

ANPP - QUATRIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES
RAVAGEURS EN AGRICULTURE
MONTPELLIER 6-7-8 JANVIER 1997

TOXICITÉ DES ISOTHIOCYANATES SUR *CALLOSOBROCHUS*
MACULATUS (COLEOPTERA : BRUCHIDAE),
RAVAGEUR DES STOCKS DE NIÈBE EN AFRIQUE TROPICALE

V. LIÉNARD, J. MIGNON

UER de Zoologie générale et appliquée
Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux
Passage des Déportés, 2 - 5030 GEMBLoux - BELGIQUE

RÉSUMÉ :

La toxicité de cinq isothiocyanates, l' α naphthyl isothiocyanate (α NaITC), l'allyl isothiocyanate (AITC), le benzyl isothiocyanate (BITC), le phényl isothiocyanate (PITC) et le phénéthyl isothiocyanate (PhITC) a été évaluée au laboratoire sur un important ravageur du niébé stocké, *Callosobruchus maculatus*. Par ordre croissant de toxicité on trouve l'AITC, l' α NaITC, le BITC, et le PITC. L'impact des isothiocyanates sur le système enzymatique des glutathion S-transférases (GST) a été mesuré et montre que les GST se comportent différemment vis-à-vis des différentes substances. En effet, l'AITC n'affecte pas l'activité GST des extraits bruts d'adultes de *C. maculatus*, l' α NaITC et le BITC l'inhibent, tandis que le PITC et le PhITC l'induisent.

Mots-clés : isothiocyanate, glutathion S-transférase, *Callosobruchus maculatus*, toxicité, denrées stockées

SUMMARY : TOXICITY OF ISOTHIOCYANATES

The toxicity of five isothiocyanates (α naphthylisothiocyanate (α NaITC), allyl isothiocyanate (AITC), benzylisothiocyanate (BITC), phenylisothiocyanate (PITC) and phenethylisothiocyanate (PhITC) was evaluated on an important stored-product insect, *Callosobruchus maculatus*. By increasing level of toxicity, we found the AITC, the α NaITC, the BITC, the PITC and the PhITC. The impact of the isothiocyanates on insect enzymatic system of glutathione S-transferase (GST) has been measured and showed that the GST behaved differently against different substances. The results showed that the AITC had no effect on GST activity of crude extract of adults, that the BITC and the α NaITC inhibited it and that the PITC and PhITC induced it.

Key words : isothiocyanate, glutathione S-transferase, *Callosobruchus maculatus*, toxicity, stored product.

INTRODUCTION

Callosobruchus maculatus (Coleoptera : Bruchidae), plus connu sous le nom de bruche du niébé, est le ravageur le plus dommageable des stocks de niébé (*Vigna unguiculata*) en Afrique tropicale. L'importance des dommages qui peut atteindre 100% en quelques mois justifie le développement de méthodes de lutte appropriées. Faute de moyens financiers et techniques, les agriculteurs recourent, depuis de nombreuses années, aux méthodes de lutte traditionnelles. Parmi celles-ci, l'utilisation de feuilles fraîches de *Boscia senegalensis* (Capparaceae) s'est avérée très efficace. Les paysans récoltent les feuilles et les broient avant de les mélanger aux graines de niébé au moment du stockage. Le glucosinolate présent, la glucocapparine, est alors hydrolysée et libère l'isothiocyanate de méthyle (MITC). Ce composé, caractérisé pour la première fois en 1868 par Hoffman, est aujourd'hui utilisé comme fumigant de sol pour contrôler les champignons, les insectes, les nématodes ou encore, les adventices (Ducum, 1994). La toxicité du MITC sur plusieurs insectes des denrées stockées dont *C. maculatus* a été démontrée au laboratoire (CL50 sur *C. maculatus* = 0.73 ppm) (Seck et al., 1993). D'autres auteurs ont mis en évidence les relations existant entre le système enzymatique des glutathion S-transférases (GST) et les isothiocyanates. Ce système enzymatique quasi universel serait inclus dans les phénomènes de résistance aux insecticides. Nos recherches effectuées ultérieurement ont montré une induction de l'activité GST dans des extraits bruts de *C. maculatus* traités au MITC (Liénard & Haubruge, 1994).

Dans cette étude, nous avons testé d'une part, la toxicité de cinq isothiocyanates (l'allyl-, le benzyl-, l'anaphyl-, le phényl- et le phénéthyl-isothiocyanates) sur les adultes de *C. maculatus* et d'autre part, leur impact sur le système enzymatique des GST.

LES ISOTHIOCYANATES

Historique. Les isothiocyanates ont été identifiés au siècle dernier. Ils sont issus de la décomposition des glucosinolates, substances soufrées présentes dans plusieurs familles végétales dont les Capparaceae (Kjaer, 1974). Ces plantes contiennent des enzymes, les thioglucosidases (E.C. 3.2.3.1.), qui hydrolysent les glucosinolates en isothiocyanates (Figure 1).

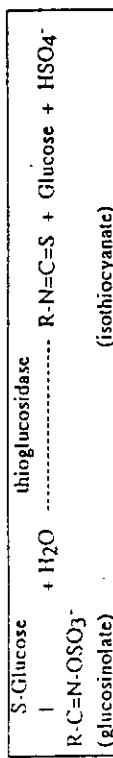


Figure 1. Dégradation des glucosinolates par les "thioglucosidase" (Tang & Tang, 1976).

Les isothiocyanates chez les insectes. Depuis les années 70, plusieurs isothiocyanates aromatiques ont été examinés quant à leur mode d'action en tant qu'insecticide. Les propriétés insecticides sur les larves et les adultes de plusieurs insectes ont été mises en évidence (Bakry et al., 1968). Basé sur ces considérations,

plusieurs isothiocyanates aromatiques ont été synthétisés et testés sur des insectes (Weber et al., 1992). Ces composés aromatiques stoppent le développement du charançon des grains (*Sitophilus granarius*) et induisent des déformations morphologiques chez "European cutworm" (*Agrotis segetum*). Les isothiocyanates perturbent la formation de la cuticule des insectes et agissent comme des hormones juvéniles. Plusieurs isothiocyanates synthétiques ont des propriétés de régulateur de croissance chez les insectes (Ujvary et al., 1989). Sattelle & Callec (1977) ainsi que Geppner et al. (1978) ont démontré que les isothiocyanates, qui montrent une activité insecticide, sont des antagonistes des récepteurs acétylcholine du système nerveux central chez la blatte américaine *Periplaneta americana*.

Les isothiocyanates et le système enzymatique des Glutathion S-transférases (GST). Les études réalisées chez le rat après marquage radioactif au ^{35}S suggèrent que le conjugué cystéine est partiellement clivé en isothiocyanate, lequel est alors reconjugué avec le ^{35}S [GSH et excrété sous forme d'acide ^{35}S]mercaptanique (Bräsewitz et al., 1977). Plusieurs isothiocyanates sont des inducteurs des GST des tissus animaux et présentent une forte activité anticarcinogène (Chasseaud, 1979). L'allyl isothiocyanate et le benzyl isothiocyanate se comportent comme agents inducteurs de certaines sous-unités GST du foie de rat (Bogaards et al., 1990; Vos et al., 1988). Récemment, quatorze isothiocyanates ont été identifiés comme étant des substrats des GST humains (Kollm et al., 1995). Les premières études réalisées chez les insectes montrent des différences entre les espèces. L'activité GST, chez les insectes spécialistes, est faible comparée à celle mesurée chez les insectes polyphages (Yu, 1989). De plus, Yu (1989) a montré que les GST de deux espèces de Lépidoptère (*Auticarsia gemmatilis* et *Spodoptera frugiperda*) sont induits par l'allyl-, le phényl- et le benzyl-isothiocyanates. Ces composés sont métabolisés par ces mêmes GST d'insectes. Récemment, Liénard et Haubruge (1994) ont montré que l'activité GST mesurée dans des extraits bruts de la bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus*) était induite trois fois par le méthyl isothiocyanate.

MATÉRIEL ET METHODES

Insectes. La souche de *Callosobruchus maculatus* est originaire du département de Nioro du Rip (Sénégal). Elle a été mise en élevage dans des graines de niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), variété black-eyed n°5, préalablement conditionnées à une température de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $45 \pm 5\%$.

Produits et réactifs. Le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le méthyl isothiocyanate (MITC) sont produits par la firme Fluka Chemica AG. Le glutathion réduit (GST) et le kit DC protein assay sont obtenus chez Bio-rad Laboratories (Richmond, CA, USA). L'allyl-, le benzyl-, le phényl- et le phénéthyl-isothiocyanates sont produits par Aldrich (Belgium). L'anaphyl isothiocyanate est obtenu chez Acros.

Bioessais. Les bioessais sont réalisés dans des dessiccateurs en verre de 1000 ml dans lesquels sont déposés les différentes doses (10 et 20 ppm) des isothiocyanates à tester (allyl-, benzyl-, anaphyl-, phényl- et phénéthyl-isothiocyanates) (Figure 2).

Cent adultes de *C. maculatus* sont placés dans des boîtes de pétri perforées ($\varnothing = 55$ mm) et sont introduits dans les dessiccateurs, lesquels sont fermés hermétiquement et placés dans des conditions contrôllées ($30 \pm 2^\circ\text{C}$ et $45 \pm 5\%$ HR). Chaque traitement dont le témoin est répété trois fois. L'évaluation de la mortalité est réalisée après 24 et 48 heures et les adultes vivants sont collectés pour les dosages des protéines et des glutathion S-transférases.

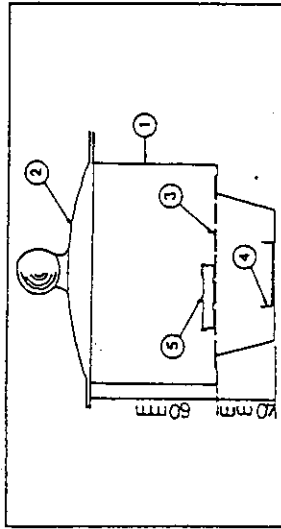


Figure 2. : Dessiccateur pour les bioessais. 1 : dessiccateur, 2 : couvercle, 3 : treillis, 4 : récipient en verre pour les isothiocyanates, 5 : boîte de pétri perforée pour les insectes.

Dosage des protéines et des glutathion S-transférases. Les adultes vivants de *C. maculatus* sont broyés dans du tampon phosphate 100 mM à pH 6,9 à la température de 4°C . Après une filtration grossière sur laine de verre, le broyat est centrifugé à 20.000 g pendant 20 minutes et le surnageant est recueilli. Le dosage des protéines totales est déterminé selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) où la bovine sérum albumine est utilisée comme référence. L'activité glutathion S-transférases est déterminée selon la méthode de Habig *et al.* (1974).

Analyse statistique. Les données sont soumises à l'analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes (Duncan's multiple-range test) avec $P < 0.05$.

RESULTATS

L'ensemble des résultats sont présentés dans les tableaux 1 et 2. Le tableau 1 présente les résultats des bioessais et met en évidence les propriétés insecticides du méthyl isothiocyanate (MITC), qui sert ici de composé de "référence", et des cinq autres isothiocyanates testés (benzyl-, allyl-, α naphthyl-, phényl- et phénéthyl-isothiocyanates). Le MITC tue tous les insectes après 24 heures à 2 ppm, de même qu'après 48 heures à 1 et 2 ppm. L'allyl isothiocyanate est le plus toxique des cinq composés testés (100% de mortalité à 2 ppm après 48 heures). Il est suivi par l' α naphthyl isothiocyanate (30 % de mortalité à la dose de 2 ppm après 48 heures), le benzyl isothiocyanate (10% de mortalité à la dose de 2 ppm après 48 heures), le phényl isothiocyanate (13% de mortalité à la dose de 2 ppm après 48 heures) et le phénéthyl isothiocyanate (7% de mortalité à la dose de 2 ppm après 48 heures).

Le tableau 2 montre les résultats des dosages de l'activité GST dans les extraits bruts d'insectes traités avec les cinq isothiocyanates ainsi qu'avec le MITC et met en évidence les différentes réponses du système enzymatique étudié. L'activité GST, exprimée en pourcents, est calculée en fonction du témoin qui est égal à 100%. Les résultats précédents montraient une induction de l'activité GST chez les adultes traités au MITC. La réponse du système enzymatique des GST varie selon l'isothiocyanate utilisé. Ainsi, l'activité GST est inhibée avec le benzyl- et l' α naphthyl-isothiocyanate; elle est inchangée avec l'allyl isothiocyanate et est induite avec le phényl- et le phénéthyl-isothiocyanate.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le tableau 1 reprenant les résultats des bioessais montre que les cinq isothiocyanates testés (benzyl-, allyl-, α naphthyl-, phényl- et phénéthyl-isothiocyanates) sont toxiques vis-à-vis des adultes de *C. maculatus*. Comparé au méthyl isothiocyanate qui est le composé produit naturellement par *Bosicia senegalensis*, ces cinq isothiocyanates sont moins efficaces pour protéger les graines de niébé stockées des attaques de *C. maculatus*.

Les dosages des activités GST dans les extraits bruts de *C. maculatus* sont présentés au tableau 2. Ce tableau montre des réponses différentes du système enzymatique des GST selon l'isothiocyanate utilisé.

Après analyse des résultats, l'AITC apparaît être le composé le plus prometteur pour protéger les graines de niébé stockées des attaques de *C. maculatus*. En effet, cet isothiocyanate est très toxique sur ce ravageur sans en affecter son système enzymatique des GST, enzymes intervenant dans les phénomènes de résistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAKRY N., METCALF R.L. & FUKUTO T.R. (1968). Organolithiocyanates as Insecticides and Carbamates Synergists. *J. Econ. Entomol.* 61 : 1303-1306.
- BOGAARDS J.J.P., VAN OMMEN B., FALKE H.E., WILLEMS M.I. & VAN BLADEREN P.J. (1990). GST subunit induction patterns sprouts, allyl isothiocyanate and goitrin in rat liver and small intestinal mucosa : a new approach for the identification of inducing xenobiotics. *Food Chem. Toxicol.* 28/2 : 81-88.
- BRUSEWITZ G., CAMERON B.D., CHASSEAUD L.F., GÖRLER K., HAWKINS D.R., KOCH H. & MENNICKE W.H. (1977). The Metabolism of Benzyl Isothiocyanate and its Cysteine Conjugate. *Biochem. J.* 162 : 99-107.
- CHASSEAUD L.F. (1979). The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.* 29 : 176-255.
- DUCOM V. (1994). Methyl isothiocyanate used as a grain fumigant. Proc. 6th Int. Working Conf. Stored-prod. Protection - vol. 1 : 91-97.

- GEYNER J.I., HALL L.M. & SATTELLE D.B. (1978). Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action. *Nature* 276 : 188-190.
- HABIG W.H., PABST M.J. & JACOBY W.B. (1974). Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* 249 : 7130-7139.
- KJAER A. (1974). The natural distribution of glucosinolates : a uniform group of sulfur-containing glycosides. *In* : Chemistry in botanical classification. Eds G. Bendz & J. Santesson. Academic Press, London : 229-234.
- KOLM R.H., DANIELSON U.H., ZHANG Y., TALALAY P. & MANNERVIK B. (1995). Isothiocyanate as substrates for human glutathione transferases : structure-activity studies. *Biochem. J.* 311 : 453-459.
- LIENARD V. & HAUBRUGE E. (1994). L'activité Glutathion S-Transférase et son induction chez *Callosobruchius maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) par différents inducteurs. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 59/2a : 487-492.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- SATTELLE D.B. & CALLEC J.-J. (1977). Actions of Isothiocyanates on the Central Nervous System of *Periplaneta americana*. *Pestic. Sci.* 8 : 735-746.
- SECK D., LOGNAY G., HAUBRUGE E., WATHELET J.-P., MARLIER M., GASPAR CH. & SEVERIN M. (1993). Biological activity of the shrub *Bosca senegalensis* (Pers.) Lam. ex Poir. (Capparaceae) on stored grain insects. *J. Chem. Ecol.* 19/2 : 377-389.
- TANG C.S. & TANG W.-J. (1976). Inhibition of papain by isothiocyanates. *Biochim. Biophys. Acta* 452 : 510-520.
- UJVARY I., MATOLCSY G., RIDDIFORD L.M., HIRUMA K. & HORWATH K.L. (1989). Inhibition of spiracle and crochets formation and juvenile hormone activity of isothiocyanate derivatives in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 35 : 259-274.
- VOS R.M.E., SNOECK M.C., VAN BERKEL W.J.H., MÜLLER F. & VAN BLADEREN P.J. (1988). Differential induction of rat hepatic glutathione S-Transferase isoenzymes by hexachlorobenzene and benzyl isothiocyanate. *Biochem. Pharmacol.* 37/6 : 1077-1082.
- WEBER B., MARTIN D. & OTTO D. (1992). Novel Insecticidal Effects of Isothiocyanate Compounds. *In* : Insecticides : Mechanism of Action and Resistance. Intercept Ltd, Andover. 63-73.
- YU S.J. (1989). Purification and Characterization of Glutathione Transferases from five Phytophagous Lepidoptera. *Pestic. Biochem. Physiol.* 35 : 97-105.

Tableau I : Mortalité (en %) des adultes de *C. maculatus* après 24 et 48 heures d'exposition au méthyl isothiocyanate (MITC), à l'allyl isothiocyanate (AITC), au benzyl isothiocyanate (BITC), à l'ornaphthyl isothiocyanate (α NaITC), au phényl isothiocyanate (PITC) et au phénéthyl isothiocyanate (PHTC) à 0, 10 et 20 ppm (moyennes de trois répétitions). Dans une colonne, les moyennes suivies par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($P < 0.05$).

Table I : Mortality (%) of adults of *C. maculatus* after 24 and 48 exposure hours to allyl isothiocyanate (AITC), benzyl isothiocyanate (BITC), α naphthylisothiocyanate (α NaITC), phenylisothiocyanate (PITC) and phenethylisothiocyanate (PHTC) at 0, 10 and 20 ppm (means of three repetitions). In a column means following by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$).

	MITC	AITC	BITC	α NaITC	PITC	PHTC
24 h	témoins	0,0 a	0,0 a	0,7 a	0,7 a	0,3 a
	1 ppm	64,2 b	39,3 b	10,0 b	24,0 b	0,3 a
48 h	témoins	0,3 a	0,0 a	0,3 a	0,3 a	0,7 a
	1 ppm	100,0 c	100,0 c	10,7 b	31,3 b	1,0 a
2 ppm	témoins	0,3 a	0,0 a	0,3 a	0,3 a	0,7 a
	1 ppm	100,0 c	32,0 b	11,3 b	32,0 b	13,3 b
2 ppm	témoins	0,3 a	0,0 a	0,3 a	0,3 a	0,7 a
	1 ppm	100,0 c	100,0 c	9,3 b	30,7 b	13,7 b

Table 2 : Activité Glutathion S-transférase (en %) d'extrait brut de *C. maculatus* après 24 et 48 heures d'exposition au méthyl isothiocyanate (MITC), au benzyl isothiocyanate (BITC), à l'allyl isothiocyanate (AITC), à l' α naphthyl isothiocyanate (α NaITC), au phényl isothiocyanate (PITC) et au phénéthyl isothiocyanate (PEITC) à 0, 10 et 20 ppm (moyennes de 3 répétitions).
 Dans une colonne, les moyennes suivies par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0.05).

Table 2 : Activity Glutathione S-transferase (%) in crude extract of *C. maculatus* after 24 and 48 exposure hours to allyl isothiocyanate (AITC), benzyl isothiocyanate (BITC), α naphthyl isothiocyanate (α NaITC), phenyl isothiocyanate (PITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC) at 0, 10 and 20 ppm (means of three repetitions).
 In a column means following by the same letters are not significantly different (P<0.05).

	MITC	AITC	BITC	α NaITC	PITC	PEITC
24 h	témoin	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	1 ppm	288,2 b	101,41 a	77,94 b	79,95 b	178,0 b
	2 ppm	-	-	79,47 b	77,01 b	193,0 b
48 h	témoin	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	1 ppm	-	88,58 a	72,95 b	76,46 b	205,5 b
	2 ppm	-	-	65,20 c	59,35 c	286,9 c

- : pas de résultats