe et Baker, 1976; Smirnoff, 1971; Smirnoff et Valéro, 1969; Steinhaus, 1949.) (ce ne sont que des références non citées dans le texte). Ces auteurs ont surtout traité d'un paramètre en particulier ou se sont principalement intéressés aux réserves énergétiques de l'organisme: lipides sucre, protéines. Aucun ne s'est attardé à une étude globale et systématique des paramètres biochimiques: éléments énergétiques, minéraux, enzymes, caractères physiologiques et physiques.

Il semble que ce n'est que tout dernièrement que W.A. Smirnoff (1975) a ouvert les portes à l'utilisation de la biochimie clinique dans la diag-

nose de l'état d'une population d'insectes. Comme ces divers éléments régressent et sont affectés par la santé larvaire, une étude de plusieurs paramètres importants de chacune de ces catégories, ci-dessus, devrait permettre dans un premier temps de mettre en relief leur présence quantitative normale et dans un deuxième temps de dénoter les effets de pathologies sur ceux-ci. Ce qui devrait permettre, par un choix judicieux de paramètres, de palier à l'évaluation suggestive de l'ampleur de l'attaque d'une pathologie que fournissait la seule étude physiologique. Si l'on pose comme limites, l'état normal et l'état pathologique léthale, le degré de désordre biochimique ou l'écart de la déviation du métabolisme par rapport à la normale fournira une évaluation plus précise de l'effet de cette même pathologie entre ces limites.

Dans le cadre de nos travaux de recherches sur les pathologies de Malacosoma disstria, nous avons entrepris, en plus des investigations physiologiques de base, d'utiliser les méthodes d'investigations de la biochimie clinique de routine. En collaboration avec la Section de Pathologie des insectes du Centre de recherches Forestières des Laurentides, il fut donc choisi, développé et étudié des techniques biochimiques telles que dosages de métabolites, d'enzymes, de minéraux et d'éléments jouant un rôle prépondérant dans le fonctionnement des chaînes énergétiques, des équilibres osmotiques et moteurs, afin de déterminer dans l'hémolymphe de la larve et dans le contenu de la chrysalide, les taux normaux de ces constituants et les perturbations provoquées par différentes pathologies telles que: la sous-alimentation, l'inanition, l'infection virale et bacillaire.

MATERIEL ET METHODES

A. Insecte et microorganismes pathogènes:

1) Insecte: les larves de Malacosoma disstria Hübner, lépidoptère phytopophage de la famille des Lasiocampidae, appelé aussi la Livrée des Forêts, provenaient de Notre-Dame de la Dorée (lac St-Jean) d'une infestation depuis trois ans d'un peuplement de Populus tremuloides Michaux. L'épidémie couvre environ 20 km carrés. Les larves sont prélevées au début de la troisième et de la quatrième mue.

2) Pathogènes: Bacillus thuringiensis var. Kurstaki (sérotype 3a-3b): suspension de spores titrant 32 B.U.I. (Sandoz, Californie) et diluée 1:1 avec de l'eau à l'application (1 B.U.I. correspond à 1×10^9 unités internationales par comparaison au standard E 61 de l'Institut Pasteur, formulé à un titre de 1000 unités toxicologiques Pieris brassicae par mg).

Virus de Malacosoma disstria Hbn. (polyédrie nucléaire): suspension fraîche, purifiée¹, appliquée après dilution avec de l'eau à $6,2 \times 10^7$ polyèdres/ml. Cette suspension est dosée à l'aide d'une cellulose de Pétroff Häuser en microscopie à fond noir.

Ces deux souches proviennent de la collection de la Section de Pathologie des Insectes du C.R.F.L. de Ste-Foy.

1) par centrifugation et filtration sur millipore 0.45 micron où l'on recueille premièrement le surnageant puis le dépôt sur le filtre.

B. Conditions expérimentales:

1) Elevages: les insectes provenant directement de la zone échantillonnée sont aussitôt groupés par cent ou plus, placés dans des cages tamisées permettant ainsi l'aération et le passage de la lumière. Les élevages sont placés à 70% d'humidité dans un incubateur à $12 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou à $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou encore dans une chambre de croissance que nous appellerons "biotron" et dont les températures sont de $14 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 19 heures et de $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 5 heures avec une photopériode de 10 heures centrée sur la période de haute température. Les conditions atmosphériques de la zone échantillonnée correspondent en moyenne à celles programmées au biotron.

2) Alimentation: elle est faite avec du feuillage de Populus tremuloides Michaux par l'administration journalière de poids connus de nourriture, inférieurs et jusqu'à un état de satiété de la larve, créant ainsi la sous-alimentation et l'alimentation normale. Les insectes inanités sont placés dans les mêmes conditions que les témoins, mais sans feuillage.

3) Infections: elles sont faites par une mono-atomisation du pathogène directement sur le feuillage. La quantité dispersée par unité de surface a été standardisée à l'aide d'un atomiseur de précision. Dès que les larves ont mangé le feuillage infecté, il est remplacé par du feuillage non traité jusqu'à la fin de l'expérience.

C. Investigations physiologiques:

1) Stades larvaires: ils sont déterminés par la mesure du diamètre de la capsule céphalique de l'insecte (W.A. Smirnoff, communication personnelle). L'expérimentation commence au début du IV^e ou Ve stade et nous considérons cette période comme étant 24 heures après la fin de la mue précédant le stade étudié.

2) Poids: ils sont mesurés avec une balance Mettler de précision de ± 0.5 mg. Les poids secs sont déterminés après dessication à l'étuve à 100°C et sous vide en présence de chlorure de calcium anhydre jusqu'à l'obtention de poids constants.

3) Mortalité: nous considérons comme morts, les insectes qui ne présentaient aucune réponse musculaire à une stimulation mécanique telle que le pincement de la peau.

4) Infection: les tissus sont examinés au microscope à fond noir selon la note technique de Smirnoff (1969). La présence de polyèdres ou de cellules du bacille indique une infection virale ou bacillaire positive.

5) Calculs: Le TL₅₀ est déterminé selon Kleiber (1975). Ce temps léthal médian correspond à la moyenne du temps qu'il a fallu pour que 50% de chaque groupe d'insectes meure.

D. Investigations biochimiques:

Pour en faciliter l'utilisation, nous employons dans ce mémoire les abréviations couramment utilisées en biochimie clinique. Afin de permettre la compréhension de tous les lecteurs, vous trouverez au début de ce travail la nomenclature employée conformément aux recommandations de 1972 de l'union internationale de la chimie pure et appliquée et de l'union internationale de biochimie, commission de nomenclature biochimique publiées dans Enzymes Nomenclature par American Elsevier Publishing Comp. Inc.

Dans ce travail, nous donnons les résultats des dosages des lipides, protéines, glucose, glycérrol, GOT, GPT, ICDH, LDH, G6P-DH et de l'aldolase dont la localisation schématique dans les voies énergétiques est représentée dans la figure 1. De plus, nous verrons les résultats des investigations des lipides et de l'eau dans l'organisme entier de l'insecte ainsi que ceux de la phosphatase alcaline et acide, de l'azote uréique, du sodium, du potassium, du calcium, du phosphore, des chlorures et du pH. En regardant le schéma des voies énergétiques (Figure 1), il est certain que nous y trouvons d'autres éléments susceptibles de nous fournir des indications intéressantes sur l'effet des pathologies. Nous en avons effectivement étudié d'autres, mais différents facteurs techniques ou autres font qu'il nous est impossible d'en fournir les résultats.

1) Echantillons: l'hémolymphe est prélevée en coupant une patte antérieure de 5 à 20 larves par échantillon. Elle est ensuite aussitôt centrifugée pendant 5 minutes à 4800 g et conservée tout au plus deux jours à -10°C pour étude.

Le contenu des chrysalides est obtenu en écrasant

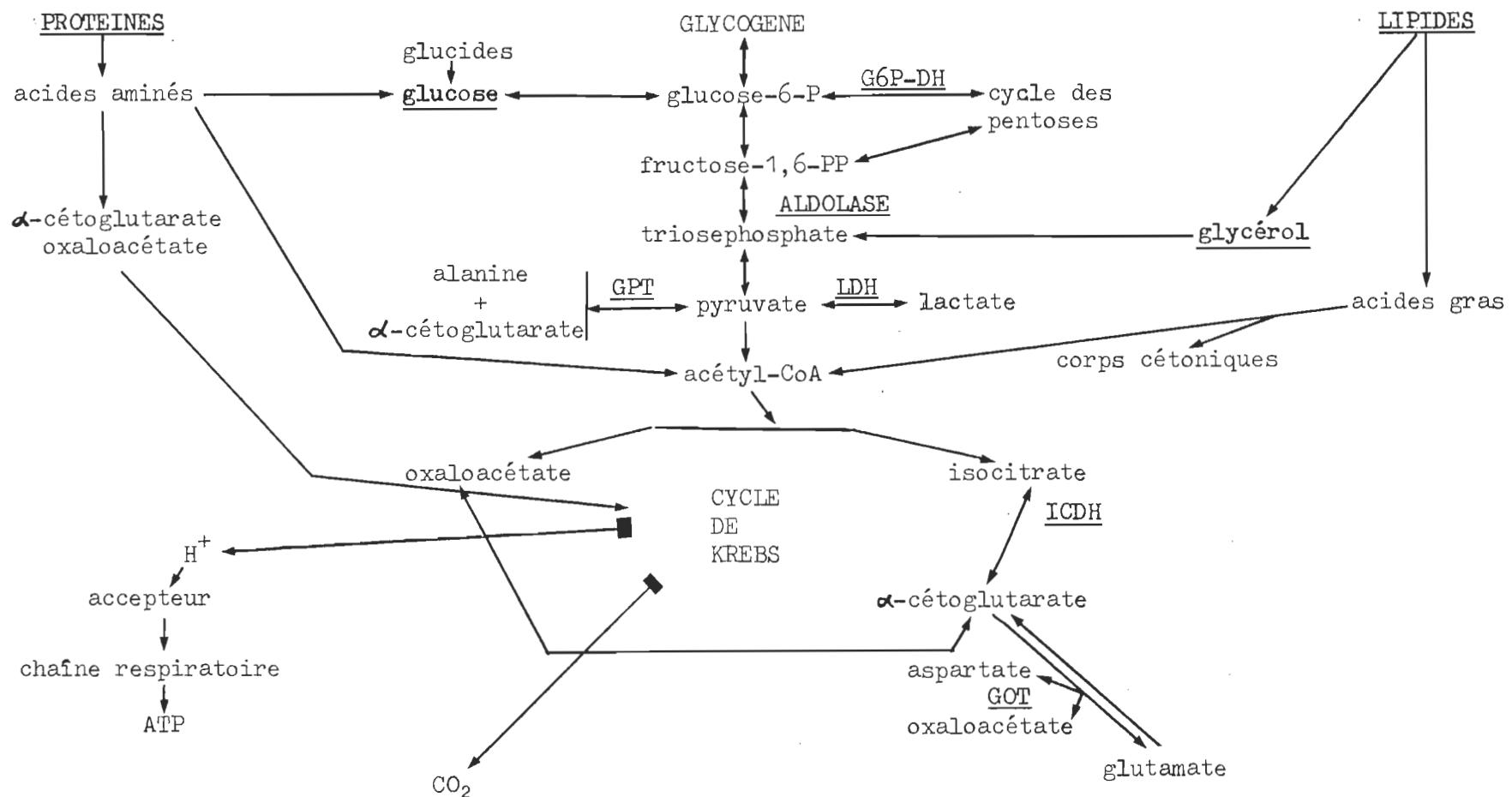


Figure 1. Schéma général des voies métaboliques (extrait de Candy et Kilby, 1975).
 (Les termes soulignés ont fait l'objet de la présente étude)

5 à 20 chrysalides de poids connu dans un volume déterminé d'une solution physiologique (NaCl 0.9%), puis l'échantillon est centrifugé pendant 5 minutes à 4800 g et le surnageant est conservé tout au plus deux jours à -10°C.

2) Méthodes analytiques:

- Lipides totaux : une vingtaine de larves ou chrysalides sont pesées et broyées. Les lipides en sont extraits par un mélange de chloroforme-méthanol (3:2 v/v). L'extrait est lavé avec une solution aqueuse de NaCl 3%, filtré, séché sous vide en présence de sulfate de sodium anhydre et pesé (Folch et Stanley, 1957).

- Eau : La quantité d'eau contenue dans l'insecte est déduite en retranchant du poids normal de l'insecte son poids sec (voir page 5, poids). Le résultat est exprimé en pourcentage du poids normal.

- Lipides : l'hémolymphe est déprotéinisée en y ajoutant de l'acide sulfurique concentré et en chauffant cette solution dans un bain marie pendant 10 minutes. Nous y ajoutons ensuite de l'acide phosphorique et de la vanille. La concentration des lipides est ensuite déterminée par la mesure de la coloration du complexe phosphovanillique à 546 nm contre un standard de lipides vendu par Boeringer Mannheim (Zöllner et Kirsch, 1962).

- Protéines : sont déterminées par la méthode de biuret et dosées à 546 nm contre un standard vendu par Boeringer Mannheim (Gornall et al., 1949).

- Glucose : forme en présence de la GOD du peroxyde qui, avec la POD et l'hydrochlorure d'orthodianide forme un complexe brun absorbant à 436 nm (Werner et al., 1970)

- Glycérol : le glycérol en présence de GK et d'ATP est convertit en glycérophosphate et ADP. L'ADP couplé à une solution de PEP, de PK, de LDH et de NADH forme du lactate et du NAD⁺. La concentration du glycérol est mesurée par la diminution de l'absorption du NADH à 366 nm (Printz et al., 1967).

- Azote uréique : l'urée est brisée par l'uréase en deux molécules d'ammoniaque. En présence du α -cétoglutarate et du glutamate déshydrogénase (E.C. 1.4.1.2), cette ammoniaque oxyde quantitativement le NADH en NAD⁺. Cette diminution de l'absorbance du NADH à 366 nm est proportionnelle à la concentration de l'azote uréique.

- Calcium : en solution alcaline, le calcium forme un chromophore coloré avec l'*o*-crésolphthaléine. La présence du sulfate-8-quinolinol dans le réactif prévient les interférences par le magnésium. Un surfactant permet de déterminer le calcium sans prétraitement de l'échantillon. La mesure de l'augmentation de l'absorption à 546 nm permet de déterminer la concentration du calcium (Connerty et Briggs, 1966).

- Potassium : il est dosé à l'aide d'un photomètre à flamme dont la standardisation a été préalablement faite avec un sérum étalon (Dean, 1960).

- Sodium : il est dosé à l'aide d'un photomètre à flamme dont la standardisation a été préalablement faite avec un sérum étalon (Dean, 1960).

- Chlorures : ils sont mesurés par électrométrie directe en utilisant un micro-chlor-o-counter Fiske. Une quantité de 0.01 ml d'échan-

tillon est déprotéinisé en l'ajoutant à 3 ml d'acide phosphotungstique et à une solution de 6 ml d'acide (acide nitrique 0,1% et acide acétique 10%) et de gélatine 0.05% préalablement étalonnée. La concentration des chlorures est ensuite mesurée par la vitesse de migration d'ions argents à partir d'une anode d'argent (Ramsay et al., 1955).

- Phosphore : l'orthophosphate inorganique réagit avec l'acide molybdique en milieu acide pour former le phosphomolybdate. Le molybdène (VI) de phosphomolybdate est réduit par le sulfate-p-méthyl ammoniumphénol en un molybdène bleu. L'ion cuivre catalyse la réaction et un surfactant prévient la précipitation des protéines sériques. L'absorbance est déterminé à 690 nm (Henry, 1964).

- pH : mesuré à l'aide d'un pH-mètre Metrohm A383 en utilisant des micro-électrodes. L'appareil était précalibré avec des solutions tampons étalons.

- Aldolase: elle scinde le D-fructose-1,6-diphosphate en dihydroxy-acétone phosphate et en D-glyceraldéhyde-3-phosphate. Ce dernier en présence de TIM est converti en dihydroxy-acétone phosphate. Les deux molécules de DAP formées, en présence de GDH et de deux NADH sont converties en deux molécules de glycérol-3-phosphate et les deux NADH sont oxydés en NAD^+ . L'activité de l'aldolase est proportionnelle à la moitié de la diminution de l'absorption du NADH à 366 nm (Bruns et Puls, 1954).

- ICDH : réduit le NADP^+ en convertissant l'isocitrate en oxaloacétate, où le Mn^{++} (0.12M) sert de catalyseur. Nous pouvons doser l'activité de l'ICDH par la mesure de l'augmentation de l'absorption du NADPH formé à 366 nm (Wolfson et al., 1958).

- LDH : transforme le pyruvate et le NADH en lactate et en NAD^+ . L'activité est proportionnelle à la diminution de l'absorption du NADH à 366 nm (Wroblewski, 1955).

- GOT : elle modifie le L-aspartate et le 2-oxoglutarate en oxaloacétate et en L-glutamate. L'oxaloacétate dans une solution de MDH et de NADH est transformé en malate et en NAD^+ . La mesure de la diminution de l'absorption du NADH à 366 nm permet de déterminer l'activité de la GOT (Karmen et al., 1955).

- GPT : forme du pyruvate et du L-glutamate à partir de la L-alanine et du 2-oxoglutarate. Le pyruvate en présence de la LDH et du NADH donne naissance à du lactate et du NAD^+ . L'activité de la GOT est directement proportionnelle à la diminution de l'absorption du NADH à 366 nm (Wroblewski et Ladue, 1956).

- G6P-DH : convertit le G-6-P et le NADP^+ en D-glucono- β -lactone-6-phosphate et en NADPH. L'absorption à 366 nm mesurée au cours de la réaction permet de mesurer l'activité enzymatique (Kornberg et al., 1955).

- Phosphatase acide : arrache l'orthophosphate du p-nitrophénol phosphate avec une activité optimale à pH acide. L'activité est mesurée par l'augmentation de l'absorption du p-nitrophénol à 505 nm (Fishman et Lerner, 1953).

- Phosphatase alcaline : catalyse la même réaction que la phosphatase acide avec une activité optimale à pH alcalin (Bessey et al., 1946).

Toute les méthodes biochimiques appliquées dans ces travaux, ont été choisies, développées et étudiées par la Section de Pathologie des insectes du Centre de Recherches Forestières des Laurentides dont je faisais parti.

RESULTATS ET DISCUSSION:

A. Inanition et sous-alimentation:1) Résultats:

L'observation journalière de la mortalité et du poids des larves soumises au début du IV^e et du Ve stade à l'inanition sous différentes températures, nous permet d'exprimer la résistance de l'insecte au jeûne à l'aide du temps léthal médian (tableau I) et la perte moyenne de poids dans le temps, représentée en pourcentage du poids initial (figure 2).

Les résultats du tableau I montrent une résistance au jeûne du Ve âge de 1,15 fois supérieure sur le IV^e âge bien que les poids initiaux moyens étaient respectivement de 194 et de 79 mg, soit plus du double. Une élévation de température de 12° à 18°C provoque une diminution marquée de la résistance de l'insecte. De plus, dans des conditions de températures journalières variables, d'hygrométrie identique et avec une photopériode (au biotron), la résistance des larves s'en trouve encore diminuée bien que le nombre de degrés-jours soit intermédiaire entre ceux des températures journalières constantes de 12° et 18°C. De même, la diminution de poids provoquée par l'inanition est plus rapide lors de la diminution de la résistance des larves tel que le démontre la figure 2. Chez les larves du IV^e âge, plus légères que celles du Ve âge, nous notons une chute plus rapide du poids exprimé en pourcentage du poids initial et chez un même stade larvai-

re, nous enregistrons aussi pour une larve de poids initial plus léger une diminution du poids plus rapide (les variations de poids pour les larves de poids initiaux différents et à un même stade n'ont pas été représentées, ces constatations ont été faites lors du calcul des variations moyennes pour un même stade dans la figure 2).

Les variations du poids des larves en inanition au début du Ve âge soumises à un grand éventail de températures nous montrent bien le rôle déterminant de la température sur la perte de poids journalière moyenne exprimée en mg (figure 3). Ainsi à une température de 3°C , même après vingt jours d'inanition, la perte de poids journalière reste négligeable, tandis qu'à 30°C elle atteint 30,6 mg.

Nous avons retranché le poids frais d'excréments de la diminution de poids représentée dans les figures 2 et 3 afin d'éliminer l'incidence du contenu intestinal qui, dépendant de la quantité d'alimentation de la journée précédente, peut passer de négligeable au tiers du poids de l'insecte. D'où nous faisons des réserves sur l'exactitude de certains résultats qui peuvent être influencés par le contenu intestinal, contenu dont l'incidence devient négligeable après environ 36 heures d'inanition.

Toutes les larves soumises à l'inanition à partir du début du IVe ou du Ve stade ne parviennent pas à la maturation de leur stade et restent au même âge larvaire jusqu'à la mort, tandis que les témoins parviennent à maturation jusqu'au stade adulte.

Des observations similaires sur des larves soumises à la sous-alimentation quantitative au début du IVe et Ve stade, nous permettent de relater dans la figure 4 l'influence de la quantité de nourriture journalière ingé-

rée sur les variations du poids larvaire pour ces deux stades qui réagissent de façon similaire. Une baisse du facteur température provoque une diminution de la quantité maximale que peut ingérer journalièrement une larve et pour une même quantité de nourriture, l'augmentation du poids est plus faible à partir de 6 mg et plus pour le IV^e âge et de 10 mg et plus de nourriture ingérée pour le Ve âge larvaire. Pour une quantité de nourriture inférieure à ces poids critiques, il y a une inversion du rendement en poids avec cette même diminution de température. Toutefois le taux de digestion ne présente pas de variations significatives pour ces deux stades et ces trois conditions de température, tel que l'on peut en déduire de la figure 5 représentant le poids sec de nourriture ingérée en fonction du poids sec d'excréments produits. Sur cette figure, nous notons aussi une diminution du taux de digestion avec l'augmentation à partir de 15 mg de poids sec de nourriture consommée. La sous-alimentation inhibe l'évolution du développement larvaire et augmente le taux de mortalité (figure 6). Ainsi, les larves normales ayant consommé journalièrement chacune environ 66mg ne prennent que 21 jours entre le début du Ve âge et la chrysalidation sans qu'il y ait de la mortalité, tandis que celles qui ont consommé chacune environ 9 mg journalièrement prennent 59 jours avec une mortalité de 88%. Pour des quantités de nourriture journalière inférieures à 9 mg, les larves ne parviennent pas à la maturation de leur stade et meurent au Ve âge.

Au cours de nos expériences, nous avons pu constater que la quasi totalité des spécimens soumis à la sous-alimentation ou à l'inanition conservent jusqu'aux deux ou trois jours précédents la mort une activité physique apparemment similaire à celle des insectes normalement nourris. A-

près quelques jours, on remarque cependant une activité accrue des individus, activité qui diminue avec le temps.

Suite à l'étude de l'influence de la sous-alimentation et de l'inanition sur la physiologie de l'insecte, nous avons effectué des investigations biochimiques afin de déterminer les effets de ces mêmes facteurs sur les caractères biochimiques et enzymatiques dans l'hémolymphe de larves et le contenu des chrysalides. Pour se faire, nous avons soumis cet insecte pendant 16 jours (à partir du début du Ve âge) à divers régimes alimentaires tels que normaux, subnormaux et puis l'inanition. Les larves utilisées avaient un poids moyen initial de 190 mg (179 à 204 mg) et la température de l'expérience était celle du biortron. Après 16 jours, les larves normales, ayant reçu plus de feuillage qu'elles ne pouvaient en manger, avaient un poids moyen de 540 mg et chacune a mangé en moyenne 51 mg de feuillage journalièrement. Les larves qui ont mangé plus (60 mg/jour x larve) profitaient d'une meilleure disponibilité du feuillage (plus dense que sur une branche naturelle), ce qui forma des larves de 585 mg. Les larves ayant reçu moins de nourriture ont subit une sous-alimentation de plus en plus sévère jusqu'à l'inanition (zéro mg). Les larves en inanition pesaient 100 mg après 16 jours. Des investigations biochimiques ont été entreprises dans l'hémolymphe de chaque groupe de larves et dans l'organisme entier de la larve ou de la chrysalide.

La sous-alimentation provoque dans l'hémolymphe une chute de la concentration des lipides, des protéines, du glucose, du glycérol et une augmentation de l'azote uréique (figure 7). Dans l'organisme entier, les lipides totaux diminuent tandis que le taux d'eau augmente (figure 8). Dans l'hémolymphe, avec la sous-alimentation, les ions tels que le calcium et les chlorures augmentent, tandis que le potassium, le sodium, le phosphore

restent relativement stables, ne présentant que de légères augmentations et le pH s'acidifie (figure 9). De plus la sous-alimentation aigue provoque une augmentation de l'activité de toutes les enzymes dosées (figure 10). De façon générale, ce n'est qu'à partir d'une alimentation inférieure à environ 15 mg/larve x jour que nous notons une accentuation des déviations des résultats par rapport aux valeurs normales (lorsque les larves ont reçu de 50 à 60 mg de nourriture/larve x jour), sauf pour la concentration des lipides, du glycérol dans l'hémolymphe et des lipides totaux dans l'organisme entier de la larve qui eux diminuent de façon assez constante avec la diminution de la dose journalière de nourriture ingérée. Ainsi, les larves ayant consommé durant le Ve âge plus de 15 mg/larve x jour de nourriture (plus du tiers de la quantité normale) semblent avoir un équilibre métabolique et suffisamment d'apports énergétiques pour demeurer viables, bien que ces larves peuvent peser moins de la moitié du poids normal. De fait, les larves ayant mangé davantage sont presque toutes parvenues à l'état de chrysalide tandis que les autres en majorité n'y parvenaient pas (figure 6).

Ces doses journalières de nourriture ont été prolongées jusqu'à l'obtention de chrysalides ou jusqu'à la mort de l'insecte. Là où la quantité de nourriture a été suffisante pour le passage de l'insecte à chrysalide, nous avons recueilli les chrysalides et deux jours après leur formation, nous avons entrepris des investigations biochimiques similaires sur le contenu de ces chrysalides. Les unités de concentration des investigations biochimiques sont exprimées par gramme de chrysalide, ce poids déculant de la moyenne des poids des chrysalides investiguées pour chaque dose de nourriture. Les chrysalides normales pèsent en moyenne 398 mg et les chrysalides de poids inférieur ont été obtenues par la sous-alimentation

durant leur Ve stade.

La sous-alimentation provoque dans la chrysalide une diminution de la concentration des lipides, des protéines, du glucose, du glycérol et une augmentation de la concentration de l'azote uréique et du taux d'eau (figure 11). Le phosphore, le potassium et le sodium demeurent relativement stables, ce n'est que lors d'une sous-alimentation aiguë (chrysalide pesant moins de 200 mg) que l'on dénote une augmentation (figure 12). Les chlorures et le calcium, eux, diminuent de façon constante avec l'accentuation de la sous-alimentation tandis que le pH augmente fortement seulement sous l'influence de la sous-alimentation aiguë (figure 12). De plus, l'activité enzymatique de toutes les enzymes dosées augmente dans le contenu des chrysalides soumises à la sous-alimentation à l'exception de la GOT qui elle diminue (figure 13). Tout comme chez les larves, les chrysalides présentent une accentuation des déviations des résultats par rapport à la normale lorsqu'elles ont été soumises à une sous-alimentation aiguë (chrysalides pesant moins de 200 mg). Pour ces chrysalides de faible poids, la majorité ne parviendra pas à l'état adulte et plus le taux de mortalité s'élève plus le poids diminue (figure 14).

La direction des variations provoquées par la sous-alimentation par rapport à l'alimentation normale est similaire dans l'hémolymphé des larves et dans le contenu des chrysalides, sauf pour certains ions, pour le pH et pour l'activité de la GOT. Ainsi, la concentration du calcium et des chlorures augmente dans l'hémolymphé des larves (figure 9b et 9d) tandis qu'elle diminue dans le contenu des chrysalides avec l'influence de la sous-alimentation (figure 12b et 12d). Par contre, le pH diminue dans l'hémolymphé (figure 9a) et augmente dans le contenu des chrysalides (figure 12a), tan-

dis que la GOT augmente dans l'hémolymphe des larves (figure 10a) et diminue dans le contenu des chrysalides (figure 13a).

TABLEAU I

TL 50 des larves soumises à l'inanition au début du IVe et Ve stade.

Stade	Température ¹ (°C)	TL 50 (jours)	Déviation standard (jours)	Coefficient de variabilité (%)
IV	12 ± 1	33,2 ± 0,7	6,9	21
	18 ± 1	18,2 ± 0,4	4,1	22
	biotron ²	14,3 ± 0,4	3,6	25
V	12 ± 1	38,6 ± 0,7	7,6	19
	18 ± 1	21,0 ± 0,6	6,1	29
	biotron ²	16,5 ± 0,2	4,0	24

1) à 70% d'humidité relative.

2) La température du biotron est de 14°C pendant 19 heures et de 18°C pendant 5 heures avec une phase lumineuse de 10 heures centrée sur la période de haute température.

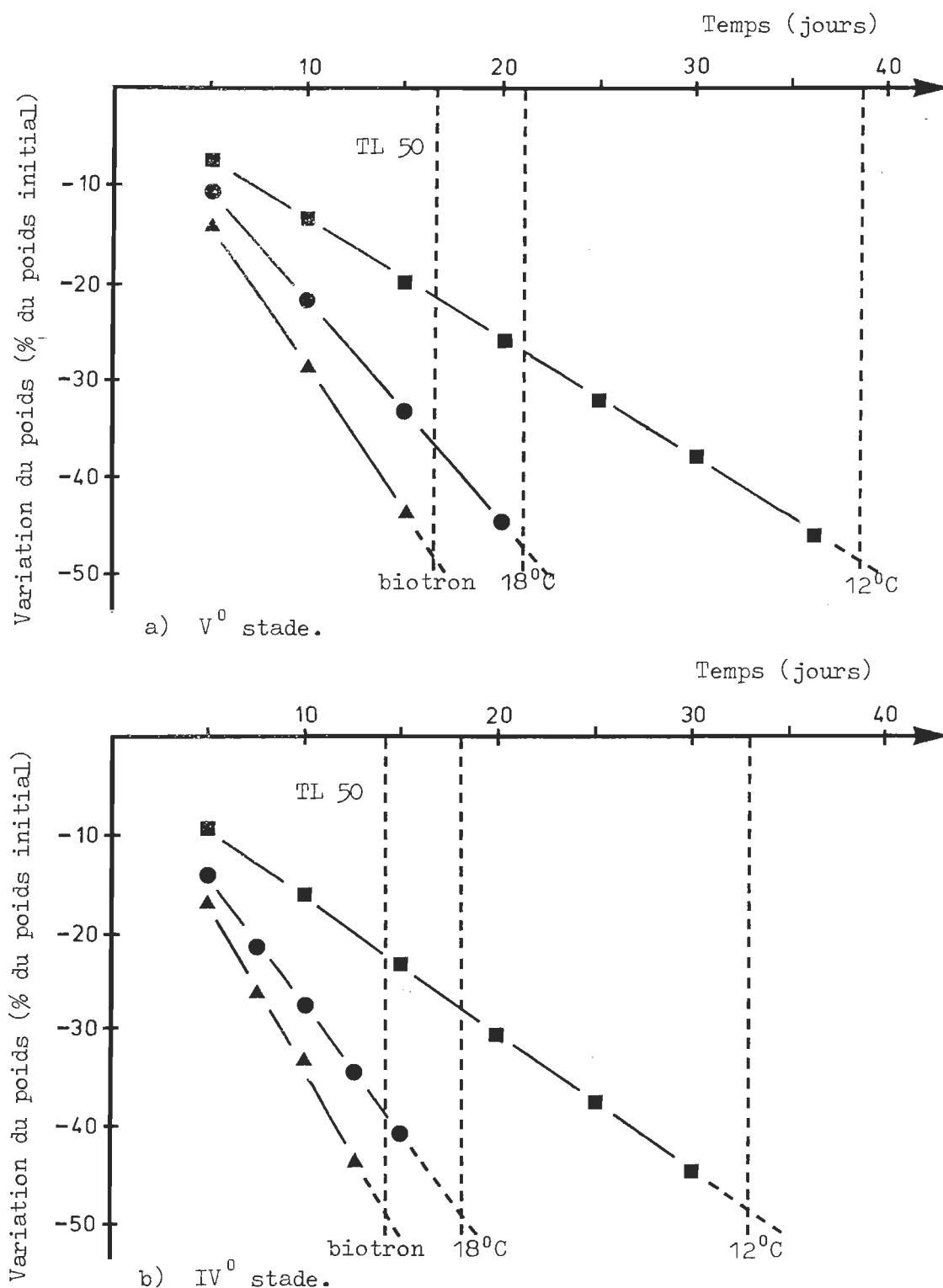


Figure 2. Variation du poids des larves soumises au début du IV^0 et V^0 stade à l'inanition.

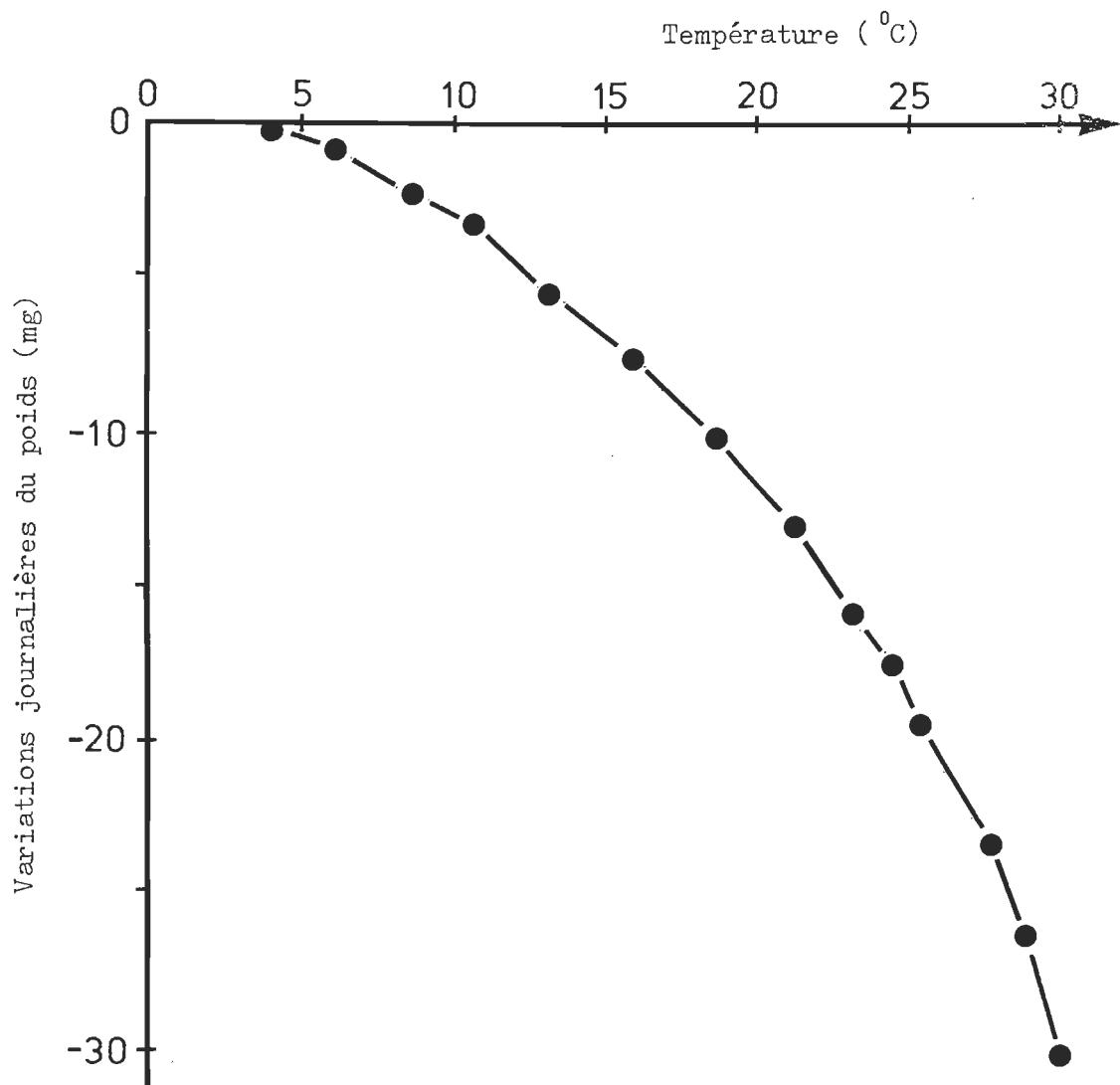


Figure 3. Effets de différentes températures constantes sur les variations journalières du poids des larves soumises au début du V⁰ stade à l'inanition.

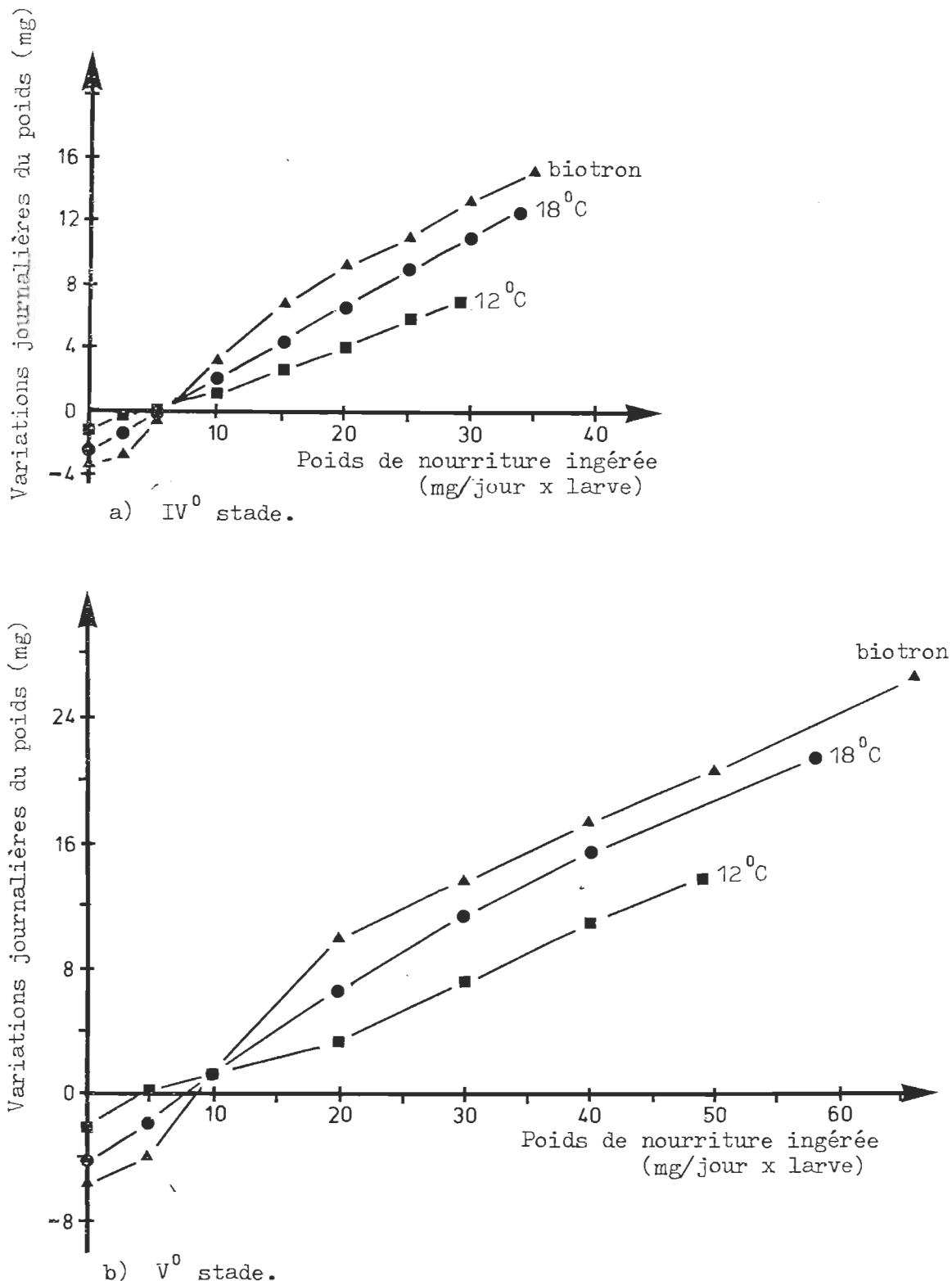


Figure 4. Variations journalières du poids des larves en relation avec la quantité de nourriture ingérée.

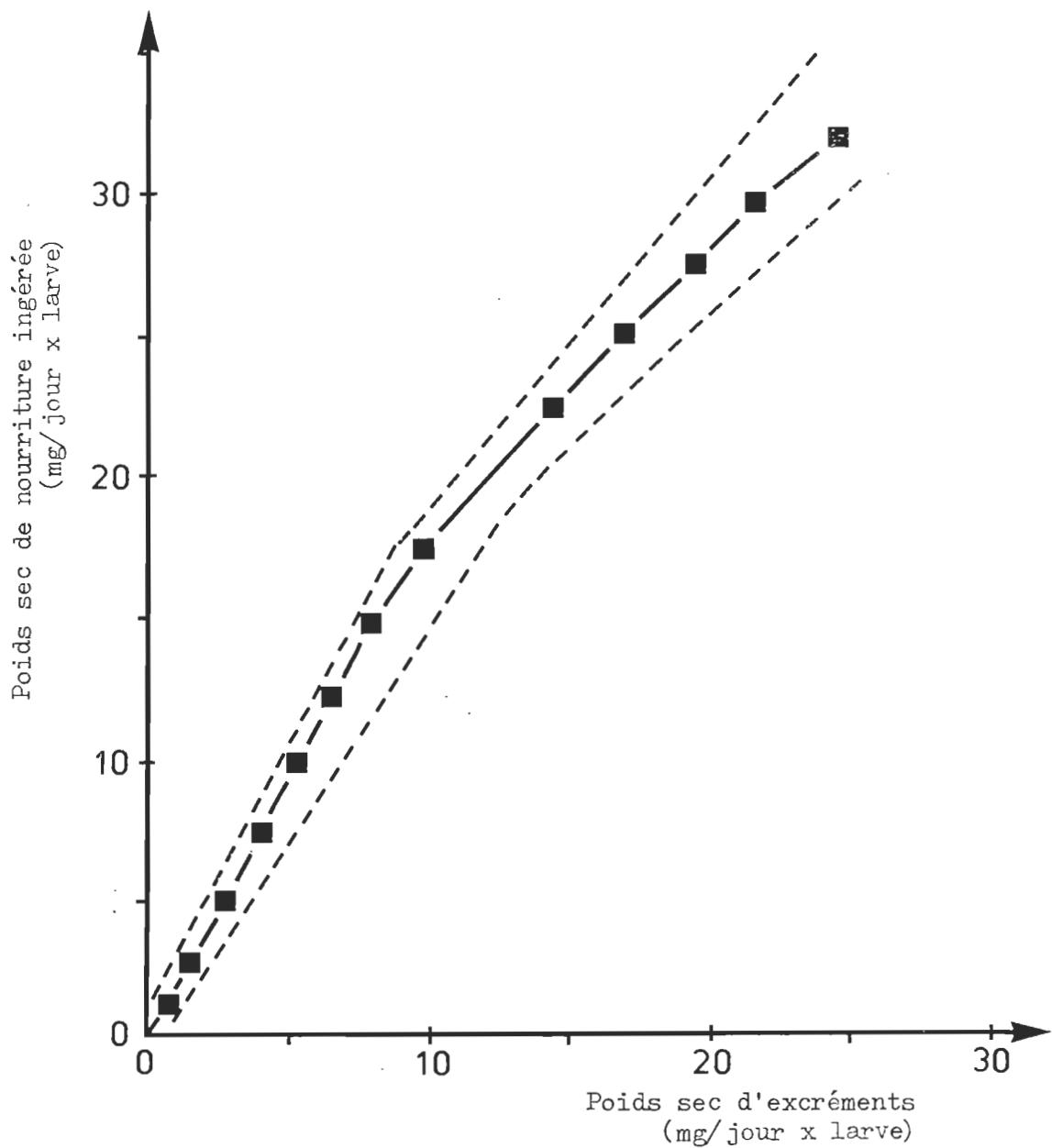


Figure 5. Poids sec de nourriture ingérée en relation avec le poids sec d'excréments pour des larves du IV⁰ et V⁰ stade soumises à la température de 12⁰C, 18⁰C et celles du biotron. Ce graphique représente la moyenne des trois courbes qui se superposaient sans écart significatif à l'intérieur des lignes pointillées.

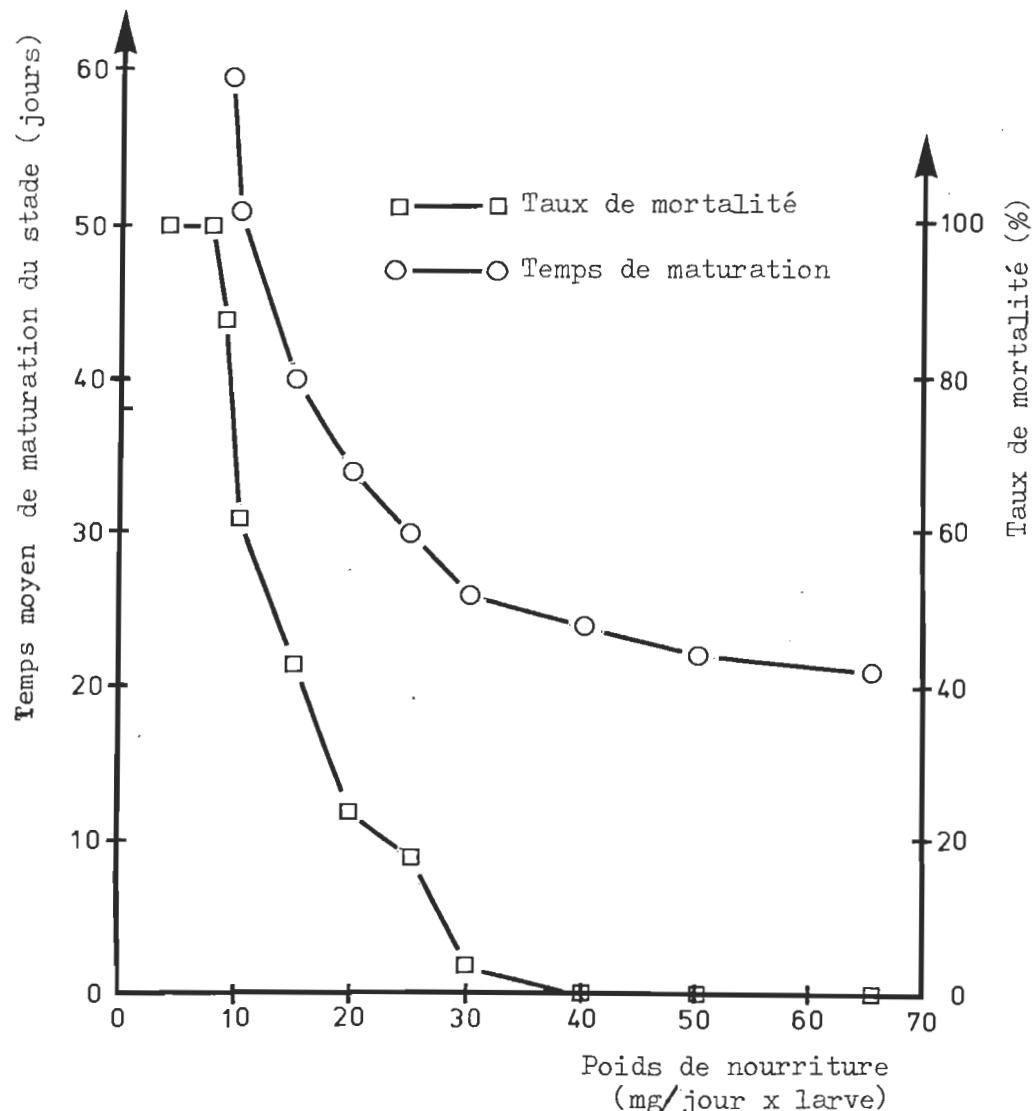


Figure 6. Influence de la quantité de nourriture ingérée au V^o stade larvaire sur le temps de maturation du stade et sur le taux de mortalité.

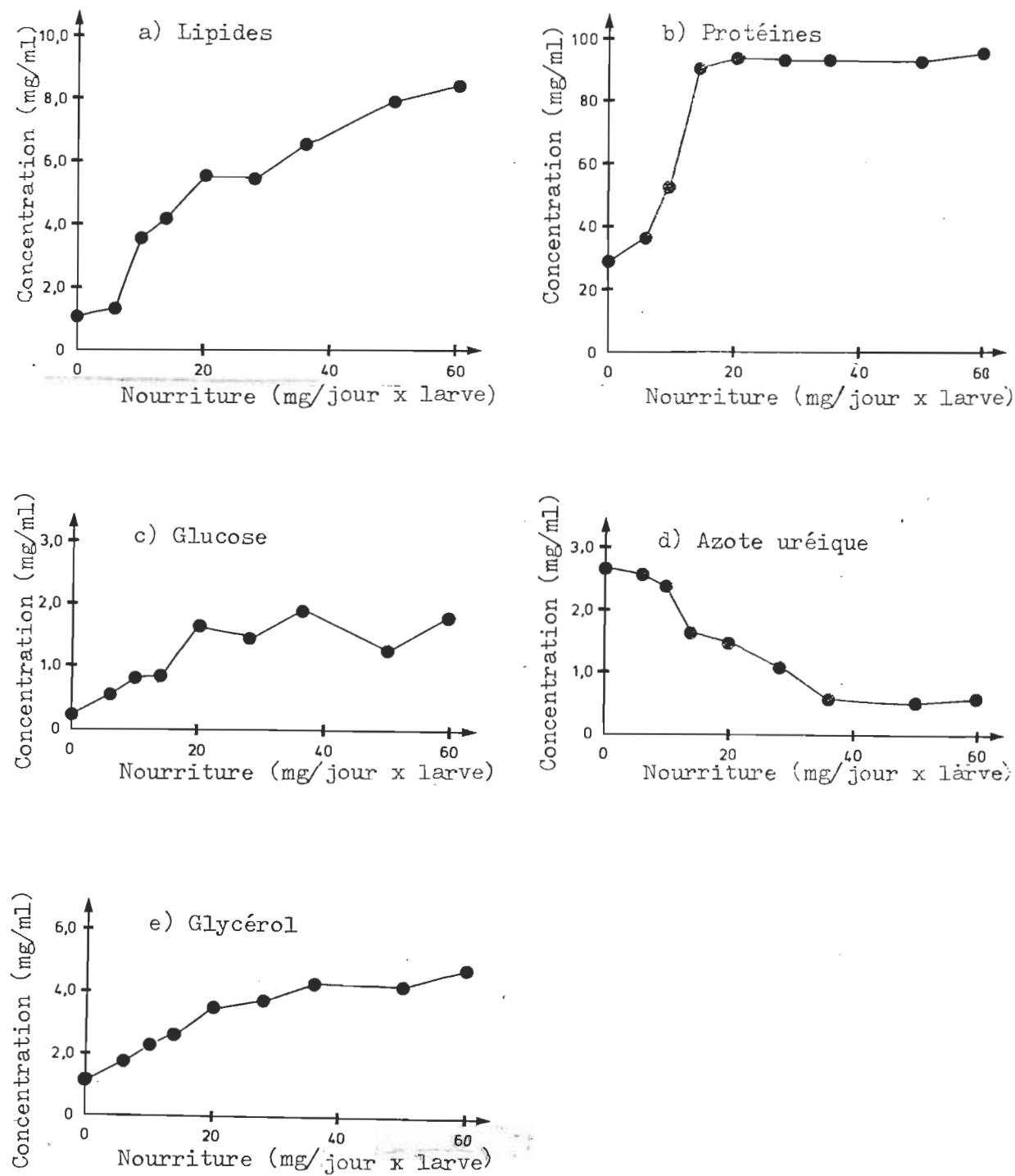


Figure 7. Influence de la quantité de nourriture ingérée sur la concentration de quelques constituants énergétiques et métabolites de l'hémolymphe de larves du V⁰ stade après 16 jours d'alimentation contrôlée.

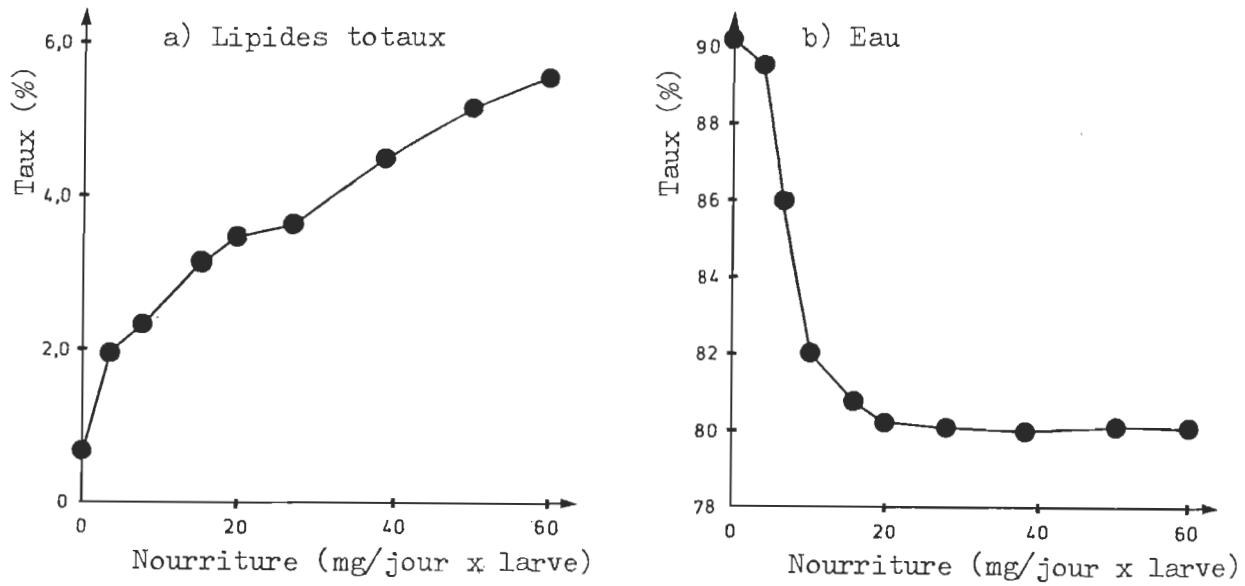


Figure 8. Influence de la quantité de nourriture ingérée sur le taux de lipides et d'eau dans l'organisme entier de larves du V⁰ stade après 16 jours d'alimentation contrôlée.

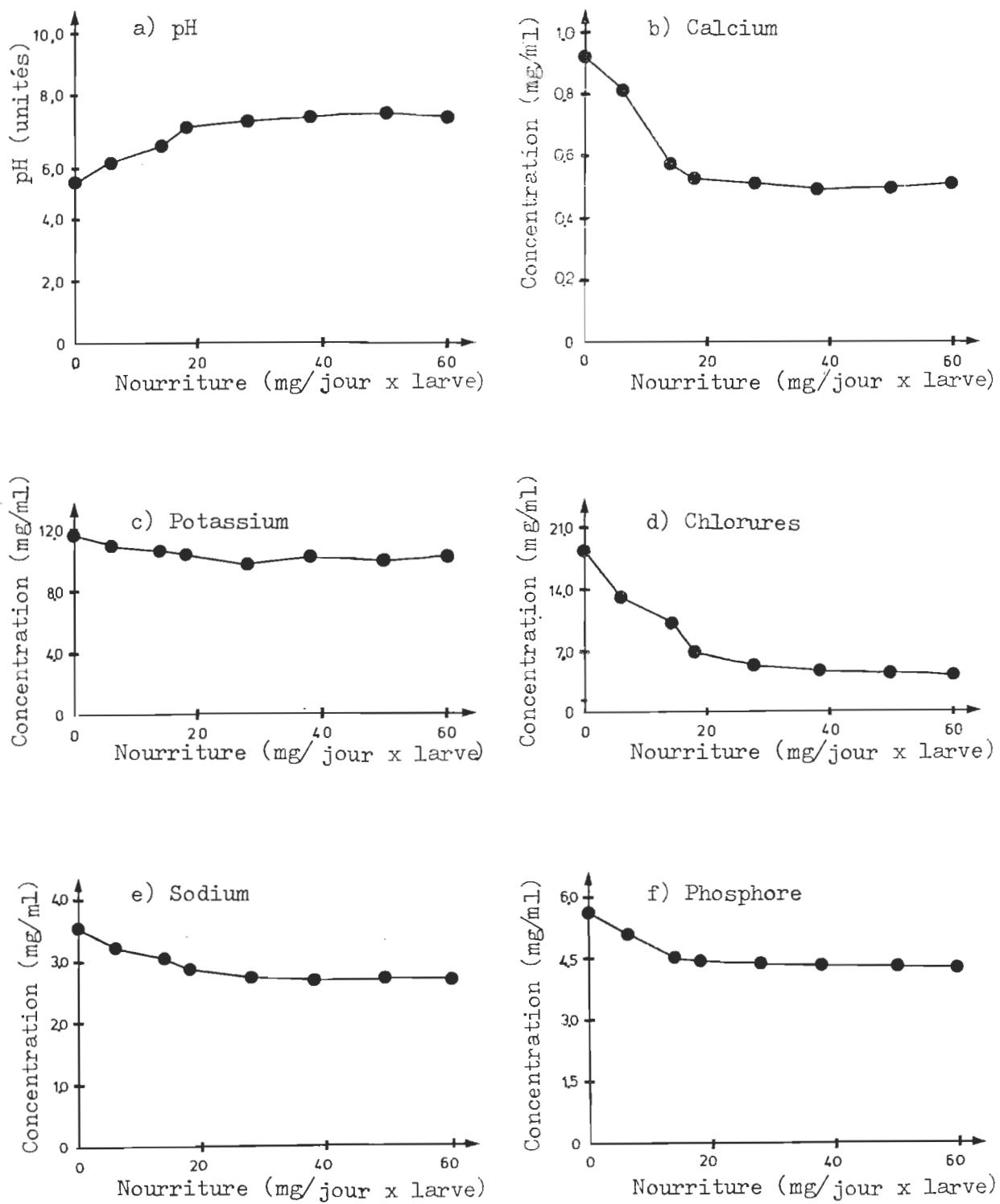


Figure 9. Influence de la quantité de nourriture ingérée sur le pH et la concentration en minéraux de l'hémolymphe de larves du V₆ stade après 16 jours d'alimentation contrôlée.

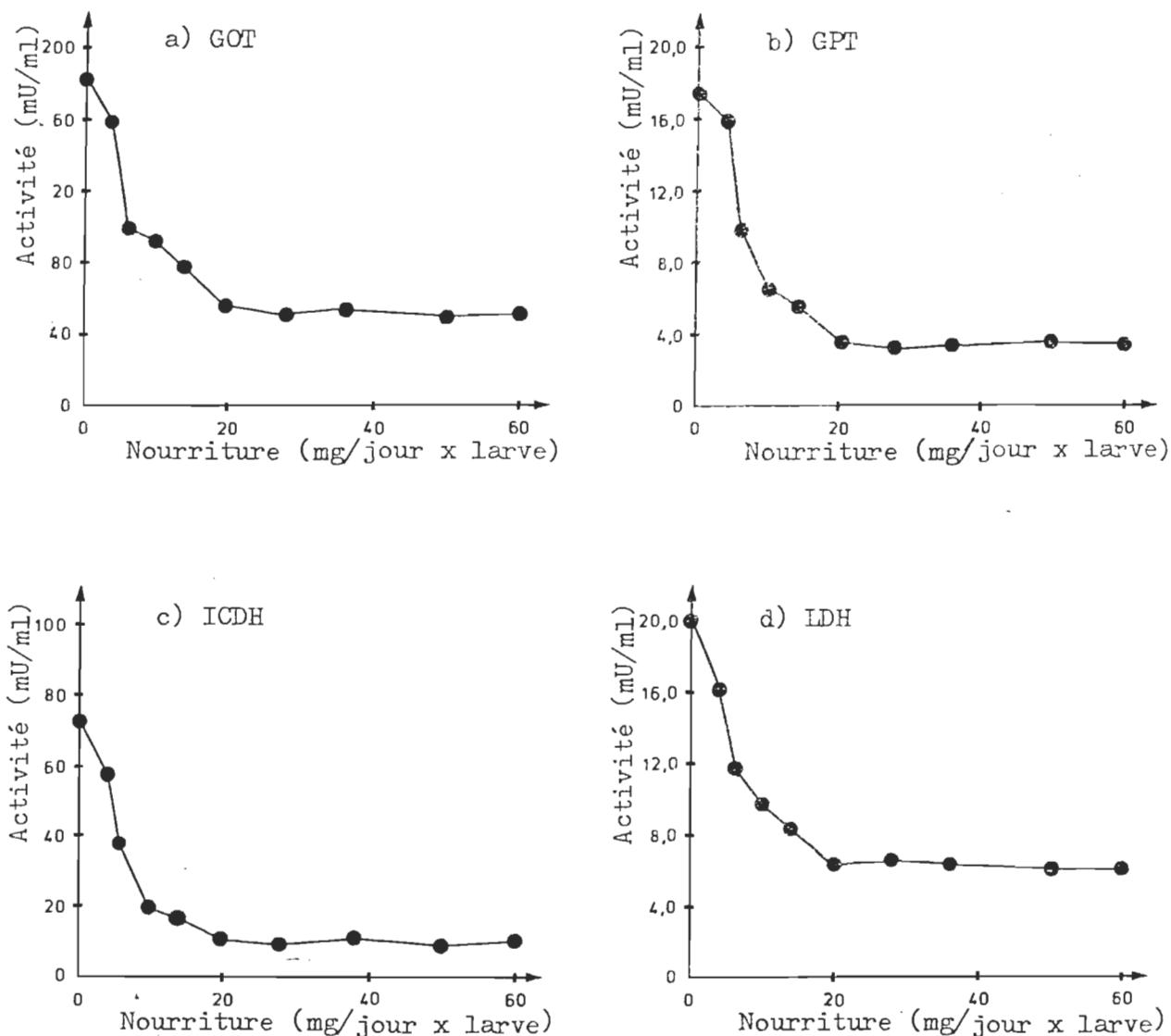


Figure 10a. Influence de la quantité de nourriture ingérée sur l'activité de quelques enzymes dans l'hémolymph de larves du Ve stade après 16 jours d'alimentation contrôlée (l'activité enzymatique est exprimée en milli-unités par millilitre d'hémolymph; 1 mU/ml = 1 nmole de substrat converti/1 min. x ml d'hémolymph).

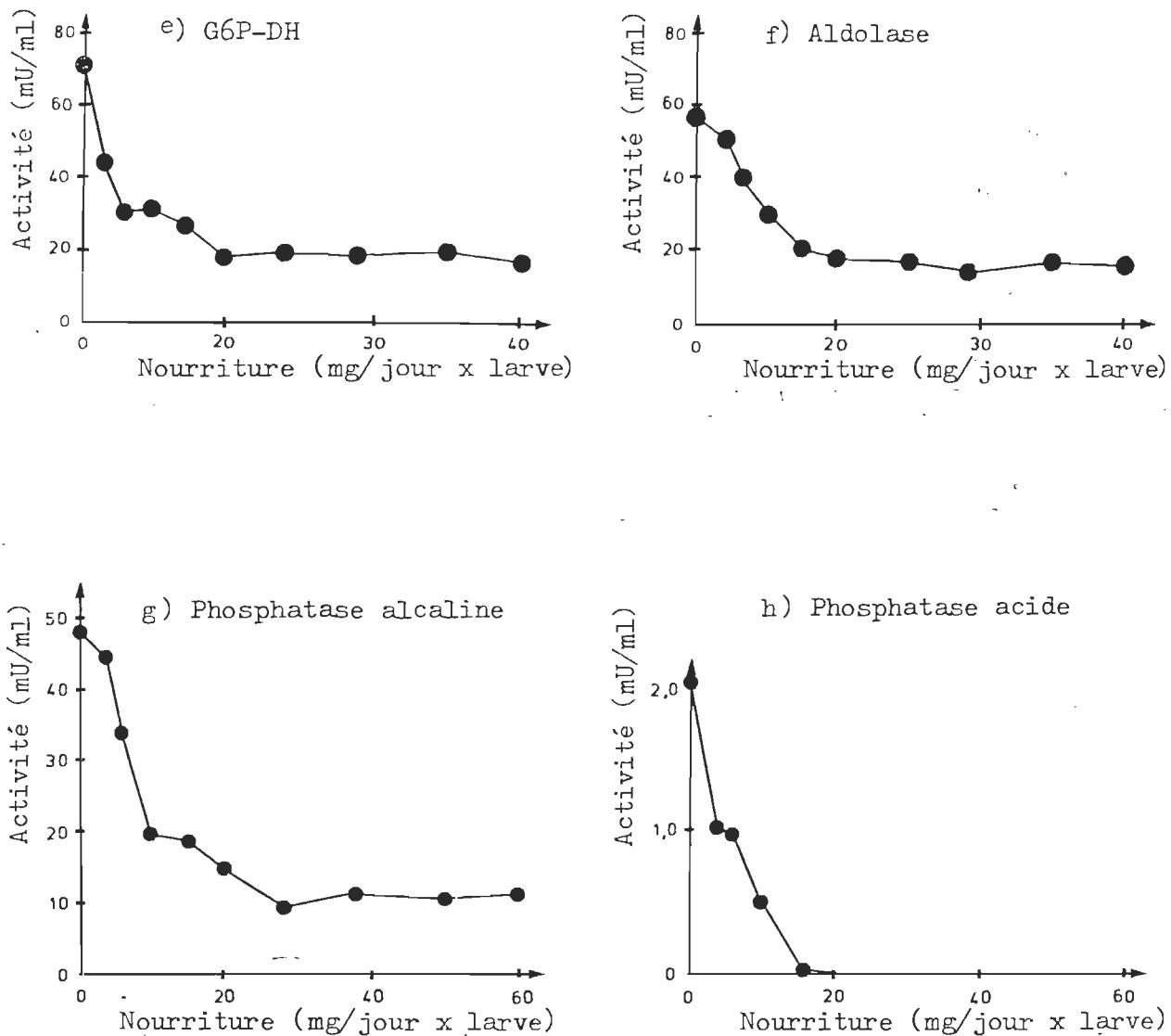


Figure 10b. Influence de la quantité de nourriture ingérée sur l'activité de quelques enzymes dans l'hémolymph de larves du Ve stade après 16 jours d'alimentation contrôlée (l'activité enzymatique est exprimée en milli-unités par millilitre de d'hémolymph; 1 mU/ml = 1 nmole de substrat converti/1 min. x ml d'hémolymph).

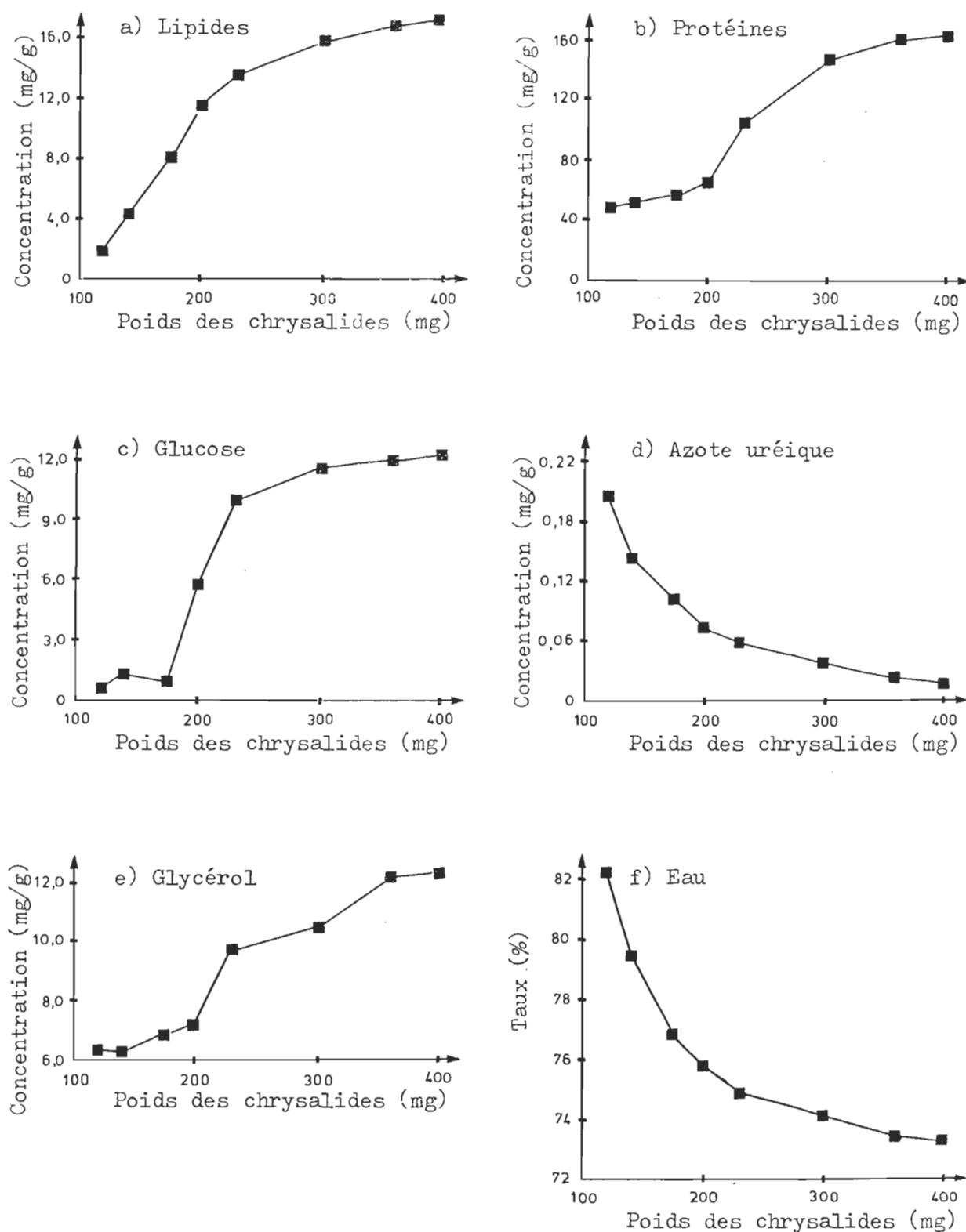


Figure 11. Influence du poids des chrysalides sur leur contenu en constituants énergétiques et en métabolites.

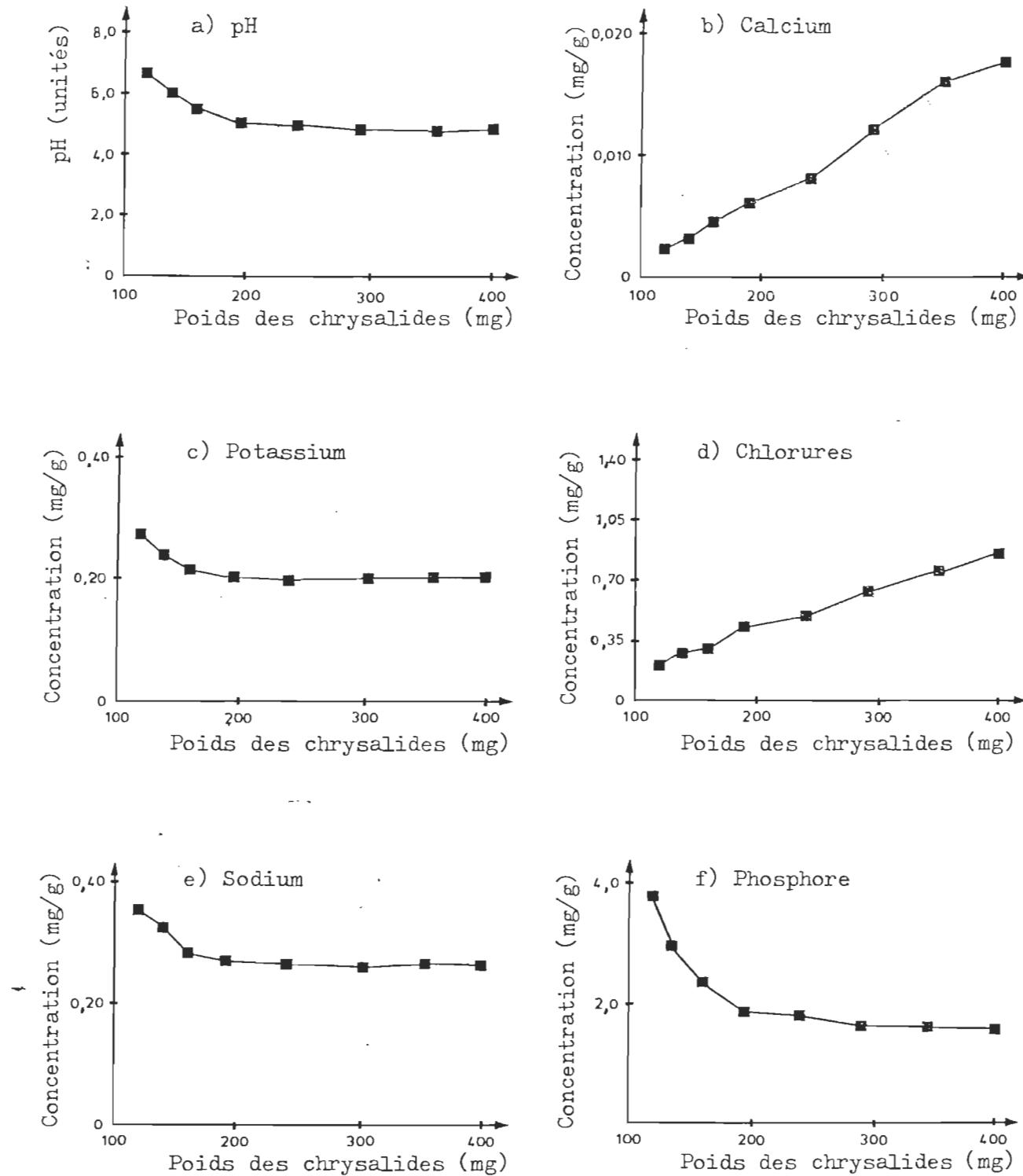


Figure 12. Influence du poids des chrysalides sur le pH et la concentration en minéraux de leur contenu.

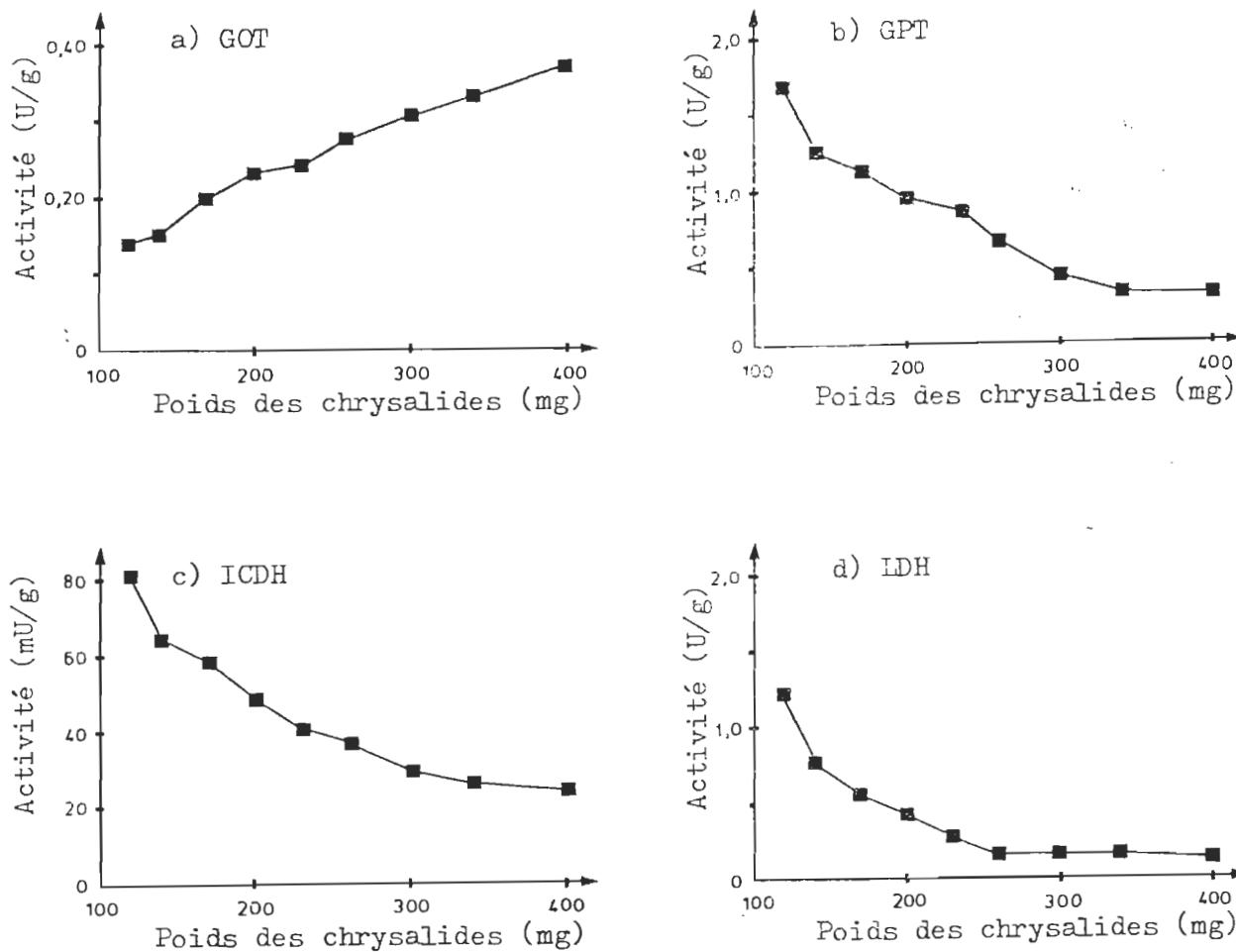


Figure 13a. Influence du poids des chrysalides sur l'activité enzymatique de leur contenu. L'activité enzymatique est exprimée en milliunités par gramme ou en unités par gramme de chrysalide;

$$1 \text{ U/g} = \frac{1 \text{ nmole de substrat converti}}{1 \text{ min.} \times \text{gramme de chrysalide}}$$

$$1 \text{ mU/g} = \frac{1 \text{ nmole de substrat converti}}{1 \text{ min.} \times \text{gramme de chrysalide}}$$

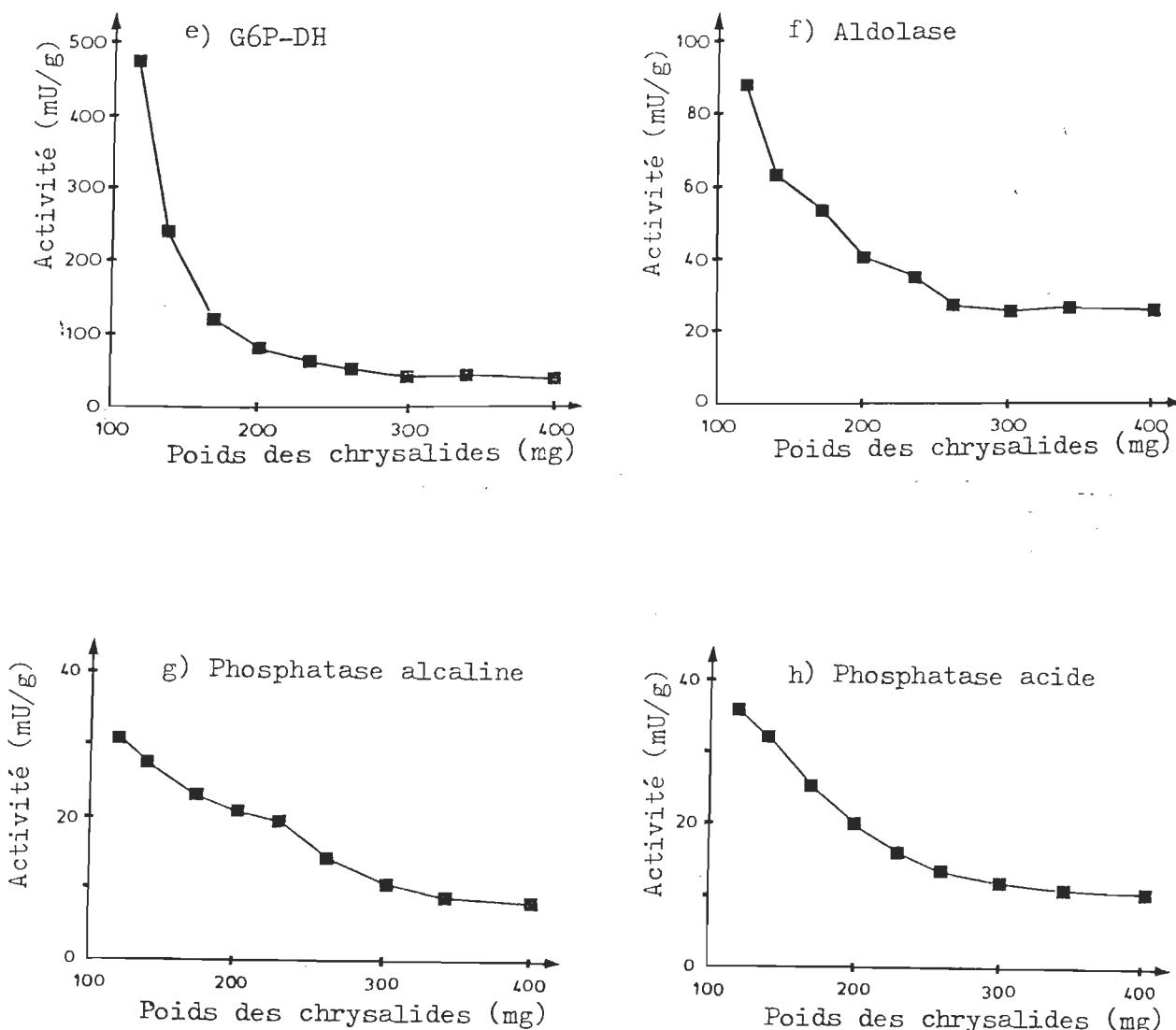


Figure 13b. Influence du poids des chrysalides sur l'activité enzymatique de leur contenu. L'activité enzymatique est exprimée en milliunités par gramme ou en unités par gramme de chrysalide;

$$1 \text{ U/g} = \frac{1 \text{ nmole de substrat converti}}{1 \text{ min.} \times \text{gramme de chrysalide}}$$

$$1 \text{ mU/g} = \frac{1 \text{ nmole de substrat converti}}{1 \text{ min.} \times \text{gramme de chrysalide}}$$

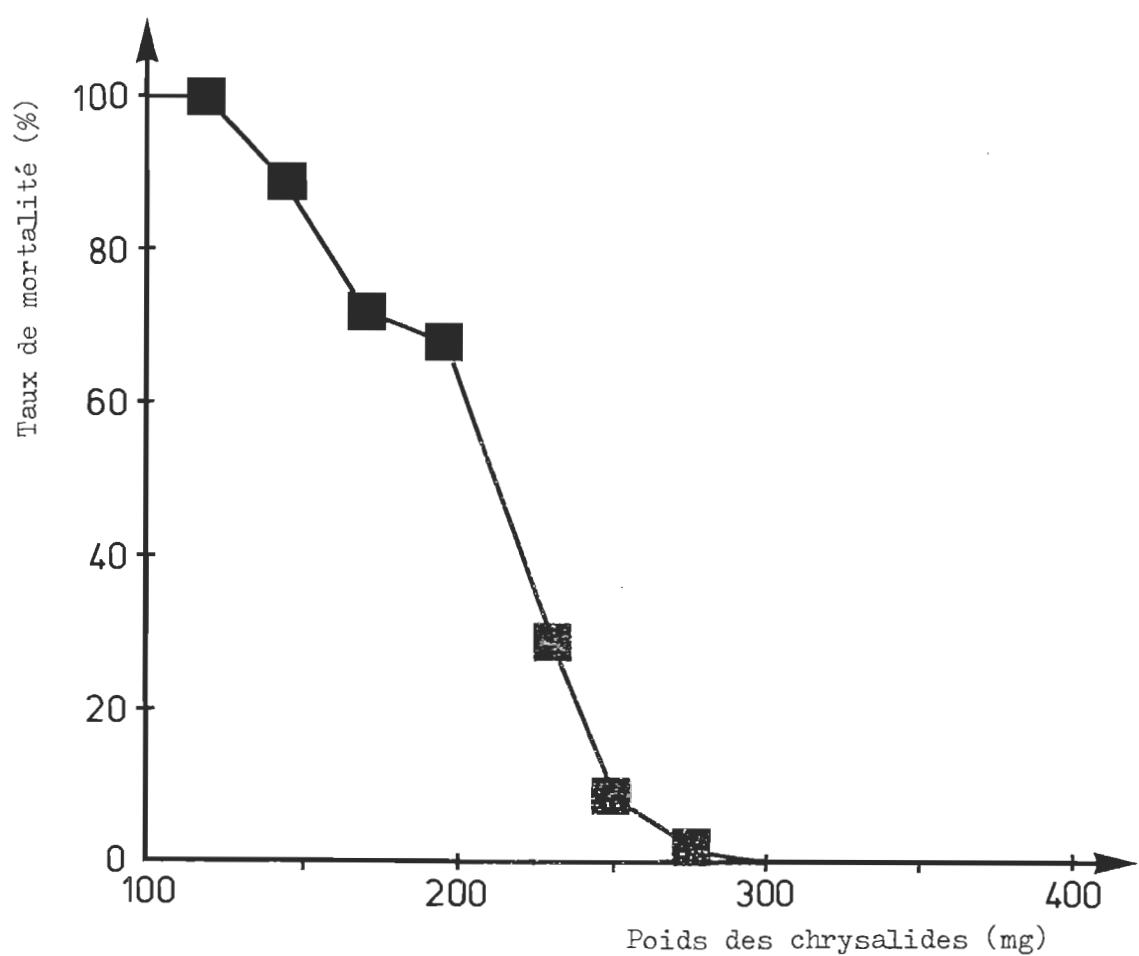


Figure 14. Influence du poids des chrysalides sur le taux de mortalité.

2) Discussion:

En terme de mortalité ou de perte de poids, la résistance de l'insecte à la sous-alimentation est fonction de l'âge larvaire, et à l'intérieur de cet âge et des précédents, de la quantité de l'apport nutritif reçu et de la température à laquelle ils ont été soumis (il a déjà été démontré que la qualité nutritive par exemple et que d'autres facteurs jouent aussi un rôle, mais nous n'énumérons ici que ceux sur lesquels notre étude a porté). De façon générale, les larves ayant été précédemment favorisées par l'alimentation présenteront face à des conditions alimentaires défavorables une meilleure capacité de résistance. Comme si cet avantage rendait plus efficace un mécanisme probablement enclenché en période alimentaire déficiente, ce qui expliquerait pourquoi les larves les plus lourdes semblent posséder un métabolisme mieux adapté permettant ainsi un taux de pertes plus faible en période défavorable. L'efficacité de ce mécanisme demeure toutefois évidente, car une sous-alimentation aigue, voir même l'inanition n'empêche pas l'insecte de conserver une activité apparente normale et ce jusqu'à un ou deux jours avant la mort. Cette faculté est connue chez un grand nombre d'arthropodes: chez les insectes suceurs de sang tel que Rhodnius prolixus (Buxton, 1932), mais elle existe aussi chez les phytophages comme le Doryphore (Grison et Le Berre, 1953) ainsi que chez les scorpions (Millot et Vachon, 1949), chez les serpents (Brand et al., 1957) et les coléoptères comme Platysma vulgare L. (Cornic, 1974). De plus, l'accentuation de l'activité après quelques jours d'inanition peut s'identifier à une recherche intense de nourriture comme l'a déjà montré Grüm (1966).

On peut constater que quelque soit l'état physiologique de l'insecte, la température a une action déterminante sur la durée de survie. Une élévation de la température du milieu d'élevage des larves en inanition provoque une baisse de la résistance au jeûne (perte de poids plus rapide, temps léthal médian plus faible). Cela est probablement dû à ce que une élévation de température entraîne une élévation de l'activité larvaire et du métabolisme, par le fait même il y a une augmentation de la mobilisation des réserves énergétiques ainsi que de la durée et du rythme d'ouverture des stigmates, provoquant ainsi une diminution plus rapide des réserves énergétiques et de la quantité d'eau. Ce qui induirait un déséquilibre léthal plus rapide pour des températures d'élevage supérieures. Baud (1973) et Cornic (1974) ont déjà fait des observations similaires respectivement pour Bombyx mori et pour Platysma vulgare. De plus, une fluctuation journalière de la température de 4°C ajoutée à une phase lumineuse (au biotron; 14°C pendant 19 heures et 18°C pendant 5 heures avec une phase lumineuse de 12 heures centrée sur la période de haute température) a un effet activant sur l'insecte et comparativement à un nombre supérieur de degré-jour mais à température constante (milieu d'élevage à 18°C), la résistance au jeûne de l'insecte est plus faible. Chauvin (1956) a déjà rapporté qu'une fluctuation journalière de 10°C avait un pouvoir activateur sur la croissance et le développement de divers insectes. Dans ce cas, l'insecte, ayant donc un métabolisme et une activité plus intense, aura une résistance plus faible en période de jeûne comparativement à un milieu d'élevage étant à un même nombre de degré-jour mais à température constante.

L'administration journalière de quantités constantes de nourriture de zéro mg à des quantités correspondant à l'alimentation normale, sous diffé-

rentes températures, nous montre la présence de deux phases séparées par un point critique dans le rendement de croissance en fonction de la nourriture ingérée (figure 4). Cela peut s'expliquer par la présence de l'influence de deux facteurs, la température et la quantité de nourriture assimilée sur le poids de l'insecte. Ainsi pour des quantités de nourriture ingérée près de la normale (au dessus du point critique qui est de 6 mg de nourriture pour le IV^e stade et de 10 mg pour le Ve stade), la température a un effet marqué, créant une augmentation du rendement de croissance. Cette augmentation peut s'expliquer par un meilleur rendement énergétique, une meilleure transformation ou absorption de la nourriture ingérée. Ceci peut se faire au niveau des matières solides ou à celui de l'eau. Comme nous le montre la figure 5, il n'y a pas de différences d'absorption significatives des matières solides. Il reste donc la possibilité d'une plus forte absorption d'eau et une meilleure transformation des substances absorbées. Une plus forte absorption de l'eau est fort plausible si l'on considère qu'à une température plus élevée, l'activité de l'insecte est plus intense et les besoins sont plus grands. Il ne faut pas oublier que les pertes d'eau sont aussi fonction de l'activité larvaire. Donc il faut un bénéfice en eau entre les entrées et les sorties pour obtenir un gain de poids. Quant à la meilleure transformation ou au meilleur rendement énergétique de la nourriture, cela reste à démontrer. Au point critique, l'influence de la faible quantité de nourriture ingérée devient primordiale et rend négligeable l'effet de la température. Ce qui signifie que probablement la quantité de nourriture ingérée à ce point est tellement faible que quelque soit la température, l'assimilation de la nourriture est à son maximum d'où l'on dénote aucune différence dans le rendement de croissance. Pour des quantités de nourriture inférieures à celles du point critique, le

processus en rendement de croissance s'inverse selon la température. La nourriture ingérée étant insuffisante pour fournir une quantité minimale critique d'éléments essentiels au maintient de l'organisme, le mécanisme de survie est ainsi enclenché. Le surcroît d'activité de l'insecte à de plus hautes températures nécessitant un apport énergétique plus grand et des pertes (eau, etc.) plus fortes entraîne une chute du poids plus rapide. Ce qui expliquerait l'inversion du rendement de croissance pour des quantités de nourriture au dessous du point critique.

La quantité de nourriture ingérée influence fortement le temps de maturation d'un stade (figure 6). Ainsi, plus la quantité de nourriture assimilée augmente, plus le temps de maturation est court. Les larves n'ayant pas assez accumulé de réserves ou ne s'étant que très peu alimentées meurent sans maturer leur stade et sans passer à l'état chrysalide. Il faut donc, dépendant des conditions nutritionnelles précédentes, une quantité totale minimum de nourriture ou de réserves énergétiques afin que l'insecte puisse changer de stade. Ce qui porterait à soupçonner la présence de récepteurs et/ou d'un mécanisme déclenchant la mue lorsque la quantité d'éléments énergétiques accumulés ou absorbés est suffisante ou encore d'un mécanisme d'inhibition effectif en présence d'un faible taux d'éléments énergétiques ou de désorganisation dû à ce faible taux d'éléments énergétiques.

Nos résultats confirment la chute des éléments énergétiques de réserve et de transition que plusieurs chercheurs ont déjà démontré chez d'autres insectes en présence de l'inanition (Leclercq, 1949; Niemerko et Cepelewicz, 1950; Newton, 1954; Hill et Goldsworthy, 1970; Baud, 1972; Schwalbe et Baker, 1976; Sugden et al., 1976). Ces auteurs ont déduit leurs conclusions en me-

surant principalement le taux de lipides, de protéines et du glycogène dans l'organisme entier de l'insecte. En plus d'ajouter l'effet de la sous-alimentation, la majorité de nos recherches et de nos comparaisons des éléments énergétiques a porté sur l'hémolymphé de l'insecte. Nous n'avons mesuré que le taux de lipides et d'eau dans l'organisme entier. Nous avons aussi ajouté l'investigation dans l'hémolymphé de quelques métabolites, minéraux et enzymes. Ces résultats nous permettront non seulement d'apporter des nuances au niveau des éléments énergétiques, mais aussi de préciser les mécanismes et le rôle de divers éléments chez cet insecte lors d'une déficience alimentaire plus ou moins prononcée.

Ainsi, dans l'hémolymphé des larves après 16 jours d'alimentation contrôlée, la concentration des lipides, du glucose, du glycérol et des protéines diminue avec la diminution de la quantité de nourriture administrée. Cependant, nous remarquons que contrairement au glucose et aux protéines, les lipides et le glycérol diminuent de façon assez continue avec la diminution de la quantité de nourriture assimilée (figure 7). Le fait que la concentration du glucose demeure relativement constante jusqu'à une absorption journalière de nourriture aussi faible que 20 mg/larve x jour, est probablement dû à ce que le glucose est un élément intermédiaire dans la chaîne énergétique et que tant que les réserves de glycogène sont suffisantes, elles servent à maintenir la quantité de glucose stable dans le sang de l'insecte. Cela expliquerait la stabilité du glucose dans l'hémolymphé même sous l'effet d'une sous-alimentation aigüe. De même, la concentration des protéines est assez stable pour n'accuser une chute de la concentration qu'à des administrations journalières inférieures à 20 mg/larve x jour de nourriture. Cette chute soudaine de la concentration des protéines n'est

pas seulement due à une consommation des protéines comme élément énergétique. De fait cette chute peut être due à une conversion des protéines en acides aminés afin de soutenir la pression osmotique ou encore pour jouer le rôle de tampon dans l'hémolymphé (Bishop, 1923; Eabers, 1941; Pepper et al., 1941; Beadle et al., 1950). Car selon Polimenti (1915) et Wigglesworth (1938) la chute de la concentration des éléments énergétiques entraîne une diminution de la pression osmotique. De même, la diminution de la concentration du glucose est reliée à une déficience en oxaloacétate qui provoque selon divers mécanismes relatés par Blackshear et al. (1975) un ralentissement de l'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs causant ainsi une élévation de la concentration de l'acétyl-CoA qui se condensera pour former les corps cétoniques qui acidifieront l'hémolymphé (Heimpel, 1955). La seule évaluation du taux de protéines ne nous permet pas de dire précisément l'utilisation des réserves protéiques. Par contre, l'élévation de la concentration de l'azote uréique provenant généralement du catabolisme des acides aminés peut indiquer l'utilisation énergétique des protéines. Toutefois, l'urée a la propriété de provoquer la dénaturation des protéines, ce qui peut expliquer la chute excessive du taux de protéines dans l'hémolymphé. L'accumulation de la quantité d'azote uréique vient d'une production supérieure à la capacité d'élimination de cet élément par la larve. Cette accumulation débute pour des quantités de nourriture inférieures à 36 mg/larve x jour et elle s'accentue en fonction de la diminution de l'alimentation journalière. De façon générale, tout comme dans le cas de beaucoup d'insectes, Malacosoma disstria sous-alimenté utilisera ses sucres, ses lipides et probablement une partie de ses protéines pour combler le déficit alimentaire. Le taux d'utilisation dépend de ses besoins énergétiques et de l'apport nutritionnel reçu.

L'eau prend une grande place parmi les constituants de la larve et sa teneur augmente chez certains insectes tel que Bombyx mori (Baud et al., 1966) et Tribolium (Chaudhary et al., 1964) lorsqu'ils sont soumis à l'ina-nition. Il en est de même chez Malacosoma (figure 8b). L'eau tient environ 80% du poids total de la larve normale et ce taux reste constant même après 16 jours d'alimentation avec des quantités aussi faibles que 20 mg/larve x jour. Les larves ayant reçu journalièrement cette quantité de nourriture pè-sent moins de la moitié du poids normal, ce qui signifie que ces dernières ont en quantité absolue, deux fois moins d'eau que les larves normales. Au même titre que les éléments énergétiques, l'eau peut être considérée comme une substance de réserve qui permet de résister en période défavorable. Les pertes d'eau sont fonction de l'activité larvaire et du milieu dans lequel elles se trouvent. Ainsi, si l'apport en eau n'est pas suffisant pour com-blir les pertes de fonctionnement, il y aura diminution de la quantité tota-le d'eau chez la larve. Cette diminution vient vraisemblablement de l'hémo-lymphe, car il doit être plus facile d'éliminer l'eau de l'hémolymphe que l'eau liée à moins que la présence encore non fondée d'une hormone antidiu-rétique. Suite à ce déficit en eau, il doit y avoir une élimination des minéraux afin d'éviter une concentration démesurée de ces derniers. Dans les cas aigus (larves ayant reçu moins de 20 mg/larve x jour de nourriture) où le déficit horaire en eau est très important et comme l'élimination des minéraux est sans doute plus lente que celle de l'eau, il survient un point critique où l'élimination des minéraux ne peut suivre le mouvement. Il s'en suit une rétention d'eau afin de minimiser la concentration des miné-raux ou de d'autres éléments difficiles à éliminer. Nous ne pouvons toute-fois pas dire si cette rétention d'eau est associée à un changement de per-

méabilité, à un contrôle hormonal ou simplement osmotique.

Comme nous en avons discuté auparavant, le pH de l'hémolymphé s'abaisse et cette acidification ne s'effectue que lorsque la quantité de glucose dans l'hémolymphé n'est plus suffisante pour maintenir le métabolisme de la larve, dès lors les réserves lipidiques ne brûlent plus au feu des sucres et il s'en suit une élévation de la concentration des corps cétoniques qui acidifie l'hémolymphé. Dans le cas des larves ayant reçu journalièrement chacune moins de 20 mg de nourriture, il y a une élévation de la concentration des minéraux (figure 9). L'élévation de la concentration n'est pas uniforme; le calcium et les chlorures augmentent fortement, tandis que le potassium, le sodium et le phosphore n'augmentent que très peu. Ce qui suppose des modes différents de contrôle ou une plus grande facilité d'éliminer le potassium, le sodium et le phosphore.

Nous pouvons aussi dénoter pour les larves ayant reçu moins de 20 mg/larve x jour, une élévation généralisée de l'activité des enzymes des voies énergétiques (figure 10). Généralement, une élévation de l'activité enzymatique est traduite par les enzymologistes cliniques comme étant un signe de dommages tissulaires, mais cela peut aussi être le reflet d'une altération métabolique cellulaire sans être reliée à un dommage tissulaire. De plus cela peut être aussi dû à une relocalisation enzymatique ou encore pour maintenir stable le taux de transformation du métabolisme de l'insecte. On ne sait pas si ces enzymes sont sujettes à une régulation allostérique, mais le manque de substrat est aussi une cause plausible de l'augmentation de l'activité enzymatique. Wimhurst et Manchester (1970) ont déjà constaté une élévation de l'activité des enzymes de la gluconéogénèse dans le foie

du rat soumis à plus de trois jours d'inanition et ils relient cette élévation à la diminution de la disponibilité du substrat. Il est fort probable qu'une élévation de l'activité enzymatique cellulaire puisse avoir des répercussions sur l'hémolymphé de l'insecte.

L'investigation de ces mêmes éléments dans le contenu total des chrysalides obtenues en continuant les régimes alimentaires, nous permet de voir que les perturbations provoquées par la sous-alimentation dans l'hémolymphé des larves se répercutent dans l'organisme entier de la chrysalide à quelques exceptions près. Ainsi, bien que dans l'hémolymphé des larves sous-alimentées la concentration des minéraux augmente plus ou moins et que le pH s'acidifie, dans le contenu des chrysalides sous-alimentées, la concentration du calcium et des chlorures diminue, celle du potassium, du sodium et du phosphore augmente, puis le pH s'alcalinise (figure 12). L'activité larvaire s'accompagne de pertes d'eau et lorsque l'alimentation est insuffisante pour combler ces pertes, il s'en suit un déficit en eau. Pour éviter une concentration des minéraux, il faut donc que cette déficience en eaux s'accompagne d'une élimination des minéraux. Le fait que l'on constate chez la chrysalide une diminution linéaire de la concentration du calcium et des chlorures tandis que le potassium, le sodium et le phosphore conserve une certaine stabilité et n'accuse qu'une élévation relativement légère, suppose des mécanismes différents de régulation. La stabilité des trois derniers minéraux suppose un mécanisme de sécrétion actif tandis que les autres ions ne sont pas régularisés et sont indiscriminablement éliminés, ce qui explique la chute linéaire de leur concentration. Le phosphore demeure toutefois un cas spécial. La concentration mesurée correspond à la quantité de phosphore totale (lié et non lié) dans le contenu des chrysalides. Comme une partie

du phosphore se retrouve à l'état lié et que l'élimination des substances de haut poids moléculaire est très difficile, le contrôle de la concentration de celui-ci peut se faire par l'équilibre entre le phosphore lié, nécessaire au fonctionnement de l'insecte et le phosphore libre qui lui serait indiscriminablement éliminé tout comme le calcium et les chlorures.

Pour l'activité enzymatique dans le contenu des chrysalides, elle augmente pour tous les enzymes tout comme dans l'hémolymphé des larves sous-alimentées à l'exception de la GOT qui présente une diminution linéaire. Nous ne pouvons pas expliquer le pourquoi de la diminution de la GOT dans le contenu des chrysalides sous-alimentés (figure 13a).

Nos investigations ne nous permettent que d'entrevoir les mécanismes qui entrent en jeu lorsque l'insecte est soumis à la sous-alimentation ou à l'inanition. Nous pouvons en ressortir qu'il existe un équilibre entre les besoins et les apports nutritifs. Lorsque ces derniers sont en surplus, il y aura mise en réserve des éléments énergétiques, mais lorsque les apports nutritifs sont insuffisants pour satisfaire les besoins, l'insecte puise ses ressources à même ses réserves pour combler le déficit. Sa capacité de résistance est donc fonction de l'alimentation qu'il a reçue précédemment. C'est lorsque l'insecte ne parvient plus à combler ses déficits qu'il s'en suit un déséquilibre léthal. Il serait intéressant de découvrir quelles sont en définitive la ou les substances ou encore quel est le déséquilibre métabolique responsable de la mort de l'insecte en intensifiant les recherches au point critique juste avant la mort.

D'ores et déjà nous pouvons dire que chez un groupe de larves qui présente, suite à une sous-alimentation, une élévation de l'activité enzymati-

que et un faible taux de réserves énergétiques par rapport à la normale, il y aura une élévation du taux de mortalité et plus l'écart de la normale sera grand, plus le taux de mortalité sera élevé. Ce qui est cohérent si le phénomène alimentation est un équilibre apports-besoins et si l'on prélève des quantités équivalentes d'hémolymphe de chaque insecte afin que le résultat obtenu reflète bien une moyenne de l'équilibre de chaque insecte. Il en est de même pour la relation entre le métabolisme, les métabolites de la chrysalide et le taux de mortalité. Nous n'avons pas poussé plus avant la représentation de cette relation, car nous ne possédons pas assez de points étendus sur la partie de sous-alimentation léthale pour démontrer la relation avec précision. De plus il existe plusieurs autres méthodes pour évaluer la mortalité à la fin de l'état larvaire afin de déterminer le taux de population qui pourra éventuellement produire une génération suivante.

Il a déjà été prouvé que l'inanition sublétale en plus de présenter des effets immédiats, se répercute sur la génération ultérieure quantitativement et qualitativement (Baud, 1972). C'est sur cette portion viable de la population qu'il serait intéressant d'orienter nos futurs efforts. Comme d'autres auteurs l'ont déjà fait pour d'autres paramètres (Cragg, 1923; Woke, 1937; Baud, 1955; Grison, 1957; Witter et al., 1972.), il est certainement possible de relier le métabolisme des chrysalides avec la viabilité de la génération fille pour ainsi pouvoir déterminer le potentiel actif d'une population et ensuite prédir sommairement, à partir d'investigations biochimiques, le taux de population de la génération suivante. L'introduction de valences écologiques (rapport des résultats du stress en milieu naturel sur ceux du stress provoqué artificiellement en laboratoire) devrait nous permettre d'estimer le pouvoir de contrôle de la sous-alimen-

tation et de l'inanition sur une population.

Cette méthode biochimique d'approche d'évaluation du paramètre fluctuant de la capacité de résistance à la sous-alimentation d'une population face à une autre permet de faire un pas sur l'évaluation de stress subléthaux que seule la physiologie ne peut fournir..

Nos résultats montrent que si nous voulons relier la viabilité de la génération fille avec des paramètres biochimiques chez la chrysalide, il ne faudra utiliser que les réserves énergétiques, le calcium, les chlorures et l'activité de la GOT, car tous les autres paramètres biochimiques mesurés dans le cas d'un stress alimentaire subléthal demeurent stables. De même nous pourrions étudier l'effet du parasitisme qui sape les énergies de la larve et comparer avec la sous-alimentation dont les altérations sont similaires.

B. Infection bacillaire:

1) Résultats:

Suite à une mono-atomisation du feuillage avec une suspension de Bacillus thuringiensis var. Kurstaki à raison de $4 \text{ à } 5 \times 10^{-8}$ B.U.I./cm², nous avons placé sur ce feuillage sous les conditions d'élevage du biotron des larves de Malacosoma disstria au début de leur Ve âge par groupe de 10, 100, 500 et 1000 larves. Aussitôt, la grande majorité des larves cessèrent de manger et ne recommencèrent pas à s'alimenter même après le changement du feuillage infecté pour du feuillage non-infecté 24 heures plus tard. Les larves témoins dans des conditions expérimentales identiques se sont toujours alimentées normalement. Des études journalières du taux d'infection et de mortalité, nous ont permis de voir que le taux journalier maximum d'infection était de 11% obtenu le 6e jour et le taux total de mortalité dû à l'infection était de 27%. Nous avons toutefois obtenu une mortalité totale de 100%, la différence étant causée par l'inanition encourue par l'arrêt de l'insecte à s'alimenter. Des expériences similaires sur des larves mis en élevage individuellement et où nous avons noté si les larves avaient mangé durant la période de 24 heures pendant laquelle elles ont été mises en présence du feuillage infecté, nous permettent de présenter les faits suivants: les larves qui ont mangé (28 sur 300) meurent par l'infection du bacille après trois jours, les larves qui n'ont pas mangé meurent

en grande majorité après 11 jours à cause de l'inanition encourrue, les quelques cas infectés par le contact avec le feuillage meurent entre 5 et 11 jours.

A cause du faible taux d'infection et de l'importance prise par l'inanition, il serait difficile de caractériser les effets de l'infection. C'est pourquoi nous avons procédé par infection per os. Ensuite, nous avons placé les larves sur du feuillage non-infecté à la température du biotron et nous avons obtenu 100% de mortalité par infection environ 50 heures plustard. Les larves infectées durant cette période ne mangent pas, tandis que les larves témoins ayant reçu le même traitement avec de l'eau distillée s'alimentent normalement. Nous avons pu constater que le bacille, 30 à 35 heures après l'infection, provoque chez la larve une paralysie généralisée.

Des investigations biochimiques sur l'hémolymphe des larves durant l'infection contre témoin à 24, 36 et 48 heures nous ont donné les résultats présentés dans le tableau II et III. Durant cette période de 48 heures, la concentration des lipides, du glucose et du glycérol demeure stable, seule la concentration des protéines diminue et celle de l'azote uréique augmente fortement. La concentration des minéraux commence à être perturbée rapidement soit 24 heures après l'infection et cela s'accentue avec le temps. Ce sont les chlorures qui présentent la plus faible augmentation, tandis que la quantité de sodium, de potassium, et de phosphore doublent de concentration après 48 heures. Contrairement aux autres ions, le calcium diminue au lieu d'augmenter (tableau II). Le pH s'en trouve affecté et après 48 heures, il passe de 7,1 à 8,4 tandis que l'activité des enzymes reste stable à l'exception de la G6P-DH qui augmente un peu (tableau III).

TABLEAU II

Variations de quelques constituants énergétiques et de quelques minéraux dans l'hémolymphé de larves du Ve stade infectées par Bacillus thuringiensis (infection per os).

Temps après l'infection (heures)	LIPIDES (mg/ml)		PROTEINES (mg/ml)		GLUCOSE (mg/ml)		AZOTE UREIQUE (mg/ml)		GLYCÉROL (mg/ml)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
24	5,4	5,1	62	42	1,7	1,4	0,64	1,78	4,7	5,5
36	4,8	4,5	65	38	1,5	1,5	0,70	1,90	5,7	5,9
48	5,3	4,6	59	13	1,3	1,6	0,61	1,64	5,0	5,4

Temps après l'infection (heures)	CALCIUM (mg/ml)		SODIUM (mg/ml)		POTASSIUM (mg/ml)		CHLORURES (mg/ml)		PHOSPHORE (mg/ml)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
24	0,48	0,24	2,6	2,9	9,7	17,6	4,6	5,3	4,3	9,6
36	0,54	0,10	2,8	5,7	10,3	32,5	4,9	6,0	4,8	13,8
48	0,49	0,10	2,7	5,9	9,9	37,2	4,6	5,8	3,8	11,2

TABLEAU III

Variations du pH et de l'activité enzymatique dans l'hémolymphde larves du Ve stade infectées par
Bacillus thuringiensis (infection per os).

Temps après l'infection (heures)	pH (unités)		GOT (mU/ml)		GPT (mU/ml)		ICDH (mU/ml)		LDH (mU/ml)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
24	7,0	7,8	53	52	3,7	2,0	6,4	5,2	6,0	6,5
36	7,4	8,1	61	41	3,4	1,5	5,3	5,0	6,8	6,4
48	7,1	8,4	58	43	2,9	1,8	5,0	5,0	6,3	6,6

Temps après l'infection (heures)	PHOSPHATASE ALCALINE (mU/ml)		PHOSPHATASE ACIDE (mU/ml)		G6P-DH (mU/ml)		ALDOLASE (mU/ml)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
24	6,1	6,3	négl.	négl.	19	24	14	11
36	6,9	6,5	négl.	négl.	21	31	17	10
48	5,8	5,9	négl.	négl.	18	31	13	10

1) L'activité enzymatique est exprimée en milliuunités par millilitre; 1 mU/ml = $\frac{1 \text{ nmole de substrat converti}}{1 \text{ min.} \times 1 \text{ ml d'hémolymphde}}$

2) Discussion:

L'absorption par Malacosoma disstria d'une suspension de spores et de δ -endotoxines de Bacillus thuringiensis provoque une mort rapide par toxi-caemia du cristal. Car chez les lépidoptères, le pH de l'intestin excède généralement 9,0 ce qui inhibe la germination des spores. Ainsi, dans une ingestion simultanée de spores et de cristaux, l'action toxique des cristaux sera privilégiée et entraînera une diminution du pH jusqu'à la neutralité afin de permettre ultérieurement la prolifération de spores dans l'intestin (Heimpel, 1955; Heimpel et Angus, 1959).

En atomisant le feuillage d'une suspension de Bacillus thuringiensis et en alimentant les larves avec ce feuillage, nous ne sommes pas parvenus à obtenir un taux d'infection satisfaisant pour permettre de bien caractériser les effets de l'infection sur le métabolisme de la larve. Seulement 9% des larves s'alimentaient du feuillage alors que chez les témoins et chez les larves alimentées avec du feuillage traité avec une suspension de virus, elles se nourrissaient normalement. Nous ne voyons que la possibilité d'une répulsion à la suspension puisque les larves provenaient de mêmes échantillons de population, que le feuillage avait été prélevé en même temps sur un même arbre et que tous les deux ont subi les mêmes conditions de laboratoire. Nous avons donc effectué une infection per Os.

Les sites et les modes d'action des δ -endotoxines du Bacillus thuringiensis sont encore obscures et plusieurs théories ont été proposées pour

expliquer les mécanismes de ses effets pathologiques (Chance et Williams, 1955; Heimpel et Angus, 1959; Ramakrishnan, 1967; Cooksey et al., 1969; Louloudes et Heimpel, 1969; Angus, 1970; Fast et Donaghue, 1971; Lüthy, 1973; Narayaman et al., 1974; Faust et al., 1974; Travers et Faust, 1976).

Nos investigations biochimiques sur l'hémolymphé des larves infectées par rapport aux larves saines apportent des éléments nouveaux tout en réaffirmant les résultats obtenus par d'autres auteurs.

Les légères variations de la concentration des lipides, du glucose et du glycérol peuvent être le résultats du début de l'inanition car l'insecte cesse de s'alimenter à cause de l'infection. Par contre la forte chute de la concentration des protéines et la forte élévation de la concentration de l'azote uréique ne peuvent pas être seulement la conséquence d'un début d'inanition, car le taux des autres éléments n'ont pas été suffisamment affectés pour justifier ces variations. Toutefois, nous avons dénoté dans l'hémolymphé la présence de cristaux complets et partiellement digérés qui ont la propriété de faire précipiter les protéines de l'hémolymphé (Faust et Dougherty, 1968). Ces protéines auraient donc été éliminées lors de la centrifugation préparative des échantillons ou elles seraient dégradées par l'organisme de l'insecte ce qui expliquerait la forte élévation de la concentration de l'azote uréique qui ne peut être seulement due à un début d'inanition.

La concentration des minéraux est perturbée par la toxémie; le taux de calcium chute tandis que celui du sodium, du potassium, des chlorures et du phosphore augmente. Le passage de l'impulsion nerveuse dans le nerf résulte du mouvement des ions intérieurs et extérieurs de l'axon. Par le fait

même, cette impulsion dépend de la concentration des ions du milieu dans lequel baigne l'axon (Treherne et Beament, 1965). Ainsi une baisse extérieure de la concentration du calcium produit une dépolarisation progressive de la membrane et un blocage nerveux complet (Chapman, 1972). Il en est de même pour le potassium lorsque sa concentration extérieure augmente, la tendance pour le potassium de migrer à l'extérieur de l'axon diminue et il s'en suit une réduction du potentiel de membrane et un complet blocage nerveux d'où la paralysie généralisée que nous avons dénoté. Inversement l'élévation du niveau de sodium dans le médium extérieur augmente le potentiel d'action. Que ce mouvement du sodium soit une réponse de l'organisme pour contrebalancer les effets des variations du calcium et du potassium ou le résultat de la cytolysé dénoté par plusieurs auteurs (Ramakrishnan, 1967; Cooksey et al., 1969; Louloude et Heimpel, 1969), ce mouvement n'est toutefois pas suffisant car le sodium ne double pas de concentration tandis que le calcium devient près de cinq fois moins concentré et le potassium se concentre près de quatre fois. Cependant nos résultats contredisent le postulat de Travers et Faust (1976) qui se basant sur l'élévation de la concentration du potassium proposent que c'est à cause du découplage de la phosphorylation oxydative entraînant un manque d'énergie pour maintenir l'intégrité osmotique. Si tel était le cas, nous aurions une chute de la concentration du sodium et non une élévation. Car si le manque d'énergie est valable pour les mécanismes actifs du transport du potassium, il devrait l'être aussi pour ceux du sodium et ce dernier aurait alors tendance à diminuer dans l'hémolymphe. Nous ne pouvons toutefois pas dire si ces perturbations sont dues à l'action directe des toxines sur les membranes où si elles sont les effets secondaires d'une inhibition ultérieure. L'augmentation relativement faible de la concentration des chlorures peut être une réponse anion-

nique pour combler l'élévation de la concentration des cations dans l'hémolymphé. Quelque soit la réponse de l'organisme de l'insecte pour combattre les effets toxiques, elle s'en trouve limitée par l'inanition qu'entraîne l'ingestion de la suspension, contraignant ainsi l'insecte à puiser à même ses propres ressources très limitées. L'élévation de la concentration du phosphore dans l'hémolymphé peut s'expliquer par la proposition de Traverst et Faust (1976) du découplage de la phosphorylation oxydative rendant ainsi un plus grand nombre de phosphates libres pouvant traverser facilement la membrane et se retrouver dans l'hémolymphé en plus grande quantité, sans toutefois que cette baisse d'énergie ne soit à court terme suffisante pour ne pas être comblée ou pour ne pas fournir les besoins minimaux de l'insecte. De plus, il y a une élévation marquée du pH de l'hémolymphé, élévation qui peut elle aussi causer la paralysie selon les constatations faites par Heimpel et Angus (1959) en injectant un tampon alcalin non-toxique. Pour terminer, le métabolisme de la glycolyse ne semble pas affecté car il n'y a pas de variations importantes de l'activité enzymatique à l'exception de la G6P-DH qui passe de 20 à 31 mU/ml. Cette légère élévation peut s'expliquer par l'augmentation du métabolisme de la chaîne respiratoire constatée par Faust et al. (1974) suite au découplage de la phosphorylation (Travers et Faust, 1976), puisque la G6P-DH détourne la dégradation glycolitique vers le cycle des pentoses producteur de réducteurs pour la chaîne respiratoire mitochondrienne.

La comparaison des résultats relatifs aux perturbations d'ordre biochimique provoquées par l'infection bacillaire chez Malacosoma avec ceux obtenus par Smirnoff et Valéro (1972) chez Choristoneura fumirana, nous permettent de faire une distinction par ces investigations biochimiques

entre les deux modes d'action d'infection bactérienne qui dans notre cas est une toxémie et dans l'autre une septicémie. De fait, Smirnoff et Valéro dénotaient une forte perturbation métabolique (augmentation de la GLDH et des phosphatases, diminution de l'ICDH et de l'aldolase) suite à l'infection avec une suspension de Bacillus thuringiensis par contre dans notre cas, l'activité de ces mêmes enzymes reste normale. Nous sommes donc en mesure par une simple investigation métabolique de distinguer ces deux mécanismes d'action de l'infection bacillaire. De plus, l'évolution de la maladie correspond aussi à un degré de désordre biochimique croissant. Il serait donc possible d'exploiter cette relation afin d'évaluer la santé larvaire par les modifications significatives de certains paramètres biochimiques.

C. Infection virale:

1) Résultats:

Suite à une mono-atomisation du feuillage à raison de $3,0 \times 10^3$ polyèdres/cm² du virus de Malacosoma disstria, nous avons placé sur ce feuillage à la température du biotron des larves de Malacosoma disstria par groupe de 10, 100, 500 et 1000.

Malgré la présence du virus, les larves continuent à s'alimenter.

Toutefois, à mesure que progresse l'infection, les larves diminuent leur taux journalier d'alimentation et par rapport aux témoins, leur poids moyen devient inférieur de plus d'une centaine de milligrammes. Pour les larves qui survivent à l'ingestion du virus, leur temps de maturation du Ve stade est allongé d'une quinzaine de jours. Pour les larves qui en meurent, on dénote que deux ou trois jours avant la mort une paralysie générale.

Dans l'hémolymphe, l'infection virale provoque peu de diminution de la concentration des éléments énergétiques et une augmentation de l'azote uréique (Tableau IV). La concentration des minéraux s'en trouve aussi perturbée et le pH devient acide (Tableau IV). De plus l'activité de toutes les enzymes dosées s'élève d'au moins huit fois dans la majorité des cas (Tableau V).

La figure 15 représente les taux moyens d'infection obtenus dans le temps et pour lesquels nous avons effectué des investigations biochimiques dans l'hémolymphe des larves.

TABLEAU IV

Variations de quelques constituants énergétiques, de quelques minéraux et du pH de l'hémolymphe de larves du Ve stade infectées par le virus de Malacosoma disstria par atomisation sur le feuillage.

Temps après l'infection (jours)	LIPIDES (mg/ml)		PROTEINES (mg/ml)		GLUCOSE (mg/ml)		AZOTE UREIQUE (mg/ml)		GLYCEROL (mg/ml)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
6	7,2	7,0	49	47	1,7	1,5	0,65	0,42	4,3	4,0
8	7,4	7,1	56	52	1,4	1,2	0,62	0,47	4,8	4,2
10	7,8	6,3	53	35	1,3	1,3	0,63	0,53	4,6	4,3
14	7,5	6,4	52	46	1,8	1,3	0,66	0,35	5,0	3,5
16	8,1	6,2	64	61	1,8	0,9	0,70	0,31	4,1	3,6
26	8,0	6,5	68	62	1,2	1,0	0,61	0,46	4,5	3,8

Temps après l'infection (jours)	CALCIUM (mg/ml)		POTASSIUM (mg/ml)		CHLORURES (mg/ml)		PHOSPHORE (mg/ml)		pH (unités)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
6	0,46	0,58	9,9	10,0	4,5	8,3	4,3	4,0	6,9	6,6
8	0,47	0,73	9,8	10,6	4,8	13,5	4,5	3,1	7,4	6,9
10	0,43	0,69	10,2	10,0	4,6	15,9	4,8	3,1	7,1	6,4
14	0,52	0,74	10,2	13,5	4,4	17,0	4,0	2,6	7,3	4,4
16	0,61	1,39	10,0	14,6	5,1	17,7	3,8	2,4	6,8	4,0
26	0,65	1,00	9,9	11,7	4,7	6,4	4,1	3,4	7,3	6,3

TABLEAU V

Variations de l'activité enzymatique dans l'hémolymphe de larves du Ve stade infectées par le virus de Malacosoma disstria par atomisation sur le feuillage.

Temps après l'infection (jours)	GOT (mU/ml)		GPT (mU/ml)		ICDH (mU/ml)		LDH (mU/ml)		PHOSPHATASE ALCALINE (mU/ml)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
6	58	95	3,2	12	4,8	75	5,1	11	11	35
8	50	172	3,8	40	5,3	220	6,3	28	13	50
10	47	240	3,0	36	8,1	250	6,0	40	9	90
14	61	515	4,1	95	3,2	230	6,9	61	11	60
16	70	1200	5,9	340	9,0	260	5,9	64	18	160
26	53	455	3,4	130	3,9	110	6,3	23	12	130

Temps après l'infection (jours)	PHOSPHATASE ACIDE (mU/ml)		G6P-DH (mU/ml)		ALDOLASE (mU/ml)	
	saines	infectées	saines	infectées	saines	infectées
6	négl.	2	11	40	13	21
8	négl.	15	16	70	16	55
10	négl.	14	12	126	11	64
14	négl.	38	19	148	15	67
16	négl.	52	18	226	18	102
26	négl.	43	18	135	11	38

1) L'activité est exprimée en milliuunités par millilitre; 1 mU/ml = $\frac{1 \text{ nmole de substrat converti}}{1 \text{ min.} \times 1 \text{ ml d'hémolymphe}}$

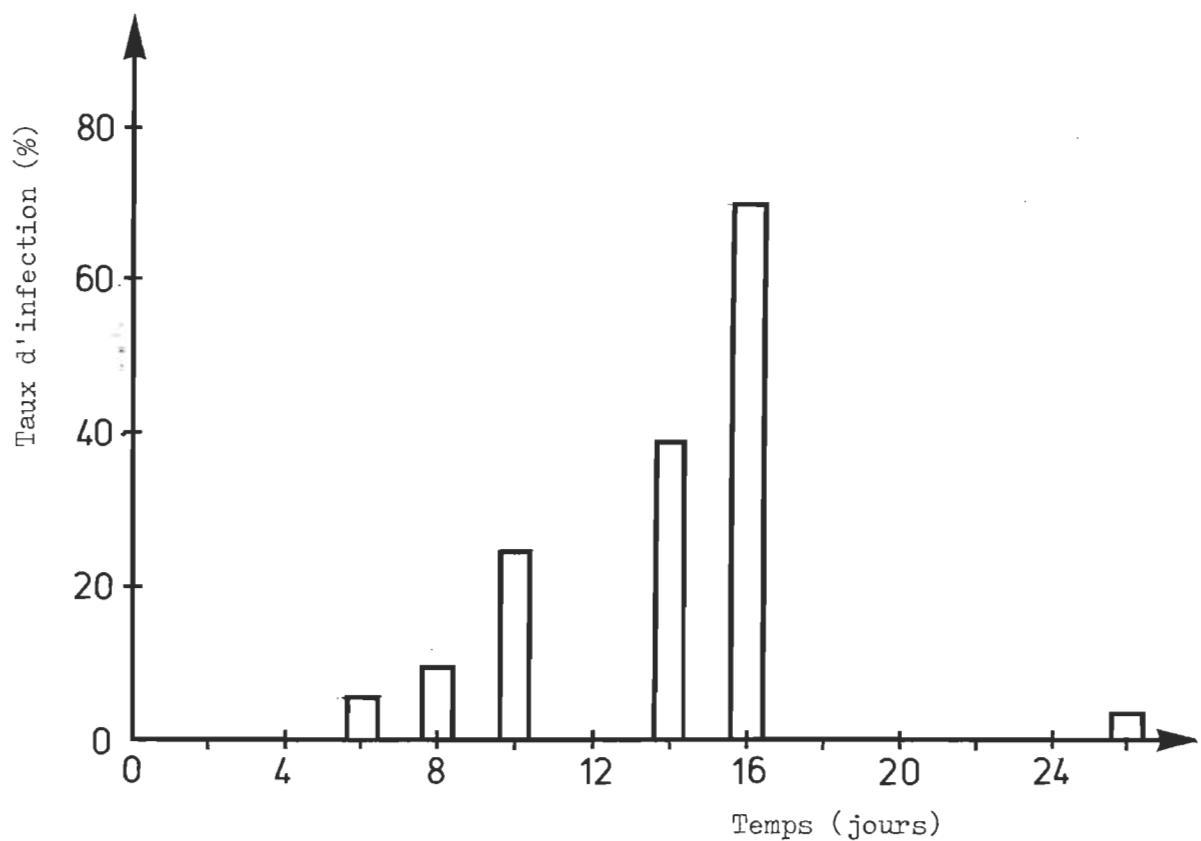


Figure 15. Taux d'infection des larves du Ve stade alimentées avec du feuillage atomisé avec le virus de Malacosoma disstria.

2) Discussion:

Dans le cas de l'infection virale chez Malacosoma, les auteurs ont surtout traité de la susceptibilité, de la virulence, de la transmission et des possibilités d'utilisation comme moyen de contrôle des populations (Bergol, 1951; Sippell, 1952; Clark, 1958; Stair, 1964, 1964a, 1965, 1965a, 1966) très peu de chercheurs se sont attardés aux effets biochimiques de l'infection virale chez cet insecte.

L'introduction artificielle de la polyédrose nucléaire influence dans une population, la mortalité, le taux de développement ainsi que le poids des larves et des pupes. Une des raisons du poids plus faible et de l'elongation du temps de maturation par rapport aux témoins est certainement la diminution de l'alimentation de l'insecte provoquée par l'ingestion du feuillage traité avec du virus. Ainsi les larves qui ne meurent pas suite à l'ingestion de feuillage traité présentent en plus d'une affection virale, des symptômes de sous-alimentation.

Les faibles diminutions des éléments énergétiques traduisent la sous-alimentation provoquée et la nature parasitaire obligatoire du virus. L'équilibre ionique est fortement perturbé ainsi que le pH, ce qui peut s'expliquer par l'intense cytolysé et l'entrée du contenu intestinal en plus du virus dans l'hémolymphe. Ces perturbations sont probablement à l'origine de la léthargie de l'insecte et de la paralysie provoquées quelques jours avant la mort. Des constatations similaires à celles portées précédemment pour l'infection bacillaire peuvent s'appliquer à l'infection

virale. De fait, la paralysie est aussi probablement causée par la forte perturbation des ions et du pH. Contrairement à l'infection bacillaire, il n'y a pas ici une augmentation marquée de la concentration du phosphore, ce qui laisserait à supposer qu'il n'y a pas de découplage de la phosphorylation oxydative. De plus, l'infection virale provoque une très forte élévation de l'activité glycolytique et du processus de dégradation et de restructuration des tissus. Ceci vient probablement fournir les éléments essentiels au virus parasite et pour restructurer la cytolysé qu'il provoque. Cette dernière est mise en évidence par la très forte augmentation de l'activité des transaminases. Dans les cas de comparaison possible, nous constatons que nos résultats sont similaires à ceux obtenus dans le cas de l'infection polyédrale de Néodiprion swainei (Smirnoff, 1973) et de Bombyx mori (Gowda et Ramaiah, 1976).

Il existe une certaine relation entre le taux d'insectes infectés (figure 15) et le degré de désordre biochimique (tableau IV et V). Si l'on compare dans le temps le taux d'infection de la population de larves et l'écart des paramètres biochimiques entre les larves saines et celles infectées, on remarque que de façon générale tous deux sont croissants jusqu'au 16ième jour et diminuent au 26ième jour.

CONCLUSION:

Les investigations biochimiques permettent d'être plus en mesure d'observer les corrélations existant entre différents facteurs que la physiologie seule ne permet pas de différencier, car elles permettent d'approfondir les effets aussi imperceptibles que ceux de l'hygrométrie (Nicolson et Horsfield, 1974), de la sous-alimentation, de la qualité de l'alimentation (House et Rollins, 1961) et de diverses infections subléthales.

Notre étude sur les variations des paramètres biochimiques dans l'hémolymphe et dans le contenu des chrysalides a permis de mettre en évidence les perturbations provoquées par différentes biopathologies et d'émettre des hypothèses quant à leurs mécanismes d'action. Notre but premier n'était pas d'élucider ces derniers, mais plutôt de connaître s'il y a ou non variation des éléments dosés, afin que dans des recherches subséquentes nous puissions utiliser ces données. Elles nous permettront dans le futur d'évaluer la santé d'une population d'insecte en étudiant le degré de désordre biochimique en relation avec l'évolution de la biopathologie, le taux d'individus affectés et les inhibitions résultantes.

Déjà, nous pouvons à partir d'investigations biochimiques distinguer si une population de Malacosoma subit l'effet d'une sous-alimentation, d'une infection virale ou bacillaire. De plus, nous pouvons grossièrement

qualifier son état de santé par rapport aux résultats obtenus lors de ce travail pour ainsi avoir une idée approximative de l'ampleur de l'attaque de la maladie que subit cette population. Pour préciser son potentiel actif, il faudra définir et qualifier la valence écologique (rapport des résultats du stress en milieu naturel sur ceux du stress provoqué artificiellement en laboratoire) pour les facteurs considérés en tenant compte des préférences ou exigences fluctuantes de l'insecte ainsi que ses limites tout au cours de son cycle. Le degré de désordre biochimique comme information préalable devrait du point de vue économique permettre de faire des investissements plus rationnels dans le contrôle des populations et ainsi diminuer les risques d'échecs. Par exemple, la quantité de lipides mis en réserve joue un rôle prépondérant non seulement dans la résistance à des conditions nutritionnelles défavorables, mais aussi elle joue un rôle important dans la tolérance aux insecticides et réduit la susceptibilité de l'insecte aux hydrocarbones chlorés comme le DDT, le BHC et le chlordane à cause de leurs caractéristiques de solubilité dans les lipides (Fast, 1964).

Il reste beaucoup de travail à réaliser avant de préciser l'état de santé larvaire et son potentiel actif, mais il demeure néanmoins que ce travail est un grand pas dans l'approche de l'établissement de pronostiques de l'état de santé d'une population larvaire.

REFERENCES

- ANGUS, T.A., 1970. Implication of some recent studies of Bacillus thuringiensis; A personal purview, in proceedings. IVth International Colloquium on Insect Pathology, College Park, Maryland, 25-28 août 1970: 183-190.
- BABERS, F.H., 1941. Buffers in blood, Prodenia (lepidoptera). J. Agr. Res., 63: 183-190.
- BAUD, L., 1955. Influence d'une sous-alimentation quantitative au cours du dernier intermue larvaire de Bombyx mori L., sur son développement ultérieur et sur celui de la génération suivante. Rev. du Vers à Soie, 2: 75-159.
- BAUD, L., 1967. Utilisation du glycogène au cours du jeûne chez le lépidoptère Bombyx mori L. C. R. Soc. Biol., 161: 8-9.
- BAUD, L., 1972. Contribution à l'étude de la physiologie du jeûne chez un insecte; I-Analyse de quelques caractères biochimiques au cours du jeûne absolu chez la chenille de Bombyx mori L.: existence de deux phases successives. Ann. Zool.-Ecol. Anim., 4 (4): 497-506.
- BAUD, L., 1973. Contribution à l'étude physiologique du jeûne chez un insecte. Larve de Bombyx mori L. Ann. Zool.-Ecol. Anim., 5 (2), 187-206.
- BAUD, L., LEGAY, J.M. et M. PASCAL. 1966. Evolution de la teneur en eau de la larve de Bombyx mori L., au cours du jeûne absolu. Bull. Biol., 99: 514.
- BEADLE, L.C. et J. SHAW, 1950. Salt retention and regulation, Sialis (nemoptera). J. Exp. Biol., 27: 96-109.
- BEAMENT, J.W.L., 1958. The effect of temperature on the waterproofing mechanism of an insect. J. Exp. Biol., 35: 494-519.
- BEAMENT, J.W.L., 1959. The waterproofing mechanism of Arthropods I. The effect of temperature on cuticule permeability in terrestrial insects and ticks. J. Exp. Biol., 36, 391-422.
- BERGOL, G.H., 1951. Notes on the polyedral disease of forest tent caterpillar, Malacosoma disstria. Bi-mon. Prog. Rep. Tor. Biol. Div. Can. Dep. Agric., 7 (4): 1-2.

- BESSEY, O.A., LOWRY, O.H. et M.J. BROOK, 1946. A method for rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164: 321-326.
- BISHOP, G.H., 1923. Physical properties of hemolymph, Bee larva. *J. Biol. Chem.*, 58: 543-565.
- BLACKSHEAR, P.J., HOLLOWAY, P.A.H., GEORGE, K. et M.M. ALBERTI, 1975. The effect of inhibition of gluconeogenesis on ketogenesis in starved and diabetic rats. *Biochem. J.*, 148: 353-362.
- BRAN VON, T., MCMAHON, P. et M.G. NOLAN, 1957. Physiological observations on the starvation and dessication of snail, Australorvis glabratus. *Biol. Bull.*, 113: 89-102.
- BOSQUET, G., 1976. Glycine incorporation during starvation in Bombyx mori, relation to respiratory metabolism. *J. Insect Physiol.*, 22: 541-545.
- BRUNS, F. et W. PULS, 1954. The activity of the serum aldolase in patients with liver disease: A new enzymatic test. *Klin. Wochshsr.*, 32:656.
- BUXTON, P.A., 1932. The relation of adult Phodnius prolixus (Reduvidae, Rhynchota) to atmospheric humidity. *Parasitology*, 24: 429-437.
- CANDY, D.J. et B.A. KILBY, 1975. Insect Biochemistry and Function. John Wiley & Sons, New York: 314 p.
- CHANCE, B. et G.R. WILLIAMS, 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilisation. *J. Biol. Chem.*, 217: 383.
- CHAUDHARY, K.D., BERNARD, R. et A. LEMONDE, 1964. Effects of the starvation on the larval body composition and phosphorus metabolism in Tribolium confusum Duval. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.*, 72: 17-31.
- CHAPMAN, R.F., 1972. The Insects (structure and function). English Univ. Press, London: 532-533.
- CHAUVIN, R., 1956. Physiologie de l'Insecte. I.N.R.A. 2^oed, Paris: 917p.
- CHRISTIE, J.D., FOSTER, W.B. et L.A. STAUBER, 1974. The effect of parasitism and starvation on carbohydrate reserves of Biophalaria glabrata. *J. Invert. Pathol.*, 23:55-62.
- CLARCK, E.C., 1958. Ecology of polyedroses of tent caterpillars. *Ecology*, 39: 132-139.
- CONNERTY, J. et A.R. BRIGGS, 1956. Determination of serum Ca by o-cresolphthalein complexone. *American J. of Clin. Pathol.*, 45: 290.
- COOKSEY, K.E., DONNINGER, C., NORRIS, J.R. et D. SHANKLAND, 1969. Nerve-blocking effect of Bacillus thuringiensis protein toxin. *J. Invert. Pathol.*, 13: 461-462.
- CORNIC, J.F., 1974. Contribution à l'étude de la résistance au jeûne de Platysma vulgare L.(coléoptère carabique) en fonction de la température, de l'hygrométrie et de l'état physiologique. *Ann. Zool.-Ecol. Anim.*, 6 (3): 373-382.

- CRAGG, F.W., 1923. Ind. J. Med. Res., 2: 449-472. Cité par Chauvin, R., 1949 dans Physiologie de l'Insecte. I.N.R.A. Ed., Paris.
- DEAN, J.A., 1960. Flame Photometry, McGrae-Hill Book Comp. Inc., N.-Y.: 315p.
- FAST, P.G., 1964. Insect Lipids: A Review. Memoirs of the Entomological Soc. of Can., 37: 50 p.
- FAST, P.G. et T.P. DONAGUE, 1971. The δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis II. on the mode of action. J. Invert. Pathol., 18: 135-138.
- FAUST, R.M. et E.M. DOUGHERTY, 1968. Effect of the δ -endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus on the hemolymph of silkworm, Bombyx mori. J. Invert. Pathol., 13: 155-157.
- FAUST, R.M., TRAVERST, R.S. et G.M. HOLLAM, 1974. Preliminary investigation on the molecular mode of action of the δ -endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. Alesti. J. Invert. Pathol., 23: 259-261.
- FISHMAN, W.H. et F. LERNER, 1953. A method for estimating serum acid phosphatase. J. Biol. Chem., 200: 83.
- FOLCH, J., ASCOLI, J., LEES, M., MEATH, J.A. et F.N. LEBARON, 1951. Preparation of lipid extracts from brain tissue. J. Biol. Chem., 191: 833-841.
- FOLCH, J., LEES, M. et G.H.S. STANLEY, 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 226: 497-499.
- GORNALL, A.G., BORDAWILL, C.J. et M.M. DAVIEL, 1949. Determination of serum proteins by means of biuret reactions. J. Biol. Chem., 177: 751-766.
- GOWDA, T.V. et T.R. RAMAIAH, 1976. Effect of induced polyedrosis on hemolymph transaminase in larva of silkworm Bombyx mori. J. Invert. Pathol., 28: 271-272.
- GRISON, P., 1957. Les facteurs alimentaires de la fécondité chez le Doryphore (leptinotarsa decemlineata Say.) (Col. Chrysomelidae). Ann. Epiphytiques, 8 (3): 305-381.
- GRISON, P. et J.R. LE BERRE, 1953. Quelques conséquences physiologiques de l'inanition chez l'imago de Leptinotarsa decemlineata Say. (coléoptère chrysomelidae). Rev. Pathol. Veg. Entomol. Agric. France, 32:78-86.
- GRUM, L., 1966. Diurnal activity rhythm of starved Carabidae. Bull. Acad. Polonaise Sci. Cl. III, Sec. Sci. Biol., 14 (?): 405-411.
- HEIMPEL, A.L., 1955. The pH in the gut and blood of the larch sawfly, Pristiphora erichsoni (Htg.) and other insects with reference to pathogenicity of Bacillus cereus Fr. and Fr. Can. J. Zool., 33: 99-106.
- HEIMPEL, A.M. et T.A. ANGUS, 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. J. Insect Pathol., 1: 152-170.

- HENRY, J.R., 1964. Clinical chemistry. Harper & Row Publishers, N.-Y.: 415p.
- HILL, L. et G.J. GOLDSWORTHY, 1970. The utilisation of reserves during starvation of larvae of the Migratory locust. Comp. biochem. physiol., 36: 61-70.
- HOUSE, H.L. et L.E. ROLLINS, 1961. Note on the effects of food and storage on the specific gravity osmotic pressure and volume of blood of mature larvae of Galleria mellonella L. (Lepidoptera: pyralidae). Can. Ent., 93: 653-654.
- HOYLE, G., 1954. Changes in the blood potassium concentration of the African migratory locust (Locusta migratoria migratorioides R & F) during food deprivation and the effect on neuromuscular activity. J. Exptl. Biol., 31: 260-270.
- JANSEN, G.R., ZANETTI, M.E. et C.F. HUTCHISON, 1966. Studies on lipogenesis in vivo. Effects of starvation and re-feeding, and studies on cholesterol synthesis. Biochem. J., 99: 333.
- KARMEN, A. WROBLEWSKI, F. et J.S. LADUE, 1955. Transaminase activity in human blood. J. Clin. Invest., 36:126.
- KLEIBER, M., 1975. The fire of the life (Introduction of animal energetics). R.E. Krieger Publ. Co., N.-Y.: 453p.
- KORNBERG, A. et B.L. HORECKER, 1955. dans Methods in Enzymology vol. 1. Colowick S.P. et N.O. Kaplan, Academic Press, N.-Y.: 323p.
- LECLERCG, J., 1949. Nouvelles recherches sur la physiologie de l'inanition chez Tenebrio molitor L. Arch. Intern. Physiol., 57: 173-184.
- LOULOUDES, S.J. et A.M. HEIMPEL, 1969. Mode of action of Bacillus thuringiensis toxic crystals in larvae of silkworm, Bombyx mori. J. Invert. Pathol., 14: 375-380.
- LUDWIG, D. et W.P. CULLEN, 1956. Effects of starvation on uric acid, allantoin and urea content of Japanese Beetle (Popillia japonica Newman) Blood. Physiol. Zool., 29: 153-157.
- LUTHY, P., 1973. Self destruction of the gut epithelium. A possible explanation of the mode of action of the endotoxin of Bacillus thuringiensis. J. Invert. Pathol., 22: 139-140.
- MELLANBY, K., 1932. The effect of atmospheric humidity on the metabolism of the fasting mealworm (Tenebrio molitor L., Coleoptera). Proc. Roy. Soc., 83: 376-390.
- MILLOT, J. et M. VACHON, 1949. dans traité de Zoologie, J.P. Grasse Ed., P.P. Masson & Cie, Paris: 420p.
- NARAYANAN, K. et S. JAYARAJ, 1974. The effect of Bacillus thuringiensis endotoxin on hemolymph cation levels in the citrus leaf caterpillar, Papilio demoleus. J. Invert. Pathol., 23: 125-126.
- NEWTON, C.J., 1954. Effects of starvation in composition of Japanese Beetle larvae (Popillia japonica N.). Physiol. Zool., 27: 248-258.

- NICOLSON, S. HORSFIELD, P.M., GARDINER, P.O.C. et S.H.P. MADDRELL, 1974. Effects of starvation and dehydratation on osmotic and ionic balance in *Carausius marosus*. J. Insect Physiol., 20: 2061-2069.
- NIEMERKO, S., 1955. Biochemistry of the waxmoth (*Galleria mellonella*). 4. Metabolism of total phosphorus during feeding and starvation of the larvae. Acta Biol. Exptl., 15: 91-99.
- NIEMERKO, S. et W. CEPELEWICZ, 1950. Studies in the biochemistry of the waxmoth *Galleria mellonella*. I. Growth of the larvae and their chemical composition. Acta Biol. Exptl., 15: 57-58.
- PEPPER, J.H., DONALDSON, F.T. et E. HASTING, 1941. Buffers and composition of blood and digestive juices, mormon cricket, Physiol. Zool., 14: 470-475.
- PO-CHELDLEY, D.S., 1958. Effects of starvation on free amino acids in larval blood of oriental beetle, *Anomala orientalis* Waterhouse. J. N.-Y. Entomol. Soc., 66: 171-177.
- POLIMENTI, O., 1915. Osmotic pressure during development, silkworm. Biochem. Zeitschr., 70:74-92.
- PRINTER, J.K., HAYASHI, J.A. et J.A. WATSON, 1967. Enzymic assay of glycerol, dihydroxyacetone and glyceraldehyde. Arch. Biochem. Biophys., 121: 404.
- RAMAKRISHNAN, N., 1967. Observations of the toxicity of *Bacillus thuringiensis* of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invert. Pathol., 10: 449-450.
- RAMSAY, J.A., BROWN, R.H.S. et P.C. CROGHAN, 1955. Electrometric titration of chlorides in small volume. J. Exp. Biol., 32: 822-829.
- RUDOLF, W.F., 1926. Studies on chemical changes during growth and metamorphosis in *Malacosoma*, lep.: Moisture and fat. N.-Y. Ent. Soc., 34: 249-256.
1926a. nitrogen. N.-Y. Ent. Soc. 34: 319-330.
1927. Ash and sulfates. N.-Y. Ent. Soc., 35: 219-229.
1929. Glycogen. N.-Y. Ent. Soc., 37: 17-23.
- SCHWALBE, C.P. et J.E. BAKER, 1976. Nutrient reserves in starving black carpet beetle larvae infected with the *Eugregarine pyxinia* Frenzeli. J. Invert. Pathol., 28: 11-15.
- SIPPEL, W.L., 1952. Winter rearing of forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* (Hbn.). Bi-mon. Prog. Rept., Forest Biol. Div. Can. Dept. of Agric., 8(4): 1-2.
- SMIRNOFF, W.A., 1969. A guide for the application of dark field microscopy for routine diagnosis in insect pathology. Le Nat. Can., 96: 261-275.
- SMIRNOFF, W.A., 1971. Mouvements de potassium et du soufre chez la larve de *Neodiprion swainei* (*Hymenoptera-tenthredinidae*), au cours de l'infection virale (polyhédrie nucléaire). Rev. Can. Biol., 30:301-305.

- SMIRNOFF, W.A., 1973. Biochemical exploration in insect pathology. Acad. Press Inc., N.Y.: 89-125.
- SMIRNOFF, W.A., 1975. Les méthodes biochimiques de diagnose dans l'établissement de pronostics sur l'état des population des insectes nuisibles. Ann. de l'ACFAS, 43^e congrès, résumédes communications, vol. 42 (1): 150.
- SMIRNOFF, W.A. et J.R. VALERO, 1969. Influence de l'infection virale (polyhé-drie nucléaire) sur la formation d'acide urique chez la larve de Neodiprion swainei (Hymenoptera-tenthredinidae). Can. Entomol., 101, 763-766.
- SMIRNOFF, W.A. et J.R. VALERO, 1972. Perturbations métaboliques chez Choristoneura fumiferana par Bacillus thuringiensis seul ou en présence de chitinase. Rev. Can. Biol., 31 (3); 163-169.
- STAIRS, G.R., 1964. Dissemination of nuclear polyhedrosis virus against the forest tent caterpillar, Malacosoma disstria (Hubner) (Lepidoptera, lasiocampidae). Can. Ent., 96: 1017-1020.
- STAIRS, G.R., 1964a. Infection of Malacosoma disstria (Hbn.) with nuclear-polyhedrosis viruses from other species of Malacosoma (Lepidoptera, lasiocampidae). J. Insect Pathol., 6: 164-169.
- STAIRS, G.R., 1965. Artificial initiation of virus epizootics in forest tent caterpillar populations. Can. Ent., 97: 1059-1062.
- STAIRS, G.R., 1965a. The effect of metamorphosis on nuclear-polyhedrosis virus infection in certain lepidoptera. Can. J. Microbiol., 11: 509.
- STAIRS, G.R., 1965b. Quantitative différences in susceptibility to nuclear-polyhedrosis virus among larval instars of forest tent caterpillar, Malacosoma disstria (Hbn.). J. Invert. Pathol., 7: 427-429.
- STAIRS, G.R., 1966. Transmission of virus in tent caterpillar populations. Can. Entomol., 98: 1100-1104.
- STEINHAUS, E.A., 1949. Principles of Insect Pathology. McGraw-Hill Ed., N.-Y., 757p.
- SUGDEN, M.C., SHARPLES, S.C. et P.J. RANDLE, 1976. Carcass glycogen as a potentiel source of glucose during short-term starvation. Biochem. J., 160: 817-819.
- TRAVERST, R.S. et R.M. FAUST, 1976. Effects of Bacillus thuringiensis var. Kurstaki, δ -endotoxin on isolated lepidoptera mitochondria. J. Invert. Pathol., 28: 351-356.
- TREHERNE, J.E. et J.W.L. BEAMENT, 1965. The physiology of the insect central nervous system. Academic Press, N.-Y., 21-29.
- WERNER, W., REY, H.G. et H. WIELINGER, 1970. Properties of a new chromogen for the determination of glucose in blood according to the GOD/POD method. Zool. Analyt. Chem., 252:224.
- WIGGLESWORTH, J.B., 1938. Regulation of osmotic pressure and chloride, hemolymph, mosquito larvae. J. Exp. Biol., 15: 235-247.