

## IDENTIFICATION DES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES CONTROLANT LE POLYPENISME PHASAIRES CHEZ LE CRIQUET MIGRATEUR

### [ IDENTIFICATION OF PHYSIOLOGICAL FACTORS RESPONSIBLE FOR PHASE POLYMORPHISM OF MIGRATORY LOCUST ]

**Amel Ben Hamouda<sup>1-2-4</sup>, Mohamed Ammar<sup>2</sup>, Arnold De Loof<sup>3</sup>, Abderrahmen Bouain<sup>4</sup>, and Mohamed Habib Ben Hamouda<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences Biologiques et Protection des Plantes, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, Sousse, Tunisie

<sup>2</sup>Laboratoire des Bio-agresseurs et Protection Intégrée en Agriculture, Institut National Agronomique de Tunis, Tunisie

<sup>3</sup>Laboratory for Developmental Physiology, Genomics and Proteomics, Zoological Institute, Leuven, Belgium

<sup>4</sup>Laboratoire des Sciences de la Vie, Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie

---

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** The gregarization in the migratory locust, *Locusta migratoria* and its trans-generational characteristic were controlled by the maternal gregarizing factor which secreted in the egg pod foam by the female's accessory glands. The comparison by SDS-PAGE of the contents of these glands showed the presence of a supplementary proteic band specific of gregarious phase with a molecular weight 30 KDa, absent in the solitary phase. The synthesis of the maternal gregarization factor was determined in gregarious accessory glands under the control of another factor, obtained by SDS-PAGE in the haemolymph of gregarious females. The trans-generational specificity of the maternal gregarizing factor was revealed in the presence in gregarious oocytes of a protein band of the same molecular weight (30 KDa) as that observed in the accessory glands. Analysis of gregarious egg pod foam by Thin Layer Chromatography showed the presence of a supplementary spot. No solitary phase specific spots were obtained in solitary foam matter. In gregarious eggs, a proteic band of molecular weight 263 KDa exists throughout the first 6 days of embryonic life. It disappeared since the first day in solitary phase. Gregarious hatchlings also showed a difference in the proteins content of their haemolymph; a proteic band of molecular weight of 66 KDa was observed in gregarious phase, absent in solitary one. These results prove that gregarious egg pod foam represents a physiological transporter of the maternal gregarizing factor from the female accessory glands to oocytes.

**KEYWORDS:** Maternal gregarizing factor, phase polymorphism, *Locusta migratoria*.

**RÉSUMÉ:** La grégarisation chez le criquet migrateur, *Locusta migratoria* et son attribut trans-générationnel sont contrôlés par la substance femelle de grégarisation (SFG) sécrétée par les glandes accessoires femelles au niveau de la matière spumeuse. La comparaison du contenu de ces glandes par la technique d'électrophorèse sur polyacrylamide (SDS-PAGE) a montré la présence d'une bande protéique différentielle (30 KDa) spécifique de la phase grégaire et absente chez la phase solitaire. La synthèse de cette substance, déterminée au niveau des glandes accessoires grégaires est sous le contrôle d'un autre facteur, décelé par SDS-PAGE au niveau de l'hémolymphe des femelles grégaires. La spécificité trans-générationnelle de la SFG se révèle par la présence au niveau des ovocytes grégaires de la même bande protéique (30 KDa) observée au niveau des glandes accessoires. L'analyse de la matière spumeuse grégaire par chromatographie sur couche mince a montrée la présence d'un spot supplémentaire, absent au niveau de la matière spumeuse solitaire. Au niveau des œufs grégaires, une bande protéique (263 KDa) existe tout au long des 6 premiers jours de la vie embryonnaire, mais qui disparaît après la ponte au

niveau des œufs solitaires. Les larves du premier stade grégaires présentent aussi une différence au niveau des protéines de l'hémolymphe avec une bande protéique de 66 KDa chez les larves grégaires, absente chez leurs congénères solitaires. Ainsi, la matière spumeuse grégaire joue le rôle de transporteur physiologique de la SFG des glandes accessoires vers les ovocytes.

**MOTS-CLEFS:** Substance femelle de grégatisation, polymorphisme phasaire, *Locusta migratoria*.

## 1 INTRODUCTION

La réponse des acridiens au regroupement est observée par un changement rapide du comportement et se termine par des réponses durables de nature morphologiques et/ou chromatiques [1], [2], [3], [4], [5]. La propriété commune des effets à court et à long terme c'est qu'ils sont gradués, dépendant non seulement de la densité mais aussi de la durée et du statut phasaire des générations maternelles [6]. Ces changements phasaires sont l'expression des modifications de nature endocrinologique. Il y a longtemps que des progrès ont été déployés afin d'identifier les marqueurs moléculaires intervenant dans la transition phasaire [7]. Dès 1921 pour *Locusta migratoria* et 1966 et 1977 dans le cas de *Schistocerca gregaria*, que Boris Uvarov a suggéré que le polyphénisme phasaire est basé sur les différences de l'expression des gènes spécifiques qui se reflètent par des différences de nature protéique [1], [2], [8]. C'est ainsi que depuis 2001, Moumène et ses collaborateurs [9] ont pu déterminer la présence d'un composé à effet grégarisant au niveau de la matière spumeuse grégaire de *S. gregaria*.

Les travaux de recherche effectués sur *S. gregaria* [10], relatifs au rôle joué par les glandes accessoires femelles dans le phénomène de la transformation phasaire ont montré la présence au niveau de ces glandes d'un composé à effet grégarisant. C'est un agent de nature protéique et de masse moléculaire comprise entre 45 et 50 KDa. Un des facteurs moléculaires les plus importants dans la transition phasaire qui a été identifié avant la création de la base de données « EST » est celui dont la masse moléculaire est de 6080 Da, désigné provisoirement par « phase-related peptide » (PRP). Ce peptide a été découvert par comparaison de l'hémolymphe des femelles grégaires et solitaires de *S. gregaria*. Il est présent à forte concentration au niveau de l'hémolymphe et des œufs issus des femelles grégaires. Ainsi, nous allons procéder dans cette étude à identifier les facteurs spécifiques de la différence de phase par diverses techniques biochimiques chez le criquet migrateur *L. migratoria*.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 LES CRIQUETS

Le criquet migrateur *Locusta migratoria* est soumis à deux types d'élevage, un élevage de masse pour l'obtention d'individus grégaires et un élevage d'isolement pour l'obtention d'individus solitaires.

Pour l'élevage de masse, il est maintenu dans des cages grillagées de dimension 40 × 40 × 50 cm à raison de 150 individus en moyenne par cage afin de maintenir l'état grégaire. Ces individus sont soumis à une photopériode de 12 heures, une température de l'ordre de 30 ± 2 °C et une humidité relative de 50 %.

Alors que pour l'élevage d'isolement, il est maintenu dans de petits gobelets en plastique pour les larves et des boîtes en plastique de dimension 21.5 × 14.5 × 10.5 cm pour les adultes. Ces individus se trouvent sous des conditions de thermo-photopériode identiques à celles utilisées pour les individus grégaires. On introduit dans chaque gobelet un bâtonnet pour que la larve puisse se percher afin de muer dans une position normale. Chaque boîte renferme un adulte et on place dans chaque gobelet une larve. L'introduction du mâle dans les boîtes des femelles s'effectue pendant quelques jours pour assurer l'accouplement.

Ces insectes sont alimentés journalièrement par des feuilles fraîches de kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) et de sorgho fourrager (*Sorghum vulgare*). L'alimentation est enrichie par l'ajout de son de blé comme source de protéines. Le substrat de ponte est composé par ⅔ de tourbe et ⅓ de sable stériles. Les pondoirs sont renouvelés chaque jour, incubés dans une étuve réglée à 30 °C et humidifiés quotidiennement.

## **2.2 PRÉPARATION DES EXTRAITS**

### **2.2.1 DES GLANDES ACCESSOIRES FEMELLES**

Les femelles destinées à la dissection sont prises juste avant la ponte. A cette période, les glandes accessoires sont en pleine activité sécrétoire. Sous loupe binoculaire et dans une solution de liquide physiologique de Ringer (9.82 g/L NaCl, 0.32 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.48 g/L KCl, 0.73 g/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25 g/L NaHCO<sub>3</sub>, et 0.19 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=6.5) [11], on pratique une ouverture longitudinale sur la face dorsale de l'abdomen depuis le thorax jusqu'à l'extrémité terminale de l'abdomen. Les deux glandes accessoires sont des expansions antérieures des oviductes. De teinte légèrement rosée, elles sont beaucoup plus plissées que les oviductes. Elles sont alors coupées à l'aide de pinces très fines et sont soit prises en totalité soit seulement leur contenu est utilisé. Dans le premier cas, elles sont immergées en totalité dans du Tris pH = 6.8 à raison de 20 glandes/0.5 ml et broyées. Ensuite, l'extrait est soumis au sonificateur à bain pendant 2min afin d'assurer la rupture des cellules de la paroi des glandes accessoires et centrifugée à 6000 g durant 20 min à 4 °C. Dans le deuxième cas, elles sont perforées et seulement leur contenu est récupéré dans du Tris. Pour l'analyse peptidique par HPLC, les glandes accessoires des femelles grégaires et solitaires sont recueillies dans une solution de méthanol/eau/acide acétique (v/v/v ; 90/9/1). Les solutions sont mises au sonificateur 5 fois pendant 1 min. Après centrifugation à 10000 g pendant 10 min, le surnageant est séché à l'aide d'un centrifugeur sous vide (SpeedVac Concentrator SVC200H, Savant) [11].

### **2.2.2 DE L'HÉMOLYPHE**

20 µl d'hémolymphe des femelles grégaires et solitaires ont été recueillies moyennant un tube capillaire en verre par ponction de l'abdomen après avoir introduit une aiguille au niveau du point d'insertion du fémur au niveau de l'abdomen. Chaque 20 µl est collecté dans 80 µl de tampon d'extraction (0.1 M Tris-HCl (pH = 8.5) contenant 0.25 M NaCl, 0.1% Triton-X 100) dans de la glace. Alors que dans le cas des larves du premier stade, le contenu de chaque larve est utilisé directement sans être dilué dans le tampon puisque le volume total de l'hémolymphe n'excède pas 2 µl. Pour l'analyse peptidique par HPLC, un volume de 20 µl d'hémolymphe de chacune des femelles grégaires et solitaires est recueilli dans 200 µl de tampon d'extraction constitué par du méthanol/eau MilliQ/acide acétique (v/v/v ; 90/9/1). Les solutions sont centrifugées à 13000 rpm pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est collecté et mélangé avec 400 µl d'une solution aqueuse à 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA). Le méthanol est évaporé à l'aide d'un centrifugeur sous vide (SpeedVac Concentrator SVC200H, Savant). La solution aqueuse est ensuite extraite avec 200 µl d'une solution de n-hexane afin d'éliminer les lipides. Le reste des solvants est éliminé par le speedvac. Les couches aqueuses sont diluées une autre fois avec 0.1 % TFA et filtrées avec une membrane Millipore PVDF (la taille des pores est de 0.45 µm) [12].

### **2.2.3 DE LA MATIÈRE SPUMEUSE**

Des oothèques fraîchement pondues par des femelles grégaires et solitaires ont été collectées, débarrassées du sable par un pinceau et les bouchons de la matière spumeuse qui les surmontent sont découpés, dissouts dans une solution de dichlorométhane à raison de 2 écumes/100 µl et les solutions sont filtrées afin d'éliminer le reste de la matière spumeuse non dissoute. Selon Moumène [10], ce solvant est le meilleur pour une bonne séparation de l'extrait de la matière spumeuse.

### **2.2.4 DES ŒUFS**

Des œufs issus des femelles grégaires et solitaires sont collectés depuis le jour de la ponte jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire. Chaque œuf est homogénéisé dans 100 µl de tampon d'extraction (0.1 M Tris-HCl (pH = 8.5) placé dans la glace et contenant 0.25 M NaCl, 0.1 % Triton-X 100. Après centrifugation à 2000 g, le surnageant est collecté pour une utilisation ultérieure.

## **2.3 PROCÉDÉS EXPÉRIMENTAUX**

### **2.3.1 DOSAGE DES PROTÉINES**

Après centrifugation de l'extrait des glandes accessoires, des œufs et de l'hémolymphe à 2000 g afin d'éliminer les matériaux insolubles, le surnageant est récupéré pour le dosage des protéines. Le dosage est déterminé en utilisant « Microplate Manager 5.1, Japon ». La lecture est effectuée à 595 nm. Ce dosage est effectué en vue d'une analyse par

électrophorèse. La concentration en protéines est gardée identique au niveau des différents échantillons afin de bien comparer entre la phase grégaire et solitaire.

### 2.3.2 TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

20 µg de protéines sont séparés par SDS-PAGE [13]. Le gel pré-coulé (gel gradient 4-12 % Bis Tris NuPAGE, Novex, Invitrogen) est rincé dans de l'eau et placé dans l'appareil à électrophorèse (Bio-Rad Protean 32 CM system) rempli de tampon de migration « MES 1x Nupage ». Ce dernier est préparé après une dilution du tampon « MES 20x Nupage, Invitrogen » (950 ml eau ultra-pure + 50 ml MES 20X Nupage). Le marqueur SeeBlue (Novex) est utilisé pour estimer les masses moléculaires. La migration est effectuée pendant 35 min à 200 volt. Le gel est coloré au bleu de Coomassie (Coomassie Blue Staining Kit, Invitrogen: 0.1 % de Coomassie® R-250 dans 40 % éthanol et 10 % acide acétique) et les protéines sont révélées après décoloration par une solution de méthanol et d'acide acétique (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/proteins-expressionisolation-and-analysis/sds-page-protocol/one-dimensional-sds-gel-electrophoresis-of-proteins-pre-cast-gels-.html>).

### 2.3.3 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants. Elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants.

#### 2.3.3.1 PRÉPARATION DE LA CUVE

Le mélange [Dichlorométhane/Hexane (v/v)], les meilleurs solvants permettant la séparation des composés de la matière spumeuse [10], est versé dans la cuve une demi-heure avant de procéder à la séparation. Le volume versé dans la cuve fait 1 cm d'hauteur. Afin de faciliter la saturation, un papier filtre imbibé d'éluant est placé dans la cuve.

#### 2.3.3.2 PRÉPARATION DE LA PLAQUE

La phase stationnaire est constituée d'une couche mince de gel de silice d'épaisseur (0.2 mm) et de dimension (10 × 20 cm) déposée sur une plaque d'aluminium. On trace une ligne de dépôt à environ 10 mm du bord basal de la plaque. Ensuite, on dépose à l'aide d'un capillaire 5 à 6 µl de chaque extrait de la matière spumeuse grégaire et solitaire en gardant une distance d'au moins 7 à 8 mm entre chaque dépôt. Le diamètre des dépôts n'excède pas 3 mm. La plaque est séchée à l'air libre.

#### 2.3.3.3 MIGRATION

On place la plaque dans la cuve contenant les deux solvants en ouvrant et fermant celle-ci le plus rapidement possible. On laisse diffuser la solution de Dichlorométhane/Hexane le long de la plaque. Une fois elle atteint environ 10 mm du haut de la plaque, on fait sortir cette dernière et on la fait sécher au sèche cheveux. Afin d'avoir plus de précision, une deuxième diffusion a été effectuée avec le Dichlorométhane.

#### 2.3.3.4 REVELATION ET CALCUL DES RAPPORTS FRONTAUX

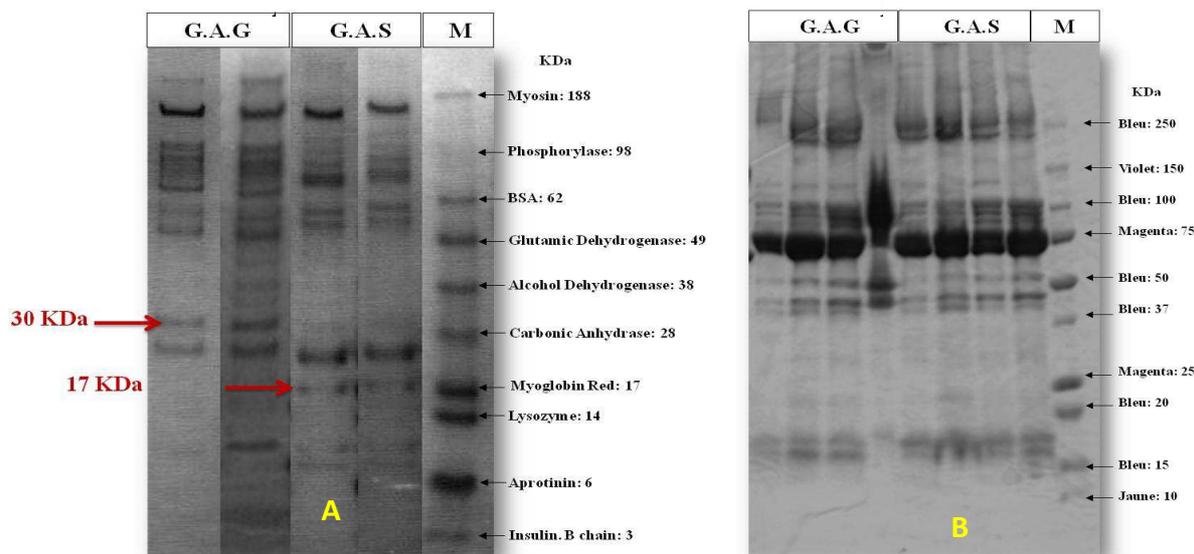
La révélation a été effectuée à l'aide d'une lampe fluorescente en absorption UV à 250 nm dans une chambre sombre. Ainsi, on procède enfin au calcul des rapports frontaux ( $R_f$ ) définis pour chaque tâche comme le rapport de la distance parcourue par un dépôt sur la distance parcourue par l'éluant depuis la ligne de base :

$$R_f = \text{Distance parcourue par le composé (mesurée au centre de la tache)} / \text{Distance parcourue par le front du solvant}$$

### 3 RESULTATS

#### 3.1 ETUDE COMPARATIVE PAR SDS-PAGE DES PROTÉINES DES GLANDES ACCESSOIRES DES FEMELLES GRÉGAIRES ET SOLITAIRES

L'analyse par SDS-PAGE des protéines des glandes accessoires entières, dépendantes de la différence de phases, a révélé, (Figure 1A) la présence de deux bandes: l'une est de masse moléculaire 30 KDa et caractéristique de la phase grégaire. Alors que l'autre, de masse moléculaire 17 KDa, existe seulement au niveau de la phase solitaire.

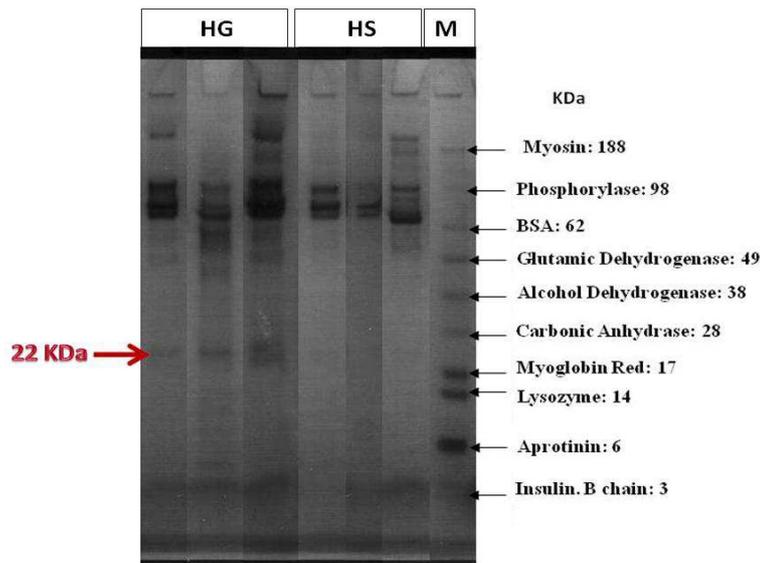


**Fig 1. Gels SDS-PAGE 4-12% des protéines des glandes accessoires des femelles grégaires et solitaires. A : extrait des glandes accessoires entières ; B : extrait du contenu des glandes accessoires ; G.A.G : glandes accessoires grégaires ; G.A.S : glandes accessoires solitaires ; M : marqueur de taille (M (A) See Blue; M (B) Kaléidoscope). Les quantités de chaque échantillon chargées dans chaque puits sont respectivement de gauche à droite 5, 10, 5, 5 et 5µl dans le cas de A et 5, 10, 10, 10, 5, 10, 10, 10 et 5µl dans le cas de B. Les flèches rouges indiquent les bandes différentielles.**

L'analyse des extraits du contenu des glandes accessoires après ponction de la membrane n'a pas montré de différences au niveau du contenu protéique (Figure 1B). Ces résultats montrent que les protéines, liées à la différence phasaire, sont de nature membranaire puisque seulement le profil électrophorétique des extraits des glandes accessoires entières (Figure 1A) a indiqué la présence de protéines différentielles.

#### 3.2 ETUDE COMPARATIVE PAR SDS-PAGE DES PROTÉINES DE L'HÉMOlymphe DES FEMELLES GRÉGAIRES ET SOLITAIRES

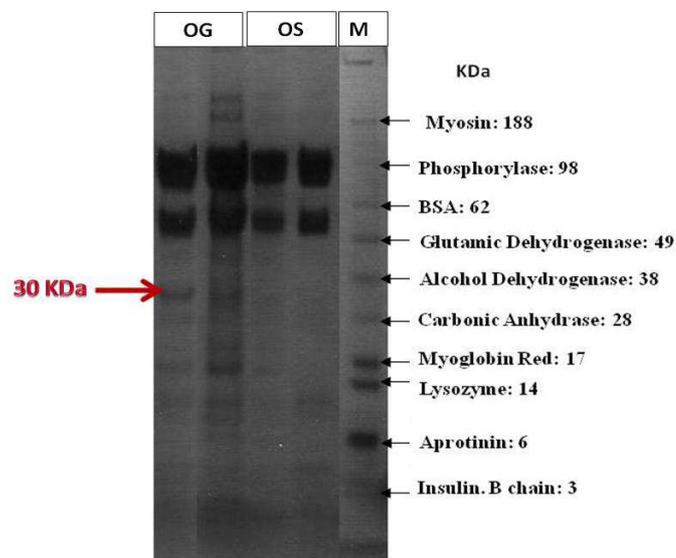
L'analyse électrophorétique de l'hémolymphe des femelles grégaires et solitaires, après révélation par le bleu de coomassie, a mis en évidence la présence d'une bande différentielle de masse moléculaire 22 KDa présente au niveau de l'hémolymphe des femelles grégaires et absente chez leurs congénères solitaires (Figure 2).



**Fig 2.** Gels SDS-PAGE 4-12% de l'hémolymphe des femelles matures âgées de 20 jours grégaires et solitaires. M : marqueur de taille; HG : hémolymphe des femelles grégaires ; HS : hémolymphe des femelles solitaires. Les quantités de chaque échantillon chargées dans chaque puits sont respectivement de gauche à droite 10, 5, 10, 5, 5, 10 et 5 $\mu$ l. La flèche rouge indique la bande différentielle.

### 3.3 ETUDE COMPARATIVE PAR SDS-PAGE DES PROTÉINES DES OVOCYTES MATURES ISSUS DES FEMELLES GRÉGAIRES ET SOLITAIRES

L'étude du contenu en protéines des ovocytes matures des femelles grégaires et solitaires prouve la transmission d'un facteur grégairisant des femelles grégaires à leurs descendants via le contenu des glandes accessoires. La protéine transmise est de masse moléculaire 30 KDa (Figure 3). Cette protéine est absente au niveau des ovocytes solitaires.



**Fig 3.** Gels SDS-PAGE 4-12% des protéines des ovocytes matures issus des femelles grégaires et solitaires. OG: ovocytes grégaires; OS : ovocytes solitaires ; M : marqueur de taille. Les quantités de chaque échantillon chargées dans chaque puits sont respectivement de gauche à droite 5, 20, 5, 5 et 5 $\mu$ l. La flèche rouge indique la bande différentielle.

### 3.4 ETUDE COMPARATIVE DES COMPOSES DE LA MATIERE SPUMEUSE GREGAIRE ET SOLITAIRE

L'analyse du contenu de la matière spumeuse de la phase grégair et solitaire par Chromatographie sur couche mince a décelé une variation phasaire au niveau du nombre des composés de la matière spumeuse. En effet, la première diffusion (Dichlorométhane/Hexane) a révélé quatre spots au niveau de la matière spumeuse grégair. Alors que trois spots seulement

ont été détectés dans la matière spumeuse solitaire (Figure 4A). Dans la deuxième diffusion (Dichlorométhane), quatre spots ont été révélés dans la matière spumeuse solitaire et un spot additionnel est apparu au niveau de la matière spumeuse grégaire (Figure 4B; Tableau 1).

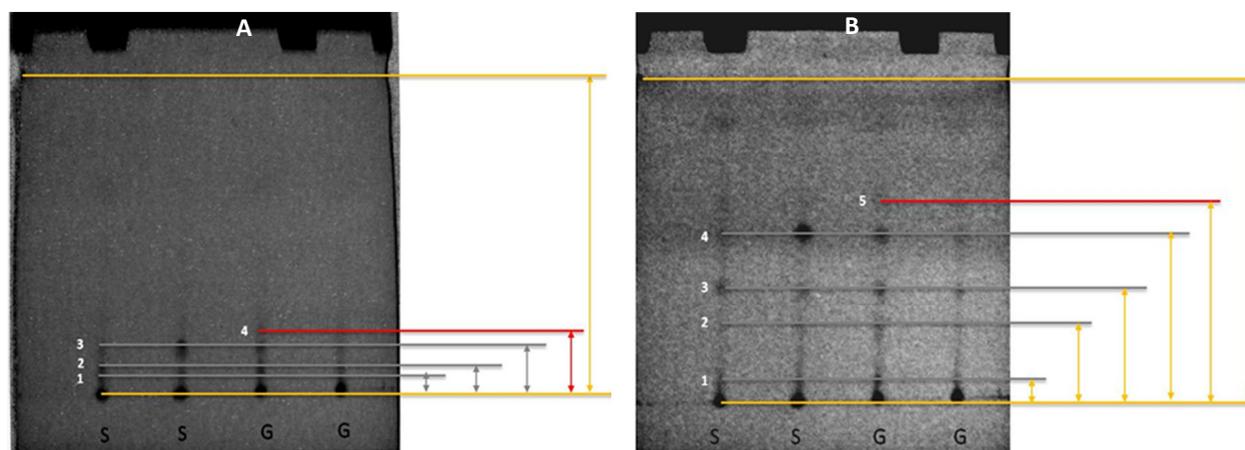


Fig 4. Chromatogrammes de la matière spumeuse grégaire et solitaire obtenus par CCM. La première diffusion est effectuée par Dichlorométhane/Hexane (A) et la deuxième est effectuée par Dichlorométhane (B). Les lignes en jaune indiquent la base et le front de la couche ; les lignes grises représentent le niveau des spots similaires ; la ligne rouge montre le niveau des spots différentiels ; S : solitaire ; G : grégaire.

Tableau 1. Analyse différentielle des rapports frontaux des différents composés de la matière spumeuse grégaire et solitaire.

Diffusion	Composés	Matière spumeuse grégaire	Matière spumeuse solitaire
Dichloro- méthane/ Hexane	C1	0.06	0.06
	C2	0.08	0.08
	C3	0.15	0.15
	C4	0.19	---
Dichloro- méthane	C1	0.07	0.07
	C2	0.24	0.24
	C3	0.35	0.35
	C4	0.52	0.52
	C5	0.62	---

### 3.5 ETUDE COMPARATIVE PAR SDS-PAGE DES PROTEINES DES ŒUFS ISSUS DES FEMELLES GREGAIRES ET SOLITAIRES

L'analyse des protéines contenues dans les œufs grégaires et solitaires par SDS-PAGE a révélé la présence d'une bande de masse moléculaire 263 KDa qui disparaît à partir du premier jour de la vie embryonnaire chez la phase solitaire (Figure 5B). Cette même bande persiste tout au long de la vie embryonnaire chez la phase grégaire (Figure 5A).

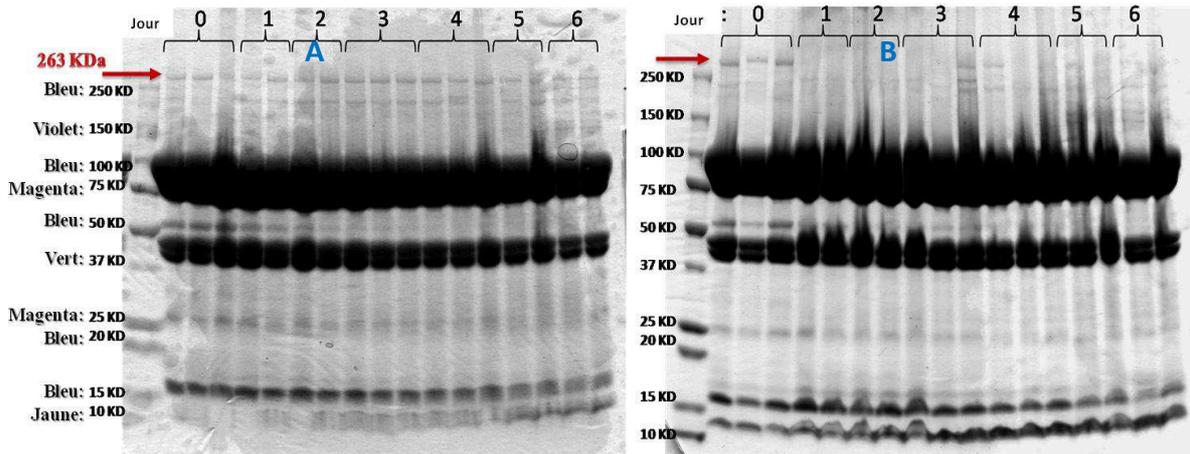


Fig 5. Gels SDS-PAGE 4-12% des protéines contenues dans les embryons grégaires (A) et solitaires (B) âgés de 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 jours de *L. migratoria*. 5µl de chaque échantillon sont déposées dans chaque puits. La flèche rouge indique la bande différentielle.

### 3.6 ETUDE COMPARATIVE PAR SDS-PAGE DES PROTEINES DE L'HEMOLYPHE DES LARVES DU PREMIER STADE

Une bande différentielle, de masse moléculaire de 66 KDa, a été détectée au niveau des protéines contenues dans l'hémolymphe des larves grégaires de premier stade âgées de 1 jour (Figure 6).

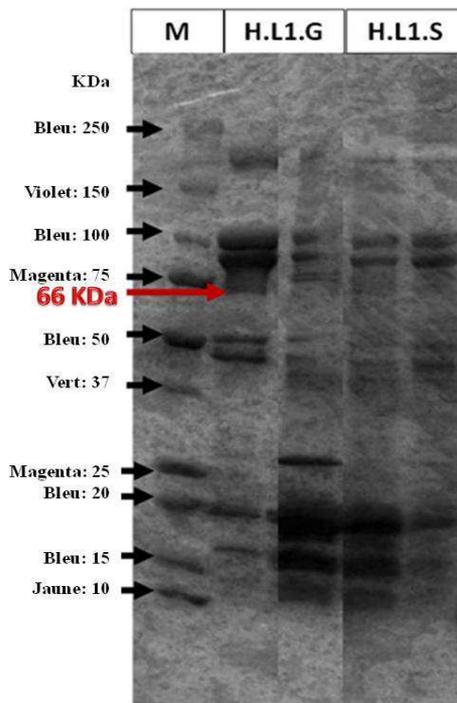


Fig 6. Gels SDS-PAGE 4-12% de l'hémolymphe des larves de premier stade grégaires et solitaires. H.L1.G : hémolymphe des L1 grégaires ; H.L1.S : hémolymphe des L1 solitaires ; M : marqueur de taille Kaléidoscope. 5µl de chaque échantillon sont déposées dans chaque puits. La flèche rouge indique la bande différentielle.

## 4 DISCUSSION

Chez *L. migratoria*, le facteur spécifique de la phase grégaire a été décelé par la technique d'électrophorèse au niveau des glandes accessoires des femelles grégaires. Il est de masse moléculaire 30 KDa. Ces résultats sont confirmés par Ben Hamouda *et al.* [14] qui ont montré suite à une analyse par Chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) la présence d'un peptide chez la phase grégaire dont l'abondance est beaucoup plus importante que chez la phase solitaire. Ces résultats

confirment aussi ceux obtenus par Ben Hamouda *et al.* [15] dans le cas de *Schistocerca gregaria*. En effet, un peptide déterminé au niveau des glandes accessoires grégaires, présent à très faibles doses chez la phase solitaire. Cette protéine de masse moléculaire 30 KDa est absente au niveau des glandes accessoires solitaires. Ces données confirment la présence d'une substance femelle de grégarisation comme dans le cas de *Schistocerca gregaria* [10]. Selon ce même auteur [10], chez cette espèce, elle est de masse moléculaire comprise entre 45 et 50 KDa. Cette protéine n'apparaît pas dans le contenu des glandes accessoires grégaires. Ceci, nous indique la nature membranaire de ce facteur. La sonification du broyat des glandes accessoires a permis la rupture des cellules de la paroi des glandes accessoires permettant la libération de ce facteur protéique. A maturité sexuelle et en pleine activité des glandes accessoires grégaires, ce facteur n'existe pas dans le contenu de ces glandes. Par conséquent, la libération de ce facteur à l'intérieur de la glande s'effectuerait au moment de la ponte. En parallèle, une bande protéique solitaire de masse moléculaire 17 KDa est absente chez les femelles grégaires. Cette différence se traduit aussi par la présence d'un peptide spécifique de la phase solitaire, absent au niveau des glandes grégaires [14]. Cette étude confirme les travaux antérieurs concernant la présence d'une substance femelle de grégarisation au niveau des glandes accessoires des femelles grégaires de *S. gregaria* [10], [15], [16].

Une étude préliminaire entreprise sur *Schistocerca gregaria* par Ammar *et al.* [17] a montré la présence d'une différence au niveau de l'expression des gènes des glandes accessoires solitaires et grégaires. L'étude par PAGE des produits amplifiés par PCR des ADNc synthétisés à partir de ces ARNm a révélé en effet l'existence d'une bande supplémentaire chez les glandes accessoires des solitaires et non chez les glandes accessoires des grégaires. Cette fraction traduirait l'existence d'un gène qui ne s'exprime pas dans les glandes accessoires chez les grégaires. Elle pourrait être interprétée comme étant à l'origine de la synthèse des inhibiteurs qui agirait en désactivant la substance de grégarisation sécrétée par la femelle ou en masquant le gène qui en est responsable.

Les facteurs spécifiques de la phase grégaire existent aussi au niveau de l'hémolymphe. Une protéine de masse moléculaire 22 KDa présente chez la phase grégaire et absente chez la solitaire. Le seul travail montrant la présence d'un tel facteur grégarisant au niveau de l'hémolymphe est celui de Rahman *et al.* [12] sur *S. gregaria*. Ce dernier a pu identifier un peptide spécifique de la phase grégaire de masse moléculaire de 6080 Da. Ces résultats confirment ceux de Ben Hamouda *et al.* [14] qui ont révélé la présence de ce peptide par la présence d'un pic majoritaire de la phase grégaire alors que d'autres pics, qui sont minoritaires, deviennent majoritaires chez la phase solitaire suite à une analyse par Chromatographie liquide en phase inverse. De même, ils ont montré que chez *L. migratoria*, deux pics majoritaires chez les femelles grégaires diminuent au niveau de l'hémolymphe de leurs congénères solitaires alors qu'un autre pic devient plus important chez la phase solitaire. Ces données sont à l'origine de l'intervention des composés grégarisants et solitarisants de l'hémolymphe dans la régulation de la synthèse et la sécrétion de la substance femelle de grégarisation au niveau des glandes accessoires.

Les facteurs présents au niveau des glandes accessoires se sont transmis aux ovocytes à travers les oviductes. En effet, une bande protéique de masse moléculaire 30 KDa a été discernée au niveau des ovocytes matures grégaires. Elle est absente chez les solitaires.

La substance grégarisante est transmise au bouchon surmontant l'oothèque via la matière spumeuse. En effet, dans le deuxième chapitre, nous avons montré l'effet maternel dans la transmission des caractéristiques phasaires aux descendants. Par ailleurs, c'est l'expression de la substance femelle de grégarisation, décelée au niveau des glandes accessoires, qui reflète les caractéristiques phénotypiques de la progéniture. Ce facteur se présente par un spot supplémentaire lors de l'analyse de la matière spumeuse grégaire par CCM. Dans le cas de la matière spumeuse grégaire de *S. gregaria*, le facteur grégarisant a un rapport frontal de 0.07 [10].

La bande protéique, de masse moléculaire 30 KDa, révélée par SDS-PAGE au niveau des ovocytes matures grégaires, n'apparaît plus au niveau des œufs pondus. Par ailleurs, une autre bande de masse moléculaire 263 KDa existe tout au long des six premiers jours de la vie embryonnaire chez la phase grégaire. Alors qu'au niveau des embryons solitaires, elle disparaît à partir du 1<sup>ier</sup> jour. Au niveau des œufs solitaires de *S. gregaria*, la bande protéique spécifique de la phase grégaire disparaît à partir du 4<sup>ième</sup> jour [10]. Cette protéine, qui disparaît au delà du jour de la ponte au niveau des œufs solitaires, est en relation étroite avec le rôle joué par la matière spumeuse. En effet, selon Ben Hamouda *et al.* [18], la suppression de la matière spumeuse grégaire le jour de la ponte supprime l'effet de la protéine grégarisante ce qui permet l'apparition de larves à caractéristiques solitaires. Tandis que l'élimination de la matière spumeuse au delà du jour de la ponte n'induit pas d'effet solitarisant. Cela est en concordance avec les profils électrophorétiques des œufs. Chez *S. gregaria*, Moumène [10] a montré que la période sensible à l'élimination de l'effet de la protéine grégarisante est de trois jours.

Phénotypiquement, les différences phasaires majeures, observées sur les larves du premier stade de *L. migratoria*, sont la taille et la coloration. Outre ces différences morphologiques, une variation d'ordre physiologique a été observée par la

présence d'une bande protéique différentielle de masse moléculaire 66 KDa chez la phase grégaire et absente chez la solitaire.

## 5 CONCLUSION

La spécificité trans-générationnelle de la substance femelle de grégarisation se révèle par la présence au niveau des ovocytes grégaires de la même bande protéique observée au niveau des glandes accessoires. Elle est de masse moléculaire 30 KDa et elle s'est transmise des glandes accessoires vers les ovocytes. Outre, l'analyse de la matière spumeuse grégaire par chromatographie sur couche mince a montré la présence d'un spot supplémentaire, absent au niveau de la matière spumeuse solitaire. Au niveau des œufs grégaires, une bande protéique de masse moléculaire de l'ordre de 263 KDa existe tout au long des 6 premiers jours de la vie embryonnaire. Alors qu'elle disparaît dès le premier jour après la ponte au niveau des œufs solitaires. Les larves du premier stade grégaires présentent aussi une différence au niveau des protéines de l'hémolymphe. En effet, une bande protéique de masse moléculaire 66 KDa est observée chez les larves grégaires, absente chez leurs congénères solitaires. Au niveau des glandes accessoires solitaires, un peptide a été révélé par RPLC, absent chez la phase grégaire et l'analyse par SDS-PAGE a montré la présence d'une bande protéique, de masse moléculaire 17 KDa, également de nature membranaire. La matière spumeuse solitaire présente un peptide dont l'abondance est plus importante qu'au niveau de la matière spumeuse grégaire suite à l'analyse par RPLC. Ce facteur spécifique de la phase solitaire semble jouer le rôle d'un inhibiteur de la substance femelle de grégarisation.

## REFERENCES

- [1] Uvarov B.P.S., Grasshoppers and Locusts-A Handbook of General Acridology, Vol. 1, Cambridge, *Cambridge University Press*, 1966.
- [2] Uvarov B.P.S., Grasshoppers and Locusts, vol. 2, Centre for Overseas Pest Research, London, 1977.
- [3] M.P. Pener, "Locust phase polymorphism and its endocrine relations", *Advances in Insect Physiology*, vol. 23, pp. 1-79, 1991.
- [4] M.P. Pener and Y. Yerushalmi, "The physiology of locust phase polymorphism: an update", *Journal of Insect Physiology*, vol. 44, pp.365-377, 1998.
- [5] H. Verlinden, L. Badisco, E. Marchal, P. Van Wielendaele and J. Vanden Broeck, "Endocrinology of reproduction and phase transition in locusts", *General and Comparative Endocrinology*, vol. 162, pp. 79-92, 2009.
- [6] S. W. Applebaum and Y. Heifetz, "Density-dependent physiological phase in insects", *Annual Review of Entomology*, vol. 44, pp. 317-341, 1999.
- [7] A. De Loof, I. Claeys, G. Simonet, P. Verleyen, T. Vandersmissen, F. Sas and J. Huybrechts, "Molecular markers of phase transition in locusts", *Insect Science*, vol. 13, pp. 3-12, 2006.
- [8] B. P. S. Uvarov, "A revision of the genus *Locusta*, L. (= *Pachytylus*, Fieb.), with a new theory as to periodicity and migrations of locusts", *Bulletin of Entomological Research*, vol. 12, pp. 135-163, 1921.
- [9] K. Moumène, M. Ammar, N. Barbouche, B. Hajjem et M. H. Ben Hamouda, "Identification d'un composé de la matière spumeuse responsable de la grégarisation chez le criquet pélerin *Schistocerca gregaria* (Orthoptera-acrididae)", *Annales de l'INRAT*, vol. 74, pp. 99-111, 2001.
- [10] Moumène K., La transformation phasaire chez le Criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* Forskal 1775 (Orthoptera: Acrididae): Mécanisme et identification des caractéristiques écophysiologicals de la substance femelle de grégarisation, *Thèse de doctorat en Biologie, Université de Tunis- El Manar- Faculté des Sciences de Tunis*, 2002.
- [11] E. Clynen, G. Baggerman, J. Huybrechts, L. Vanden Bosch, A. De Loof, and L. Schoofs, "Peptidomics of the locust corpora allata: identification of novel pyrokinins (-FXPRLamides)", *Peptides*, vol. 24, pp. 1493-1500, 2003.
- [12] M. M. Rahman, L. Vanden Bosch, G. Baggerman, E. Clynen, K. Hens, B. Hoste, K. Meylaers, T. Vercammen, L. Schoofs, A. De Loof and M. Breuer, "Search for peptidic molecular markers in hemolymph of crowd-(gregarious) and isolated-reared (solitary) desert locusts, *Schistocerca gregaria*", *Peptides*, vol. 23, pp. 1907-1914, 2002.
- [13] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- [14] A. Ben Hamouda, M. Trabelsi, M. Ammar, A. De loof and M. H. Ben Hamouda, "Neurosecretion and peptides in *Locusta migratoria migratoria*: Comparative analysis in relation to phase polyphenism", *European Journal of Zoological Research*, vol. 3, n° 3, pp. 8-14, 2014.
- [15] A. Ben Hamouda, M. Ammar, A. De Loof, A. Bouain and M. H. Ben Hamouda, "Comparative study of peptides from the female's accessory glands and oocytes of solitary and gregarious *Schistocerca gregaria*", *Metaleptra* (Special Meeting), pp. 80, 2009.

- [16] A. R. McCaffery, S. J. Simpson, M. S. Islam and P. Roessingh, "A gregarizing factor present in the egg pod foam of the desert locust *Schistocerca gregaria*", *Journal of Experimental Biology*, vol. 201, pp. 347-363, 1998.
- [17] M. Ammar, M. H. Ben Hamouda, N. Barbouche et K. Moumène, "Apparition de la phase solitaire chez le Criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria*, par simple isolement des œufs 3 jours après la ponte", *49<sup>ème</sup> Symposium International de Phytatrie et de Phytopharmacie, Medical Faculty of Landbouw University of Gent, Belgique*, pp. 339-348, 1997.
- [18] A. Ben Hamouda, M. Ammar, M. H. Ben Hamouda and A. Bouain, "The role of egg pod foam and rearing conditions on the phase state of the Asian migratory locust *Locusta migratoria migratoria* (Orthoptera, Acrididae)". *Journal of Insect Physiology*, vol. 55, pp. 617-623, 2009.