

Etude du comportement alimentaire chez la mouche de l'olive *Bactrocera Olea* vis-à-vis des phytoecdystéroïdes synthétisées par *Spinacia Oleraceae* L. / G. Kaddissi ; sous la direction de Dr. D. Choubaya ; et la participation de Dr. R. Khoury. — Extrait de : *Annales de recherche scientifique*. — N° 6 (2005), pp. 267-281.

Bibliographie. Figures.

I. Mouche de l'olive. II. Olives — Industrie.

Choubaya, D.. — Khoury, R.

PER L1049 / FA193890P

# ÉTUDE DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE CHEZ LA MOUCHE DE L'OLIVE *BACTROCERA OLEA* VIS-À-VIS DES PHYTOECDYSTÉROÏDES SYNTHÉTISÉES PAR *SPINACIA OLERACEAE* L.

G. KADDISSI

Sous la direction de Dr. D. CHOUBAYA<sup>(1)</sup>,  
et la participation de Dr. R. KHOURY<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Université Saint Esprit de Kaslik,  
Faculté des Sciences Agronomiques,  
B.P. 446 Jounieh, Liban

<sup>(2)</sup> Institut de Recherche Agronomique Libanais  
Fanar, Liban

## RÉSUMÉ

La 20 hydroecdysone est une hormone circulante généralement dans l'hémolymphe des insectes. Elle induit la mue. Il se trouve qu'elle est synthétisée par quelques plantes. On lui attribue le rôle de métabolite secondaire de défense. Nous avons voulu tester cette hypothèse en étudiant les effets de la 20 E sur la mouche de l'olivier *Bactrocera olea* (Gmel) qui est un grand ravageur en oléiculture.

Les travaux ont consisté à élever la mouche de l'olive au laboratoire et à extraire l'hormone ecdystéroïde (20 E) des semences d'épinard *Spinacia oleracea* L., afin de faire l'incorporer au milieu alimentaire des mouches d'olive âgées de 2 à 3 jours à trois différentes concentrations qui étaient : 1, 5 et 10 µg/µL et évaluer leurs effets en présence de témoins. Le même test a été coduit avec de la 20 E pure synthétisée chimiquement.

Nos observations ont consisté à évaluer le taux de mortalité et le comportement alimentaire sur une période de 168 heures. Le pourcentage de mortalité de la mouche pour la dose la plus élevée de 20 E de l'extrait était de 66 % pour les 72 premières heures. Tandis que, pour la même dose du produit pur appli-

qué, le pourcentage de mortalité n'était que 26 %. Nous pouvons en conclure que, les mouches percevaient la 20 E pure comme un antiappétant alors quand elle était d'origine végétale, elle était ingérée et toxique.

Le GF-120, témoin des produits commerciaux, était appliqué avec les concentrations de 50 et 100  $\mu\text{L}$  (80 ppm). Ce produit était très efficace car pendant les 72 premières heures, toutes les mouches étaient mortes.

**Mots-clés:** *Bactrocera oleae* (Gmelin), *Spinacia oleraceae* L., extraction, ecdystéroïde, phytoecdystéroïdes, élevage d'insecte, oléiculture.

## ABSTRACT

The 20 hydroecdysone is a circulating hormone in the hemolymph of insects. It induces the molting. It has been found that it is synthesized by some plants as a secondary metabolite of defense. In our work, we have studied the effects of the 20 E on feeding behavior of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin), the major enemy of the olive tree.

The aim of our study was in the first place, to conduct an artificial rearing of the olive fruit fly in the laboratory. In a second place, we tested the effect of different doses of extracts and we observed the results on the insects in term of mortality or anti feeding behavior. The doses were 1, 5, and 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

For the second part of the work, obtained results were compared with those obtained from the application of the pure hormone 20 E and of GF-120, which were considered as controls.

For the highest dose of the 20 E extracted from plant, 66 % of the insects died in the first 72 hours. On the other hand, a similar dose, when 20 E purely synthesized was used, the percentage of mortality was 26 %. 20 E from plant was more effective than the pure one. We can conclude that the pure form of 20 E is better to the insects than the extracts form.

Whereas, when the GF-120 was applied at the dose of 50 and 100  $\mu\text{L}$  (80 ppm), it has showed 100 % mortality in the first 72 hours.

**Keywords:** *Bactrocera oleae* (Gmelin), *Spinacia oleraceae* L., extraction, ecdysteroïde, phytoecdysteroïdes, insect rearing, oleiculture.

## INTRODUCTION

La surface des terres cultivées en olivier au Liban a été estimée à 57 milles hectares en 2001 (23 % du total de la surface cultivée, Ministère de l'agriculture libanais, 2001). Cette culture est caractérisée par l'attaque de plusieurs maladies dont le principal ennemi est la mouche de l'olive *Dacus oleae* (Gmelin) ou encore *Bactrocera oleae* (Gmelin) et qui se rencontre dans tout le bassin méditerranéen. *Bactrocera oleae* (Gmelin) vit, exclusivement à l'état larvaire dans les fruits d'*Olea europaea* (HYPP, 1995).

Le rôle économique de *Bactrocera oleae* (Gmelin) connu depuis l'antiquité, a motivé les travaux consacrés à ce ravageur et dont la majorité sont orientés vers des méthodes de lutte propres à assurer une protection satisfaisante de la production. Il semble cependant que les inconvénients dus à l'emploi répété et massif des insecticides de synthèses polyvalentes ont abouti à reconsidérer le problème et que les méthodes de lutte naturelles sont envisagées.

Ces considérations nous ont amené à étudier le comportement alimentaire de la mouche d'olive vis-à-vis des phytoécdystéroïdes synthétisés par la plante d'épinard *Spinacia oleracea* L.

Au début du travail, la partie principale était d'avoir le matériel biologique au laboratoire. Le test d'oviposition nous a permis d'étudier et d'élever *Bactrocera oleae* (Gmelin) sur les fruits d'olive sains au laboratoire. Ce test d'oviposition a donné de bons résultats et la mouche a pu effectuer tout son cycle au laboratoire et donc l'élevage sur des fruits d'olive a réussi.

Ensuite l'extraction des semences d'épinard a été faite pour obtenir l'extrait d'écdystéroïde 20 E qui a été analysé quantitativement sur CLHP pour connaître sa dose exacte.

Après avoir eu le matériel biologique, nous avons appliqué les produits suivants :

1. Le produit commercial GF-120 dont la matière active Spinozade (80 ppm) comme un témoin du marché.
2. L'écdystéroïde 20 E pure a été appliqué comme un témoin de la matière d'extraction.
3. L'extrait des semences d'épinard.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le travail expérimental a eu lieu dans deux endroits différents. Tout d'abord le travail de terrain (collecte des mouches, récolte des fruits infectés) a été réparti sur différentes régions (Lebaa, Darbechtar, Zouk Mikaël et Jbeil). Et le travail du laboratoire a été effectué aux laboratoires d'entomologie de l'Institut de Recherches Agronomiques du Liban à Fanar et de l'Université Saint-Esprit de Kaslik, ensuite au laboratoire de technologie alimentaire à Fanar pour l'analyse de l'extraction. Le travail a commencé du mois de Juillet 2003 jusqu'au mois de Mai 2004.

La récupération de la mouche de l'olive s'est faite en deux collectes des mouches soit à l'aide :

- Des fruits d'olive infestés récoltés du champ qui étaient mis dans une cage en plexiglas de dimensions 60 x 40 x 40 cm sur des chiffons humides pour prévenir la dessiccation des fruits.
- Des mouches collectées par des pièges de type McPhail dont la solution de phosphate diamonique a été préparée à une concentration de 1,5 % (Mahfouz, 1995). Pour récupérer les mouches vivantes, il a fallu mettre une grille à l'intérieur du piège.

Toutes les mouches collectées étaient déposées dans des cages de dimensions 30 x 30 x 30 cm (Robinson et Hooper, 1989) qu'on avait fabriqué avec de bois, de plexiglas et de tissus d'organza. Ces cages ont été mis dans une chambre dont la température est 24-25 °C et une humidité de 60 % à peu près 10 heures de lumière et 14 heures d'obscurité (Robinson et Hooper, 1989).

Le test de la durée de vie de la mouche au laboratoire a été conduit sur 30 mouches (15 ♀ + 15 ♂) dès l'éclosion larvaire jusqu'à la mort de l'adulte.

Le test d'oviposition de la mouche d'olive au laboratoire a été conduit sur un milieu naturel, en d'autre terme sur des fruits d'olive sains. Comme ce test nous a donné de bons résultats, on a eu recours à élever la mouche d'olive sur des fruits d'olive.

Le test d'oviposition a été réalisé de la façon suivante. Tout d'abord nous avons mis 40 mouches (30 ♀ + 10 ♂) (Robinson et Hooper, 1989) récupérées à partir de fruits infestés et des mouches collectées du champ dans une cage. Au fond de chaque cage, nous avons déposé sur du sable 50 fruits d'olive sains (Robinson et Hooper, 1989). Pour favoriser l'oviposition, nous avons eu recours à mettre dans la cage comme nourriture un mélange de protéine et sucre selon

les proportions suivantes : 10 g de protéine et 30 g de sucre et nous avons mis de côté dans chaque boîte des cotons imbibés d'eau.

Les mouches ont commencé à pondre dans les fruits d'olive, à avoir des larves, ensuite des pupes et enfin des mouches. Le test d'oviposition nous a permis d'étudier et d'élever *Bactrocera oleae* (Gmelin) sur des fruits d'olive sains au laboratoire.

Comme les tests préliminaires d'oviposition ont donné des bons résultats, on a lancé l'élevage de la mouche au laboratoire. Le principe du travail dans l'élevage naturel est comme celui appliqué durant le test d'oviposition. Le seul point qui diffère est pour prolonger la durée de l'élevage, on a besoin des fruits d'olive sains et non mûres durant toute la durée de l'élevage. Pour cela, nous avons eu besoin de chercher 10 kilos sur plusieurs fois d'olives du champ vertes, pas trop mûres et les conserver dans le réfrigérateur à une température de 4°C. Au fur et à mesure de l'élevage, nous avons utilisé les fruits d'olive.

D'après la recherche bibliographique, la plus grande quantité d'ecdystéroïdes se trouve dans les semences d'épinard (Dinan, 1995). Le but de l'extraction était de déceler la présence de l'hormone ecdystéroïde et d'identifier la dose présente dans les semences de *Spinacia oleraceae* L.

La méthode d'extraction a été divisée en sept étapes principales (Dinan, 1992) :

- 1<sup>ère</sup> étape : le broyage des semences

Un poids de 5 g de semences de *Spinacia oleraceae* L. ont été broyés et réduits en poudre pour la préparation de 36 échantillons.

- 2<sup>ème</sup> étape : la pesée

Pour l'extraction, 100 mg de poudre d'épinard ont été pesés pour chaque échantillon.

- 3<sup>ème</sup> étape : la congélation

Les 36 échantillons ont été mis dans le congélateur à une température de -20°C pour 4 jours afin d'éliminer l'eau dans les échantillons.

- 4<sup>ème</sup> étape : l'extraction avec le méthanol

Le 4<sup>ème</sup> jour, les échantillons étaient retirés du congélateur, et rendus à

température ambiante dans un dessiccateur. La poudre d'épinard de chaque échantillon était déposée dans un tube de capacité 30 mL. Puis 2 mL de méthanol étaient ajoutés et le tout était agité à 55 °C pour 3 heures. Cette étape a été répétée 3 fois et la somme des 3 extraits a été récupérée, puis conservée au réfrigérateur à 4 °C

- 5<sup>ème</sup> étape : la centrifugation

Avant la centrifugation, 2,6 mL d'eau distillée, puis 4 mL d'hexane ont été ajoutés. Ensuite, les échantillons ont été bien agités à la main et centrifugés pour 2 minutes afin d'avoir deux phases :

1. La phase supérieure comportant l'hexane avec les composants apolaires.
2. La phase inférieure contenant l'eau distillée, le méthanol avec les ecdystéroïdes.

La phase d'hexane a été écartée et la phase ecdystéroïde a été gardée au congélateur.

- 6<sup>ème</sup> étape : l'évaporation de l'extrait

L'extrait obtenu était composé d'eau, de méthanol et de l'ecdystéroïde. Pour pouvoir appliquer l'extrait sur les mouches, l'eau et le méthanol doivent être évaporés. L'évaporation a été faite tout d'abord à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph VV 2000) à 45 °C sous vide, puis sous hotte pendant 72 heures. La partie restante a été filtrée sous-vide pour éliminer les impuretés. La solution obtenue contenait du méthanol et de l'ecdystéroïde. Cette solution finale a été évaporée à une température ambiante sous hotte pendant 48 heures jusqu'à obtention de l'ecdystéroïde pur.

- 7<sup>ème</sup> étape : l'analyse quantitative sur CLHP

L'analyse quantitative a été effectuée à l'aide de la technique chromatographie liquide à haute performance. Pour la séparation de l'ecdystéroïde, la colonne Supelcosil LC-18 (25 cm L x 4,6 mm d.i., 5µm taille des particules) a été jointe (Dinan, 1992). La phase mobile était le méthanol à 100 % et le débit était de 1mL/min. Le volume injecté était de 20µL.

Le standard a été une solution A d'ecdystéroïdes pure à une concentration

de 2500 mg.L<sup>-1</sup>. Le temps de rétention noté pour le standard a été 3,126 min et de l'extrait 3,167 min.

Les tests de comportement de la mouche d'olive étaient divisés en 4 parties principales (Tab.1).

**Tableau 1.** Distribution des différents groupes lors de l'application des produits

<i>Produit utilisé</i>																							
GF-120				Ecdystéroïde pure sur 1/2 cube de sucre				Ecdystéroïde pure sur-hydrolyste de protéine				Extrait											
50µL	100µL	Témoin		1µg/µL	5µg/µL	10µg/µL	Témoin	1µg/µL	5µg/µL	10µg/µL	Témoin	1µg/µL	5µg/µL	10µg/µL	Témoin								
♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

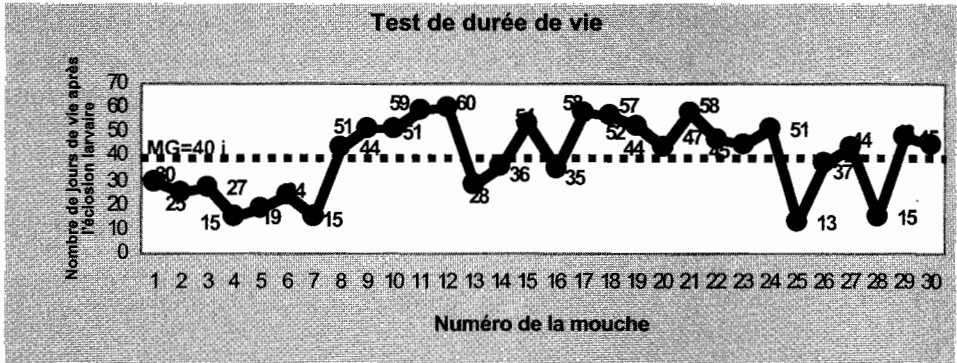
### 1. Résultats quantitatifs de l'extrait

Le résultat de l'analyse quantitative de l'hormone 20E sur CLHP, a montré la présence de 22,36µg de 20E dans chaque 50 mg de poudre d'épinard sèche (30 répétitions).

### 2. Tests de durée de vie de la mouche de l'olive au laboratoire

La durée de vie de la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* (Gmelin) était mesurée dès l'éclosion larvaire, jusqu'à la mort de la mouche. La durée de vie obtenue sur 30 mouches (15♀ +15♂) était en moyenne 40 jours (Fig. 1). Ce nombre est conforme aux nombres de jours obtenus généralement dans la littérature (Robinson et Hooper, 1989). Rappelons que les adultes étaient conservés vivants dans des verres en plastiques, contenant des cubes en sucre et du coton imbibé d'eau.





**Figure 1.** La durée de vie de la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* (Gmelin) dans les conditions de laboratoire.

### 3. Test d'oviposition de la mouche d'olive au laboratoire

Sur 40 mouches adultes, déposées dans des cages et élevées sur des olives vertes pas trop mûres, et dont 30 étaient des femelles, les œufs obtenus ont donné par la suite un total de 63 adultes sur une période d'un mois (22 femelles et 41 mâles). Ce chiffre est très faible par rapport au chiffre atteint normalement dans les élevages artificiels qui ont été conduits auparavant (Robinson et Hooper, 1989).

### 4. Durée de vie de la mouche d'olive sans accès à la nourriture et à l'eau

Sans accès à la nourriture, 100 % des adultes mourraient en moyenne au bout de 54 heures, les femelles autant que les mâles (15 ;15). Cette durée de vie est très courte puisque d'après nos observations sur les mouches témoins (qui avaient accès à la nourriture), elles pouvaient vivre en moyenne 40 jours (Fig. 2).

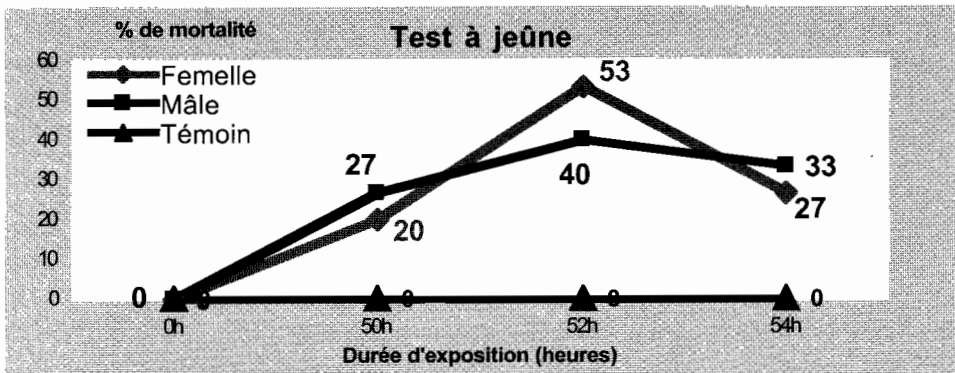


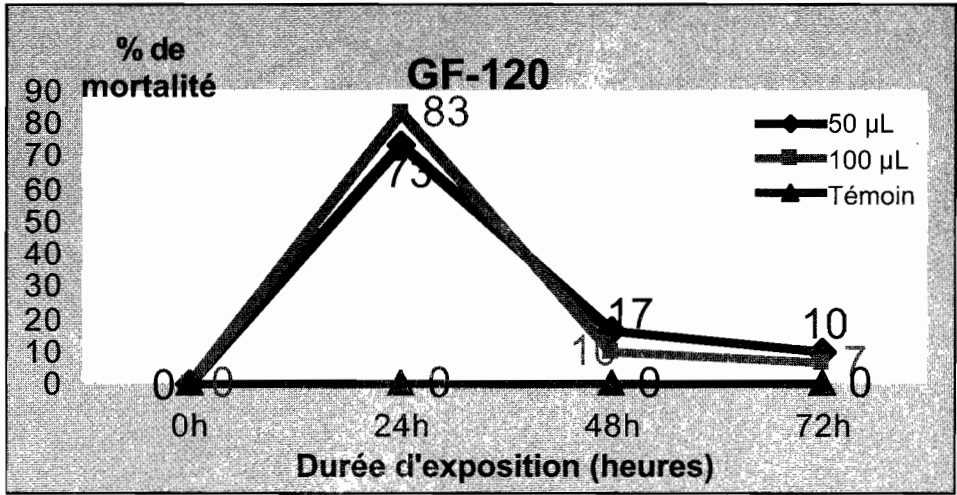
Figure 2. La durée de vie des mouches à jeûne.

## 5. Comportement alimentaire de la mouche d'olive vis-à-vis du GF-120 ou spinosade

Les taux de mortalité des insectes observés en fonction du temps et des différentes doses du produit GF-120, montrent qu'aux deux doses utilisées 50 et 100  $\mu\text{L}$ , la matière principale spinosade est efficace dans les premières 24 heures avec un pourcentage de mortalité de 73 et 83 % respectivement (Fig. 3). Nous pouvons en déduire que le produit n'était pas antiappétant, que les mouches en mourraient après ingestion et donc, intoxication (Tanaka et Naya, 1995).

Le produit avait un effet dose-réponse au premier jour, mais cet effet se perdait par la suite puisque les 100  $\mu\text{L}$  du produit induisait la mort de 10 % des mouches alors qu'une dose de 50  $\mu\text{L}$  appliquée au substrat alimentaire induisait une mortalité de 17 %.

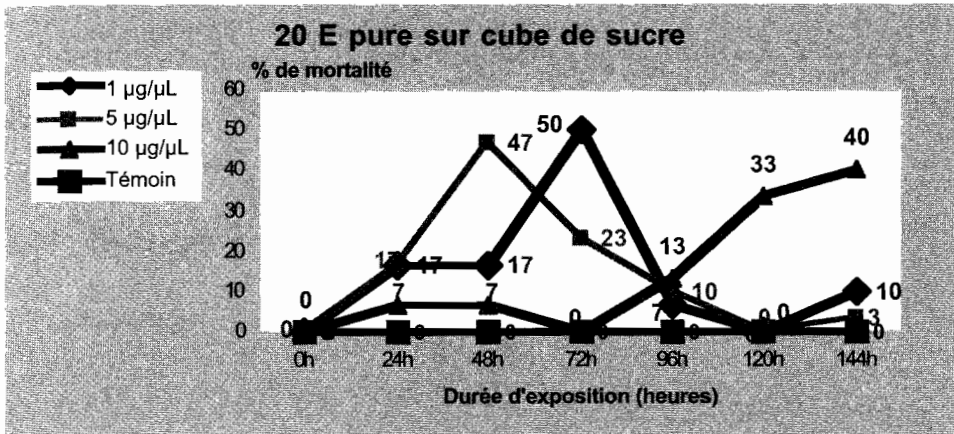
D'autre part, les doses que nous avons adoptées n'étaient pas similaires aux doses adoptées pour le test avec la 20 E comme nous avons du suivre l'efficacité de la matière active au plan commercial. Nous avons voulu par ce test, étudier l'efficacité du produit au laboratoire, et surtout son mode d'action en tant que produit naturel commercialisé pour lutter contre ce ravageur et faire juste un parallèle.



**Figure 3.** Evolution de la mortalité des adultes de *Bactrocera oleae* en fonction de la durée d'exposition et des doses du produit GF-120.

## 6. Comportement alimentaire de la mouche d'olive vis-à-vis de la 20 E pure appliquée sur des demi-cubes de sucre

Lorsque la 20 E était appliquée sur des cubes de sucre, et indépendamment de la dose, les adultes ne semblaient pas être perturbées par sa présence. A partir de 24 heures, les mouches commençaient à mourir (Fig. 4). Donc nous pouvons déduire, que la 20 E a été ingérée, et apparemment elle n'avait pas un effet anti-appétant. Si un effet antiappétant devait avoir lieu, on aurait pu observer un comportement de jeûne et les mouches auraient pu survivre plus que 24h. Nous pouvons conclure que la 20 E pure appliquée aux doses de 1, 5 et 10 µg était toxique.



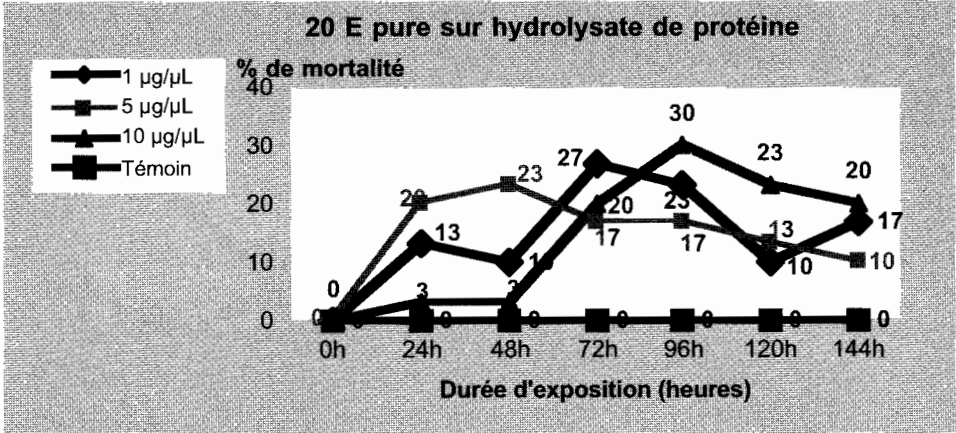
**Figure 4.** Evolution de la mortalité des adultes de *Bactrocera oleae* (Gmelin) en fonction de la durée d'exposition et des doses de la 20E pure appliquée sur des cubes de sucres.

De même nous n'avons pas pu remarquer un effet dose-réponse visible. L'hormone semble être perçue par un récepteur sensible à des doses plus fortes que celles que nous avons utilisées. On remarque quand même, que pour la dose de 10 µg, dose la plus élevée, le profil de perception est différent des autres concentrations. Les adultes perçoivent la 20 E comme un antiappétant et ne s'alimentent pas, donc ne meurent pas, mais deux à trois jours plus tard, elles finissent par accepter le produit antiappétant et l'ingérer. Là, il y a alors intoxication et le phénomène de mortalité commence à s'accroître.

En outre, nous pensons que la présence du sucre, surtout à des doses faibles de 20 E a pu masquer l'effet antiappétant alors qu'il n'a pas pu le faire à des doses très élevées.

### 7. Comportement alimentaire de la mouche d'olive vis-à-vis de la 20 E pure appliquée sur hydrolysate de protéine

Par rapport à l'expérience menée par incorporation de la 20 E dans l'hydrolysate de protéine, les pourcentages de mortalité étaient plus élevés après 2-3 jours (Fig. 5). Les adultes s'alimentent et ne peuvent pas rester à jeûne. Au bout de 3-4 jours, le taux de mortalité le plus élevé était atteint. Alors que pour le test précédent, 20 E sur des cubes de sucre, le taux maximal de mortalité est atteint au bout de 2 jours.

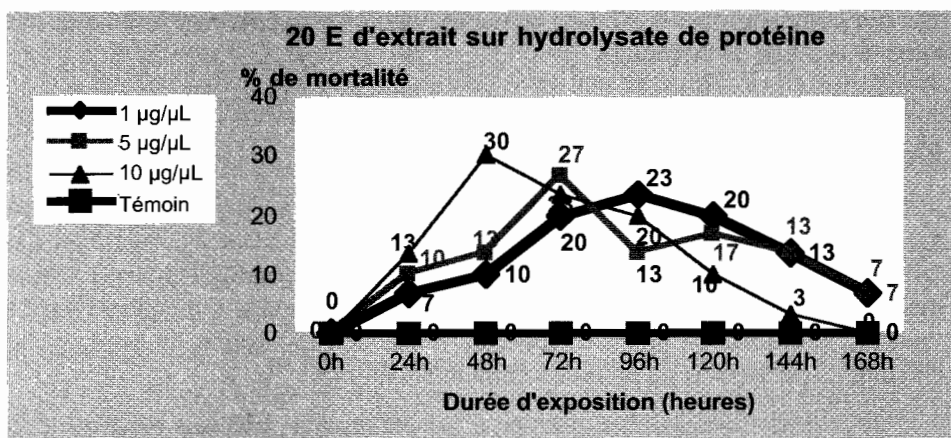


**Figure 5.** Evolution de la mortalité des adultes de *Bactrocera oleae* (Gmelin) en fonction de la durée d'exposition et des doses de la 20E pure appliquée sur hydrolysate de protéine.

## 8. Comportement alimentaire de la mouche d'olive vis-à-vis de la 20 E d'origine végétale appliquée sur hydrolysate de protéine

Nous avons conduit les tests d'efficacité des extraits des semences d'épinard en les appliquant sur hydrolysate de protéine (Fig. 6).

Dans ce dernier cas d'études, un effet dose réponse est apparu juste pour les deux premiers jours, plus la dose était forte, plus le pourcentage de mortalité des mouches était élevé. La 20 E était très toxique vers les 72 h, durée après laquelle, les mouches étaient moins résistantes au jeûne.



**Figure 6.** Evolution de la mortalité des adultes de *Bactrocera oleae* (Gmelin) en fonction de la durée d'exposition et des doses de la 20E d'extrait appliquée sur hydrolysate de protéine.

## 9. Discussion générale

La phytohormone ecdystéroïde issue des semences d'épinard a donné des résultats positifs. L'effet de la 20E pure appliquée sur des cubes de sucres et sur hydrolysate de protéine sur l'adulte de la mouche d'olive *Bactrocera oleae* (Gmelin), a montré une forte antiappétance pour la dose la plus élevée 10µg/µL car entre la 0 et la 48 heures d'exposition, nous avons observé la mort de 10 % des mouches au maximum mais elles mourraient à cause du jeûne. Tandis que pour la même dose appliquée, la 20 E issue de l'extrait des semences n'a pas montré une antiappétance similaire et le pourcentage de mortalité des mouches a été 43 % pendant les premières 48 heures.

Pour la dose 5µg/µL, le produit pur appliqué sur des cubes de sucres nous a donné un pourcentage de mortalité de 64 % pendant les premières 48 heures. Par contre pour la 20 E pure appliquée sur hydrolysate de protéine, le pourcentage était plus ou moins stable tout au long de l'exposition avec une diminution vers les dernières heures.

Enfin, le produit commercial GF-120 était très efficace avec des pourcentages de mortalité très élevés pendant les premières 24 heures. Il est à souligner qu'au bout de 72 heures toutes les mouches étaient mortes.

En comparant le GF-120 à l'ecdystéroïde, il y a une grande différence surtout sur la durée de l'efficacité.

## CONCLUSION

Dans ce travail, nous décrivons l'effet de la 20 E sur le comportement alimentaire de la mouche d'olive. Nous avons pu montrer son efficacité en tant que substance antiappétante, et dans les premières 48 heures, le pourcentage de mortalité des mouches était faible. Ensuite, ce pourcentage a augmenté car les mouches n'ont pas pu rester à jeûne. La durée de l'exposition du produit était très longue par rapport au produit commercial GF-120.

Pour cette raison, il faut multiplier les recherches, d'autant plus que cette matière principale, l'hormone écdystéroïde se trouve dans beaucoup de plantes natives libanaises.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DINAN, L., 1992. The analysis of phytoecdysteroids in single specimens of fat hen, *Chenopodium album*. *Biochemical analysis*, 3:132-138.
- DINAN, L., 1995. Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae. *European Journal of Entomology*, 92: 295-300.
- HYPP, 1995. *Dacus oleae* (Gmel). *Plant Protection Encyclopedia*. CD-Rom. HYPP, 1995.
- MAHFOUZ, Z., 1995. The efficiency of mass trapping with different concentrations of Di-Amonium Hydrogenophosphate for the control of *Bactrocea oleae*. Mémoire de fin d'étude, Université Libanaise, 65p.
- Le Ministère de l'agriculture, 2001. L'agriculture au Liban entre 2000-2001, Recensement agricole général, Beirut, Liban.
- ROBINSON, A.S., HOOPER, G., 1989. Fruit flies: Their biology, natural enemies and control. *World Crop Pests*, 3(3): 105-116.
- TANAKA, Y., NAYA, S., 1995. Dietary effect of ecdysone and 20-hydroxyecdysone on larval development in the silkworm, *Bombyx mori*, differently. *Journal of Insect Physiology*, 39(10): 805-809.