



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة باجي مختار - عنابة



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

Faculté des Sciences

Département de biologie

Laboratoire de Biologie Animale Appliquée

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Troisième Cycle, en
Biologie Animale et Environnementale.
Option: Reproduction et Développement.

Effets sublétaux d'un régulateur de croissance des insectes, le
tébufénozide, sur la communication chimique et la reproduction de
Blattella germanica (Dictyoptera: Blattellidae).

Présentée par : M^{lle} Amina BADI

JURY :

Président: Mr. Nouredine SOLTANI

Directeur de thèse: Mme. Samira KILANI-MORAKCHI

Examineur: Mr. Abdallah KELLOUCHE

Examineur: Mme. Fouzia TINE-DJEBBAR

Examineur: Mme. Dehbia HABES

Professeur, Université d'Annaba

MCA, Université d'Annaba

Professeur, Université de Tizi-Ouzou

MCA, Université de Tébessa

Professeur, Université d'Annaba

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014 / 2015

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Noureddine SOLTANI, directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (Université d'Annaba), pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Un grand, que dis-je, un énorme merci au Docteur Samira KILANI-MORAKCHI (MC.A, Université d'Annaba), pour sa disponibilité, ses précieux conseils, ses discussions scientifiques constructives et pour son aide précieuse en matière de statistiques. Je vous remercie pour votre patience et votre temps. Je suis encore loin de votre niveau, mais j'apprends et je fais des efforts!

Je remercie les membres de mon jury, Professeur Abdallah KELLOUCHE (Université de Tizi-Ouzou), Professeur Dehbia HABES (Université d'Annaba) et Docteur Fouzia TINE-DJEBBAR (MC.A, Université de Tebessa), qui ont accepté de juger ce travail.

J'associe à ces remerciements, le Docteur Jean-Pierre FARINE, Chargé de Recherches au CNRS UMR 6265, INRA UMR 1324, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (Université de Bourgogne Dijon, France), pour sa collaboration, particulièrement pour l'analyse chromatographique.

Je remercie toute l'équipe du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée pour leur soutien moral et leurs encouragements en particulier le Professeur Nadia ARIBI (Université d'Annaba).

A mes Parents pour leur confiance, leur dévouement et leurs encouragements. Je vous dédie ce manuscrit avec toute ma tendresse.

A mon mari Aissa pour ses encouragements au quotidien, son humeur et sa convivialité sincère.

Par crainte d'oublier de nommer certaines personnes, j'adresse mes remerciements à celles et ceux qui m'ont accompagné durant la réalisation de cette thèse. Je n'oublierai pas mon amie Sana et ma tante Akila pour ses encouragements et son aide pour l'élevage des blattes.

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	8
	1. Taxonomie	8
	2. Principales caractéristiques de <i>Blattella germanica</i>	8
	3. Cycle de vie de <i>Blattella germanica</i>	12
	4. Elevage de <i>B. germanica</i>	12
	5. Présentation de l'insecticide.....	14
	6. Traitement des insectes et bioessai.....	14
	7. Morphométrie des ovaires.....	15
	8. Observations comportementales.....	16
	9. Succès reproducteur.....	17
	10. Test d'antenne.....	18
	11. Extraction et dosage des hydrocarbures cuticulaires.....	20
	12. Analyse statistique.....	20

CHAPITRE 1 : TOXICITÉ ET MORPHOMÉTRIE DES OVAIRES

1.	INTRODUCTION.....	22
2.	RÉSULTATS.....	27
2.1.	Toxicité du tébufénozide à l'égard des adultes de <i>Blattella germanica</i>	27
2.2.	Morphométrie de l'ovaire.....	30
2.2.1.	Effets sur le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires.....	30
2.2.2.	Effets sur la longueur de l'ovocyte basal.....	32
3.	DISCUSSION.....	34

CHAPITRE 2: COMMUNICATION CHIMIQUE ET SUCCES REPRODUCTEUR

1. INTRODUCTION.....	39
2. RÉSULTATS.....	45
2.1. Effets sublétaux du tébufénozide sur le comportement sexuel.....	45
2.1.1. Effets sur le temps de latence.....	45
2.1.2. Effets sur le nombre de contacts antennaires.....	47
2.1.3. Effets sur le comportement de parade.....	48
2.1.4. Effets sur le comportement de montée.....	50
2.1.5. Effets sur les tests d'antennes.....	52
2.2. Effets sublétaux du tébufénozide sur le succès reproducteur.....	52
2.2.1. Effets sur le pourcentage d'accouplement.....	52
2.2.2. Effets sur le pourcentage de formation de l'oothèque et la viabilité des larves.....	52
2.3. Effets sublétaux du tébufénozide sur les hydrocarbures cuticulaires	53
3. DISCUSSION.....	56
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	60
RÉSUMÉS	
Français.....	62
Anglais.....	63
Arabe.....	64
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65
ANNEXES (Production Scientifique)	

Liste des tableaux

Tableau 1. Insecticides utilisables dans la lutte contre les blattes (Source: WHO, 2006) IGR : Régulateurs de croissance de l'insecte, II : modérément dangereux, III : plutôt dangereux, U : pas de danger dans les utilisations normales.....	23
Tableau 2. Toxicité du tébufénozide ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) administré par application topique sur les adultes de <i>B. germanica</i> nouvellement exuviés: Mortalité enregistrée (%) au bout de 15 jours de traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n= 3$ répétitions de 20 individus chacune).....	28
Tableau 3. Toxicité du tébufénozide ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) administré par application topique sur les adultes de <i>B. germanica</i> nouvellement exuviés: Analyse de la variance à un critère de classification après transformation angulaire des mortalités enregistrées (%).....	28
Tableau 4. Toxicité du tébufénozide ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), par application topique, sur des adultes nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> âgés de 15 jours: Détermination de la DL_{50} et de la DL_{25} et leurs intervalles de confiance (95% Fiducial limits: FL.....	30
Tableau 5. Nombre d'ovocytes par paires d'ovaires au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de <i>B. germanica</i> témoins ($m \pm \text{SEM}$; $n=15$): Analyse de la variance à un critère de classification.....	31
Tableau 6. Nombre d'ovocytes par paires d'ovaires au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de <i>B. germanica</i> traitées par application topique au tébufénozide (DL_{25}) le jour de l'émergence ($m \pm \text{SEM}$; $n=15$): Analyse de la variance à un critère de classification.....	31
Tableau 7. Effets du tébufénozide (DL_{25}) sur le nombre d'ovocytes par pair d'ovaire, au cours de la vie adultes des femelles de <i>B. germanica</i> , traitées par application le jour de l'émergence ($m \pm \text{SEM}$; $n = 15$).....	32
Tableau 8. Longueur de l'ovocyte basal au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de <i>B. germanica</i> témoins ($m \pm \text{SEM}$; $n=15$): Analyse de la variance à un critère de classification.....	33

<u>Tableau 9.</u> Longueur de l'ovocyte basal au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de <i>B. germanica</i> traitées par application topique au tébufénozide (DL ₂₅) le jour de l'émergence (m ± SEM; n=15): Analyse de la variance à un critère de classification.....	33
<u>Tableau 10.</u> Effets du tébufénozide (DL ₂₅) sur la longueur de l'ovocyte basal, au cours de la vie adultes des femelles de <i>B. germanica</i> , traitées par application le jour de l'émergence (m ± SEM; n = 15).....	34
<u>Tableau 11.</u> Effets du tébufénozide (DL ₂₅), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : temps de latence (s) (m ± SEM; n= 20-30 ; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).....	46
<u>Tableau 12.</u> Effets du tébufénozide (DL ₂₅), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : nombre de contacts antennaires (m ± SEM; n= 20-30 ; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).....	47
<u>Tableau 13.</u> Effets du tébufénozide (DL ₂₅), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : nombre de parades (m ± SEM; n= 20-30 ; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).....	49
<u>Tableau 14.</u> Effets du tébufénozide (DL ₂₅), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : nombre de montées (m ± SEM; n= 20-30 ; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).....	51
<u>Tableau 15.</u> Quantification (µg/insecte) des 15 principaux hydrocarbures cuticulaires testés chez les adultes mâles et femelles, témoins et traités (tebufénozide DL ₂₅) de <i>B. germanica</i> âgés de 15 jours (m ± SEM, n = 6). Les pics sont identifiés selon Rivault <i>et al.</i> , (2002). Pour chaque sexe, les quantités d'HC ont été comparées entre témoins et traités par le test <i>t</i> de Student à p< 0,05. (ddl: degré de liberté).....	55

Liste des figures

- Figure 1.** Classification de l'ordre de Blattaria et position systématique de *Blattella germanica*. D'après McKittrick 1964. Dessin et photo : A. Badi.....9
- Figure 2.** Vue ventrale (A) et vue dorsale (B) de *B. germanica*. Source A: Université de Montpellier: <http://mon.univ-montp2.fr/index.php>. B: Mourier (2014).....10
- Figure 3.** A: Vue ventrale des adultes des deux sexes (Gr: x 2,15), B: vue dorsale des adultes des deux sexes (Gr: x 2,92), C: vue dorsale d'une larve femelle (Gr: x 3,1). Photos: A. Badi (A, C); J.P. Farine (B).....11
- Figure 4.** Cycle biologique de *B. germanica* (L). D'après Cornwell (1968). A- Une femelle portant une oothèque (Gr: x 1,92); B- Oothèque (Gr: x 3,83); C- Ecllosion de l'oothèque (Gr: x 2,23); D- Des larves aptères aux différents stades (Gr: x 0,7); E- Adulte nouvellement exuvié (Gr: x 2,69); F- Parade du mâle et accouplement (Gr: x 1,07). Photos: A. Badi (A, B, & D); J. Castner (E, C); J. P. Farine (F).....13
- Figure 5.** Structure chimique du tébufénozide. (Dadhialla *et al.*, 2005).....14
- Figure 6.** (A): Dissection des ovaires de *B. germanica* sous loupe binoculaire (B) (Gr x: 4,61), Ovaire de *B. germanica* (Gr: x 8,48). (Photos: S. Kilani Morakchi).....16
- Figure 7.** Couple âgé de 15 jours maintenu dans une boîte en plastique (19 cm × 13 cm × 4 cm), pendant 15 minutes sous lampe rouge durant les premières heures de la scotophase. (Gr: x0,61). Photo : A. Badi.....17
- Figure 8.** Test d'antenne: une antenne fraîchement excisé de femelle vierge âgées de 15 jours est fixée à une pipette Pasteur et utilisée immédiatement pour tester le comportement du mâle (A), comportement de parade du mâle (B). Photo: Eliyahu (2007). (Gr: x 3).....19
- Figure 9.** A et B: Système reproducteur interne d'une femelle de *Blattella germanica* (ag: Glande accessoire, od: Oviducte, ov: Ovariole, vg: Vagin) (Fathpour *et al.*, 2007); C: Ovariole de l'ovaire panoïstique de *B. germanica*: germarium (G), vitellarium (V), ovocyte basal (BO), ovocyte sub-basal (SBO), épithélium folliculaire (F), nucleus (N), nucleolus (n) (Irles *et al.*, 2009).....25
- Figure 10.** Modèle schématique de la régulation extrinsèque et intrinsèque de la synthèse de l'HJ chez la femelle de *B. germanica*. JH : Hormone juvénile, CC : corpora

cardiaca; CA: corpora allata ; VNC: chaine nerveuse ventrale (Schal <i>et al.</i> , 1997).....	25
Figure 11. Toxicité du tébufénozide ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) administré par application topique sur les adultes de <i>B. germanica</i> nouvellement exuviés: Mortalité enregistrée (%) au bout de 15 jours de traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n= 3$ répétitions de 20 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.....	29
Figure 12. Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la dose du tébufénozide chez les adultes nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> après 15 jours de traitement. $R^2= 0,98$. $Y=100/1+10^{(\log EC_{50} - X)*\text{Hill Slope}}$	29
Figure 13. Voies métaboliques de la biosynthèse de la 3,11-diméthylnonacosan-2-one et des composés spécifiques de la phéromone sexuelle de contact de <i>Blattella germanica</i> (Howard & Blomquist, 2005).....	41
Figure 14. Comportement sexuel de <i>B. germanica</i> (Nojima <i>et al.</i> , 2005). Photos A: P.G. Koehler (Gr: x 2,3), B, C, D: J.P. Farine (Gr: x 1,07), E: B. Littlehales (Gr: x 1,07).....	43
Figure 15. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : temps de latence (s) ($m \pm \text{SEM}$; $n= 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).....	46
Figure 16. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : nombre de contacts antennaires ($m \pm \text{SEM}$; $n= 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).....	48
Figure 17. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : nombre de parades ($m \pm \text{SEM}$; $n= 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (Kruskal-Wallis: $P < 0,001$).....	50
Figure 18. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de <i>B. germanica</i> : nombre de montées ($m \pm \text{SEM}$; $n= 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). (Kruskal-Wallis: $P= 0,003$).....	51

Figure 19. Profil d'hydrocarbures cuticulaires, chez les adultes mâles et femelles de *B. germanica*, âgés de 15 jours, après analyse en chromatographie en phase gazeuse (1-15 : composés cuticulaires : voir tableau 15).....54

INTRODUCTION GÉNÉRALE



I. INTRODUCTION GENERALE

Les insectes constituent indiscutablement le taxon animal le plus diversifié avec 5 à 10 millions d'espèces estimées, (Odegaard, 2000, Niven et coll., 2008). Bien que 0,4% des insectes soient considérés nuisibles pour les activités anthropiques et représentent de véritables « pest », les ravages causés par ces derniers sont considérables tant pour la production agricole que la santé humaine et animale (Nicholson, 2007).

Le terme anglais pest vient du latin *pestis*, qui signifie « fléau », il est défini selon le concise oxford dictionary comme étant « une source de gêne ou de destruction, qu'il s'agisse d'une personne, d'un animal ou d'une chose ». Dans le même contexte, Dempster (1975) définit le ravageur comme étant « Tout animal causant des dégâts économiques aux cultures et aux animaux domestiques, ou qui est nuisible à la santé humaine ». Les ravageurs sont donc toutes espèces dont l'activité les rend hostiles au bien être de l'homme.

Parmi ces espèces nuisibles, les blattes occupent une place importante. Apparues sur terre il y'a environ 400 millions d'années (Koehler & Patterson, 1987), leur distribution est mondiale, de l'Arctique à l'Antarctique en passant par les Tropiques (Ebling, 1978). Parmi les 4000 espèces de blattes connues, la grande majorité vit dans la nature où elles sont importantes pour l'écosystème, de part leur régime omnivore, en participant au recyclage rapide de la matière organique (Cornwell, 1968). Une vingtaine d'espèces seulement occupent les habitations humaines; elles se sont répandues en suivant les routes commerciales maritime, terrestre et aérienne et constituent un important problème phytosanitaire (Grandcolas, 1998; Blanc, 2000).

Les blattes, inféodées à l'homme et qualifiées d'espèces domiciliaires, principalement *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Supella longipalpa* et *Blattella germanica* (Grandcolas, 1998), sont des espèces qui vivent la nuit et qui s'abritent dans les endroits qui leur fournissent un microclimat convenable et un accès facile à la nourriture (Roth & Willis, 1960). Ces insectes peuvent créer de sérieux dégâts pour les denrées alimentaires et être source de diverses pathologies pour l'homme. En effet des études ont démontré que les blattes pouvaient véhiculer différentes sortes



de bactéries et provoquer des allergies cutanées et respiratoires chez l'homme allant jusqu'au crises d'asthme (Frichman & Alcamo, 1977; Rivault *et al.*, 1993; 1994; Baumholtz *et al.*, 1997; Nejati *et al.*, 2012). La Blatte germanique est l'espèce la plus répandue sur la planète, responsable de 90% des infestations rapportées (Elie, 1998), *Blattella germanica* est devenue la blatte la plus communément associée à l'homme et aux structures publiques et privées qu'il a crée en raison de son potentiel reproducteur élevé (Willis *et al.*, 1985; Ellie, 1998).

Afin de contrôler les insectes nuisibles, différentes méthodes de lutte sont souvent disponibles ou en cours de développement telles que l'utilisation de procédés physiques, la lutte biologique par l'intermédiaire d'insectes auxiliaires, de microorganismes entomophagènes, l'emploi de variétés résistantes ou encore de phéromones. Néanmoins, l'utilisation d'insecticides chimiques présente bien souvent le moyen de lutte principal.

L'usage des insecticides remonte à la haute antiquité; les anciens Perses ayant découvert les propriétés insecticides des fleurs broyées du pyrèthre, une plante de la famille des Astéracées (Ramade, 2011). En Inde, l'usage du soufre et du neem (*Azadirachta indica*) comme insecticide semble remonter à environ 2000 ans avant Jésus Christ (Phylogène *et al.*, 2002). En Chine, l'utilisation des dérivés arsenicaux comme insecticides est connue depuis le XVI^{ème} Siècle. C'est vers la fin de ce siècle et au cours du suivant que sont découvertes les propriétés insecticides du tabac (nicotine), ainsi que celles des racine de plantes de la famille de Papilionacées telles que *Lonchocarpus* ou *Derris* (roténone) (Phylogène *et al.*, 2002).

Cependant les véritables débuts de la lutte chimique contre les insectes nuisibles remonte au milieu du XIX^{ème} siècle avec l'utilisation, en Amérique, des arsenicaux à vaste échelle lors de l'invasion du doryphore de la pomme de terre (Ramade, 2011). C'est au cours de la seconde guerre mondiale que sont apparus les insecticides de synthèses: HCH (hexachlorocyclohexane) dont le principe actif est le lindane découvert en 1939 par Dupire et Raucourt puis les organochlorés, principalement le DDT (dichlorodiphényltrichloroethane) dont les propriétés insecticides furent révélées par les travaux du suisse Müller (prix Nobel de médecine



en 1948 pour cette découverte) et utilisé pour la première fois afin d'enrayer une épidémie de typhus (Ramade, 2011). Cependant, son usage intensif et répété a conduit à l'apparition de nombreux cas de résistance limitant son efficacité (Hemingway *et al.*, 2002). De plus, sa forte capacité de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire, sa rémanence et sa toxicité chez les mammifères ont conduit à son interdiction dans de nombreux pays (Brown, 1978) suite à la publication en 1962 de l'ouvrage de la biologiste Rachel Carson nommé « Le Printemps Silencieux » (Carson, 1962) qui dénonça la toxicité liée aux organochlorés. Toutefois, de nombreux pays émergents en sont toujours de grands utilisateurs, leur interdiction pourrait conduire à des récoltes insuffisantes et des famines.

L'industrie chimique et l'essor de l'agriculture intensive ont permis le développement d'une deuxième génération d'insecticides, représenté par trois grandes familles: organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes de synthèse. Ces insecticides à action neurotoxique agissent tous au niveau du système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates) soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (pyréthriinoïdes) (Haubruge et Amichot, 1998). En dépit de leurs effets secondaires sur la santé publique et l'environnement et la multiplication des espèces résistantes (Yang et Zhang, 2009; Nasirian, 2010; Chain et Lee, 2010; Nauen *et al.*, 2012; Harrop *et al.*, 2014); les organophosphorés et les carbamates représentent à leurs actuel les insecticides les plus vendus ($\approx 40\%$) sur le marché mondiale (Casida et Durkin, 2013).

Bien que l'on recherche activement des méthodes de substitution pour la lutte contre les insectes nuisibles, on imagine mal qu'il soit un jour possible d'éliminer toute utilisation des insecticides. Le DDT en est un parfait exemple, puisque malgré son interdiction dans de nombreux pays, il est encore préconisé aujourd'hui par l'organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans la lutte anti-vectorielle, en particulier contre le paludisme (OMS, 2011).

Cependant, et depuis la mise en évidence des dysfonctionnements liés à l'emploi des insecticides, l'ensemble des acteurs impliqués dans l'utilisation des pesticides travaille pour réduire les risques environnementaux. La lutte chimique a



donc évoluée vers une lutte raisonnée par la réduction des concentrations des matières actives et la diversité des insecticides utilisés avec un temps de rémanence dans le milieu de plus en plus court; désormais, l'accent est mis sur la compréhension des modes d'action et la recherche de cibles nouvelles.

Dans ce sens, des méthodes alternatives de lutte telles que l'utilisation des pesticides naturels retrouvent un regain d'intérêt (Tine *et al.*, 2011; Tomè *et al.*, 2013) en plus du développement par l'industrie phytosanitaire de molécules à mode d'action nouveaux ciblant les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (neonicotinoides) (Tomozawa et Casida, 2003), les récepteurs GABAergiques (Phénylpyrazoles) (Nauen *et al.*, 2012), les canaux sodium (oxadiazines) (Wing *et al.*, 2000; Maiza *et al.*, 2013), ou en interférant avec des processus physiologiques et biochimiques spécifiques aux organismes visés tels que les régulateurs de croissance des insectes ou IGRs (Dhadialla *et al.*, 1998, 2010).

Les régulateurs de croissance des insectes (Insect growth regulators: IGRs), rebaptisés IGDs (Insect growth disruptors) pour perturbateurs de croissance des insectes (Pener et Dhadialla, 2012) appartiennent aux insecticides de troisième génération et peuvent être regroupés en fonction de leurs mode d'action, comme suit: les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, composant majeur de la cuticule, et les substances interférant avec l'action des hormones des insectes (Hormone juvénile (HJ), ecdystéroïdes) (Tunaz et Uygum, 2004). Les IGDs représentent une méthode alternative de lutte plus sélective, notamment vis-à-vis des auxiliaires et des organismes non visés (Dhadialla *et al.*, 2005, 2010; Pener et Dhadialla, 2012).

La première prise de conscience de l'usage potentiel d'IGDs dans le contrôle des insectes était en 1956, lorsque l'hormone juvénile (HJ) a été isolée de l'extrait brute abdominal des mâles des papillons de nuit, *Hyalophora cecropia* (L.) (Tunaz et Uygum, 2004). L'application topique de l'hormone a empêché la métamorphose et la multiplication subséquente de l'insecte (Tunaz et Uygum, 2004). Les IGDs regroupant les agonistes et antagonistes de l'hormone juvénile (HJ), les inhibiteurs de la synthèse de la chitine (CSIs) et les agonistes et antagonistes des ecdystéroïdes.



Comme leur nom l'indique, les inhibiteurs de la synthèse de la chitine qui sont des dérivés de la benzoylphenylurée (BPU) essentiellement représentés par le diflubenzuron (DFB) inhibent la synthèse de la chitine (Ishaaya, 1990; Soltani *et al.*, 1993; 1996), perturbant ainsi le dépôt de la nouvelle cuticule et, conduisant à la mise en place d'une cuticule anormale et à la mort pendant ou après la prochaine mue de l'insecte (Pener et Dhadialla, 2012). Ils agissent sur la sécrétion cuticulaire en réduisant l'épaisseur de la cuticule et en perturbant la synthèse de la chitine (Ishaaya, 1990; Soltani *et al.*, 1993; 1996) mais aussi, la reproduction (Soltani *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2012). Les analogues du diflubenzuron comme, le chlorfluazuron, le flucycloxuron (FCX) et l'héxaflumuron (Sheets *et al.*, 2000) ou encore le lufenuron, le teflubenzuron et le triflumuron (TFM) (Sheets *et al.*, 2000; Tomlin, 2000; Karr *et al.*, 2004) sont très efficaces à l'égard des différents insectes nuisibles mais avec une activité plus importante contre les Lépidoptères (Tomlin, 2000; Ishaaya, 2001). Le novaluron, un autre inhibiteur de la synthèse de la chitine, affecte la mue par le dépôt d'une endocuticule anormale; il inhibe l'émergence adulte, affecte le contenu en chitine et la durée du développement larvaire (Faranesi *et al.*, 2012).

Les antagonistes de l'HJ (précocène I et II) exercent une action cytotoxique sur les corps allates (glandes endocrine sécrétant l'hormone juvénile) (Brook et Mcaffery, 1990), entraînant des métamorphoses prématurées (Masner *et al.*, 1979; Darvas *et al.*, 1990; Aribi *et al.*, 1999) mais aussi la stérilisation des adultes de plusieurs ordres d'insectes (Delbecque *et al.*, 1986). Quant aux analogues de l'hormone juvénile (ex. méthoprène, fénoxycarbe, pyriproxifène et diofénonan), ils ont pour principaux effets de produire, chez les individus traités, un stade surnuméraire, des larves permanentes ou des intermédiaires larve-pupe (Gadenne *et al.*, 1990; Muyle et Gordon, 1989; Mauchamp *et al.*, 1989). Ces composés agissent sur le développement (Gorman *et al.*, 2002; Aribi *et al.*, 2006) et la sécrétion cuticulaire (Gadenne *et al.*, 1990; Quennedy *et al.*, 1995; Elbert et Nauem, 2000).



Pour les produits simulant l'ecdysone (ex. RH-5849, halofénozide, tébufénozide et méthoxyfénozide), leur principale activité réside dans leur capacité à induire une mue prématurée (Wing *et al.*, 1988). De ce fait, ils sont considérés comme des accélérateurs de mue ou MACs (Molting Accelerating Compounds) qui se fixent aux récepteurs (EcR) spécifiques des ecdystéroïdes (Dhadialla *et al.*, 1998; 2005). Les agonistes des ecdystéroïdes perturbent également la reproduction et les taux d'ecdystéroïdes chez différentes espèces (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012; Daas-Maamcha *et al.*, 2013). Les antagonistes, le KK-22 et le KK-42 sont des dérivés de l'imidazole (Kadano-Okuda *et al.*, 1987), qui inhibent le processus de biosynthèse des ecdystéroïdes au niveau des glandes prothoraciques et des sites alternatifs (Lorenz *et al.*, 1995). Ces composés inhibent aussi la synthèse de l'HJ et sont considérés comme des anti-HJs (Tunaz et Uygun, 2004). De plus, il a été suggéré que le KK-42 peut affecter le développement des ovaires en agissant au niveau de l'épithélium folliculaire, site de synthèse d'ADN et source d'ecdystéroïdes ovariens (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001).

Récemment, dans un souci de protection de l'environnement et des règles du développement durable, les IGDs sont utilisés dans le contrôle de divers insectes nuisibles (Saltzmann *et al.*, 2006; Fathpour *et al.*, 2007; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012; Farnesi *et al.*, 2012 ; Amira *et al.*, 2013). Différentes études ont été consacrées à l'évaluation des effets de ces IGDs sur les blattes notamment sur *B. germanica* en utilisant principalement les inhibiteurs de la synthèse de la chitine et les agonistes de l'hormone juvénile (Tsuji et Taneike 1988; King & Bennett 1988; Ross et Cochran, 1990; Schenker et Moyses ; 1994 ; Aquilera *et al.*, 2001 ; Fathpour *et al.* 2007). L'usage des agonistes des ecdystéroïdes étant principalement réservé au contrôle des lépidoptères (Dhadialla *et al.*, 2010). A ce jour, et hormis les travaux préliminaires de notre équipe (Maiza *et al.*, 2004 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a , 2009b ; Morakchi *et al.*, 2010), aucune étude n'a été réalisée sur l'utilisation potentielle des agonistes des ecdystéroïdes dans la lutte contre les Blattes.

Aussi, et afin d'approfondir les résultats préliminaires obtenus par notre équipe, les travaux de recherches présentés dans ce mémoire sont axés sur une



meilleure compréhension de l'action d'un agoniste des ecdystéroïdes, le tébufénozide, sur la blatte la plus « célèbre » *B. germanica*, espèce dont la biologie et la physiologie sont les plus étudiées et les mieux connues.

Ce manuscrit est divisé en deux grandes parties :

- La première partie traite de l'évaluation de la toxicité du tébufénozide chez les adultes de *B. germanica* avec détermination des doses létales. Une dose sublétales est ensuite testée sur différents deux paramètres morphométriques de l'ovaire (nombre d'ovocytes par paire d'ovaires, longueur de l'ovocyte basal).
- La seconde partie traite des effets sublétales du tébufénozide sur la communication chimique (comportement sexuel, hydrocarbures cuticulaires) et le succès reproducteur de l'insecte (pourcentage d'accouplement, pourcentage de production de l'oothèque, nombre de larves viables).

MATÉRIEL ET MÉTHODES



II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Taxonomie:

Les Blattes sont des Insectes Ptérygotes, appartenant à l'infra-classe des Néoptères. Ils appartiennent au super-ordre des Dictyoptères composé de l'ordre des Mantodea (mantes), des Isoptera (termites) et des Blattaria (blattes). Certains auteurs regroupent les Blattaria et les Isoptera dans un même groupe (Bell *et al.*, 2007). La classification de McKittrick (1964) subdivise les Blattes en deux grandes super familles: les Blaberoidea et les Blattoidae qui sont respectivement réparties en 3 familles (Blaberoidea, Blattellidae et Polyphagidae) pour les premiers et en deux familles (Blattidae et Cryptocercidae) pour les seconds (Fig. 1). Roth (2003) décompose l'ordre des Blattaria en 6 familles différentes: Polyphagidae, Cryptocercidae, Nocticolidae, Blattidae, Blattellidae et Blaberidae, la majorité des espèces appartenant aux trois dernières familles (Bell *et al.*, 2007). L'ordre des Blattaria continue encore à être discuté (Djernaes *et al.*, 2011). *Blattella germanica* est une espèce grégaire et cosmopolite appartenant à la famille des Blattellidae (Fig. 1). Nommée *Blatta germanica* par Linné (1767), cette blatte a connu sept appellations différentes entre 1767 et 1903 et c'est finalement Caudell (1903) qui la décrit sous le nom de *Blattella germanica*.

II.2. Principales caractéristiques de *Blattella germanica*:

Comme la plupart des Blattes, *B. germanica* est aplatie dorso-ventralement ; elle présente un corps mou avec une tête, un thorax et un abdomen bien visible et des antennes longues et multiarticulées. Les pattes sont longues et épineuses et munies de coxae larges et aplaties (Bell *et al.*, 2007). Sa couleur va du bronze au brun clair avec deux bandes longitudinales noires sur le pronotum. L'insecte possède deux cerques caractéristiques à l'extrémité de l'abdomen à fonction sensoriel. Bien qu'elle ait des ailes (ailes antérieures sclérifiées recouvrant des ailes postérieures membraneuses), elle est incapable de voler (Fig. 2) (Bell *et al.*, 2007). Les adultes mesurent 10 à 15 mm de long, *B. germanica* présente un dimorphisme sexuel bien marqué (Fig. 3 A, B), le



mâle possédant un corps fin avec des ailes qui ne recouvrent pas entièrement l'abdomen et des cerques formés de onze articles; le dernier segment (segment génital) porte également une paire d'accessoires copulatoires, les styles. La femelle est plus robuste avec un abdomen entièrement recouvert par les ailes et des cerques de douze articles (Bell *et al.*, 2007). Les larves ressemblent aux adultes à l'exception des ailes qui sont absentes (Fig. 3C).

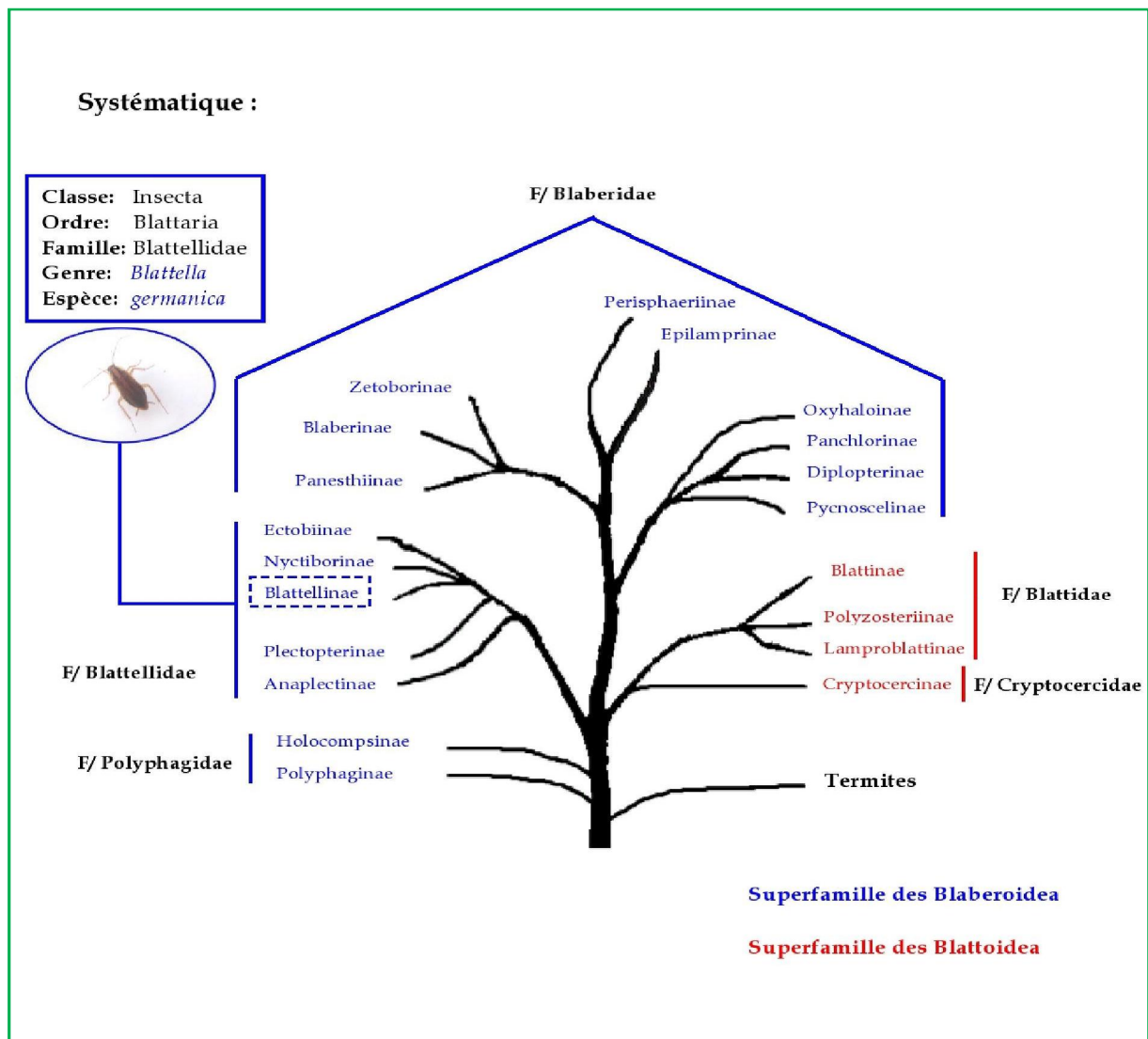
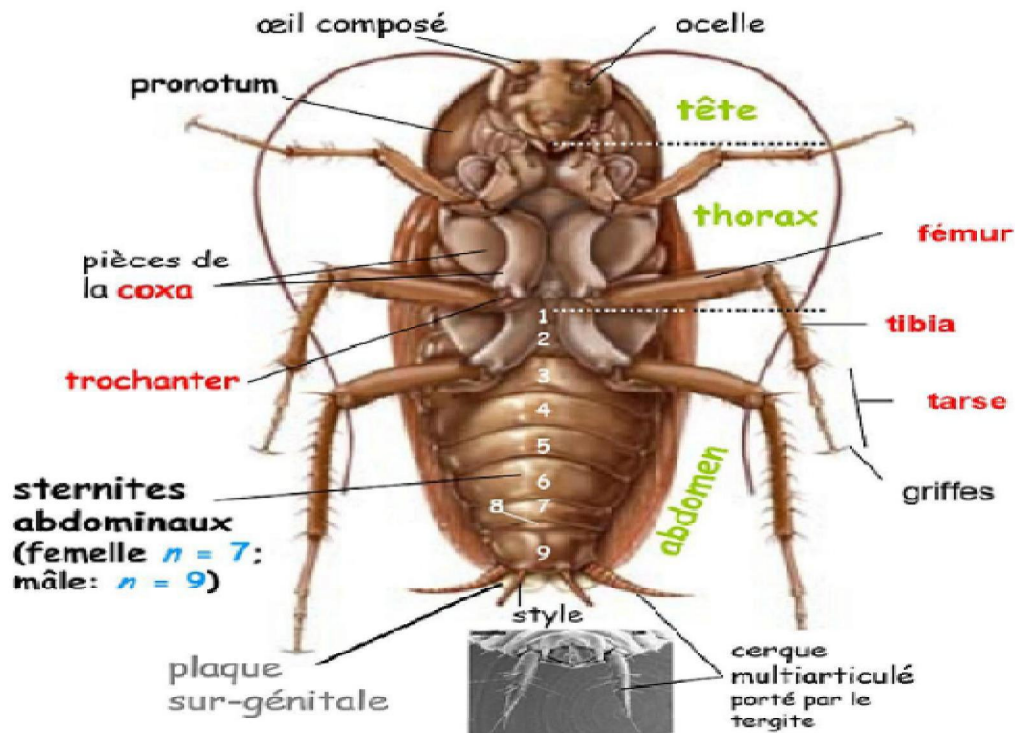


Figure1. Classification de l'ordre des Blattaria et position systématique de *Blattella germanica*. D'après McKittrick 1964. Dessin et photo : A. Badi.



A



B

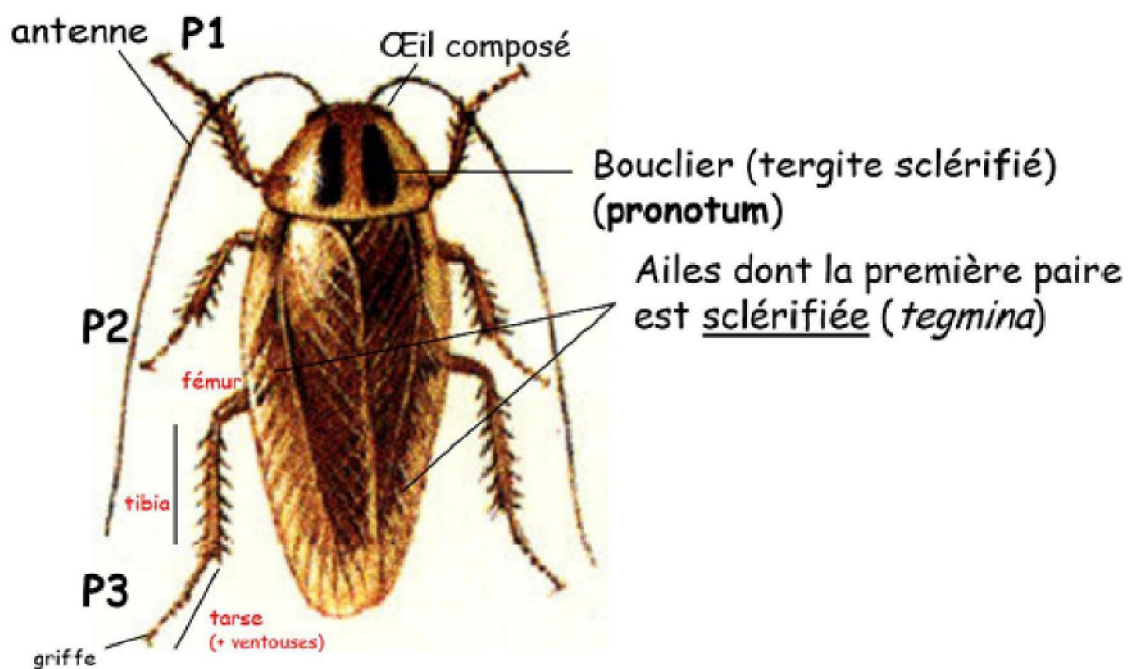


Figure 2: Vue ventrale (A) et vue dorsale (B) de *B. germanica*. Source A: Université de Montpellier : <http://mon.univ-montp2.fr/index.php>. B: Mourier (2014).

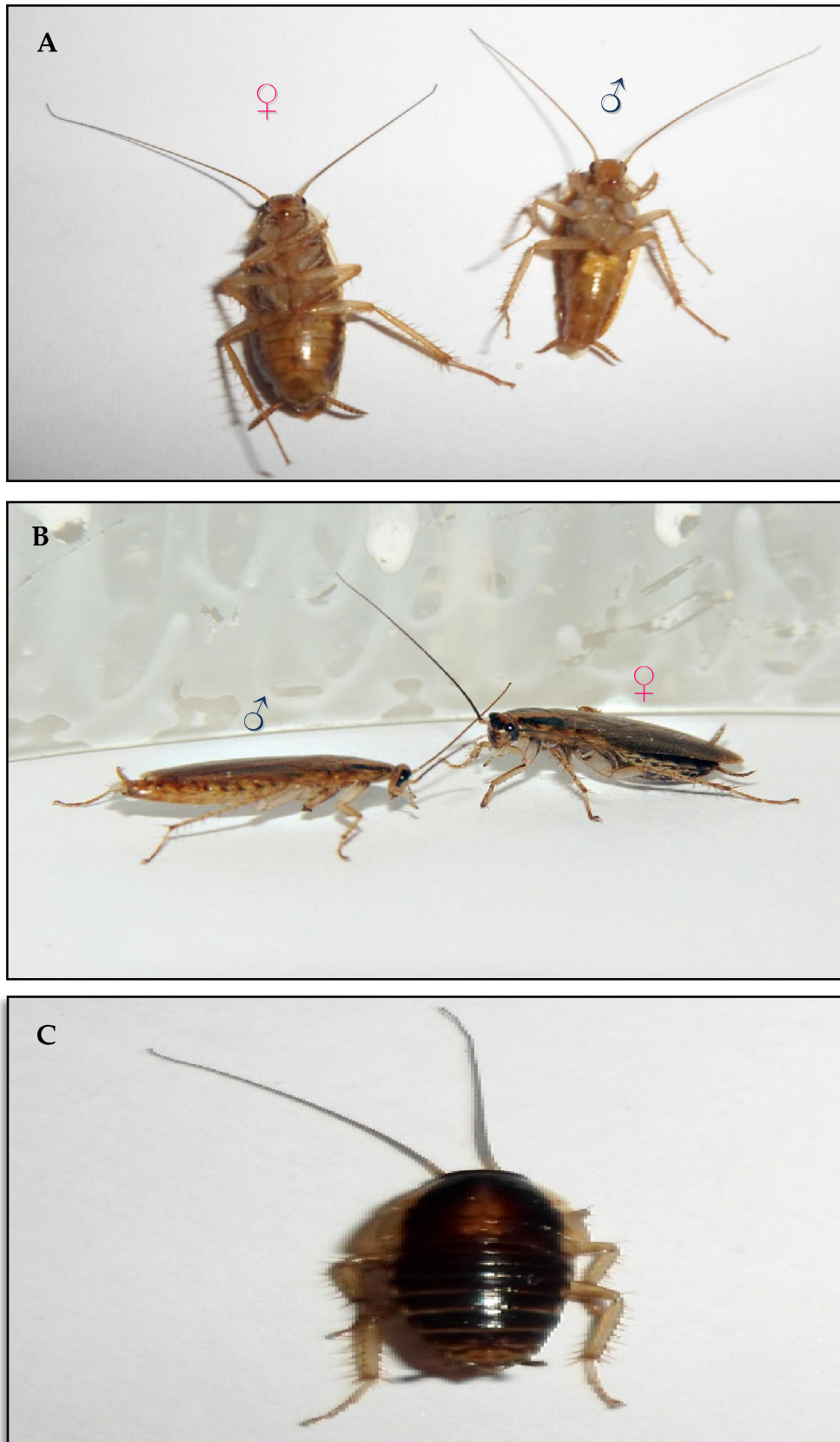


Figure 3. A: Vue ventrale des adultes des deux sexes (Gr: x 2,15), B: vue dorsale des adultes des deux sexes (Gr: x 2,92), C: vue dorsale d'une larve femelle (Gr: x 3,1). Photos : A. Badi (A, C); J.P. Farine (B).



II.3. Cycle de vie de *B. germanica*:

B. germanica est un insecte à développement hétérométabole caractérisé par deux phénotypes post-embryonnaires : les larves et les adultes. Après l'accouplement, Les femelles sécrètent une oothèque renfermant environ 37 œufs dont 28 seulement arrivent à éclosion donnant naissance à des larves aptères (Swandner, 1995). Les mâles passent par 5 stades larvaires tandis que les femelles par 7 stades larvaires à 25°C. Les larves du dernier stade subissent la mue imaginale pour donner naissance à des adultes ailés (Fig. 4). La longévité de l'adulte est de 128 jours pour le mâle et de 153 jours pour la femelle (Cornwell, 1968). Selon Woodruff (1938) un seul accouplement pourrait suffire à fertiliser tous les œufs produits durant la vie adulte. Les femelles non accouplés peuvent produire des oothèques stériles 17-18 jours après la mue imaginale (Roth, 1970).

II.4. Elevage de *B. germanica*:

Les insectes sont élevés au laboratoire dans des boîtes en plastiques aérées contenant des emballages d'œufs en guise d'abris. Les Blattes sont nourris de biscuits (Bimo : farine de blé, sucre, graisses végétales, extrait de malt) et abreuvés grâce à du coton humidifié. L'élevage est maintenu à une température de 26 ± 2 °C, une humidité relative de 70% et une photopériode de 12 heures de lumière.

Périodiquement, les larves les plus âgées sont prélevées de l'élevage de masse et regroupées entre elles, ce qui nous permet de récupérer les adultes dès la mue imaginale. Ces adultes vierges sont alors regroupés selon leur sexe. Les insectes sont élevés dans les mêmes conditions décrites précédemment.

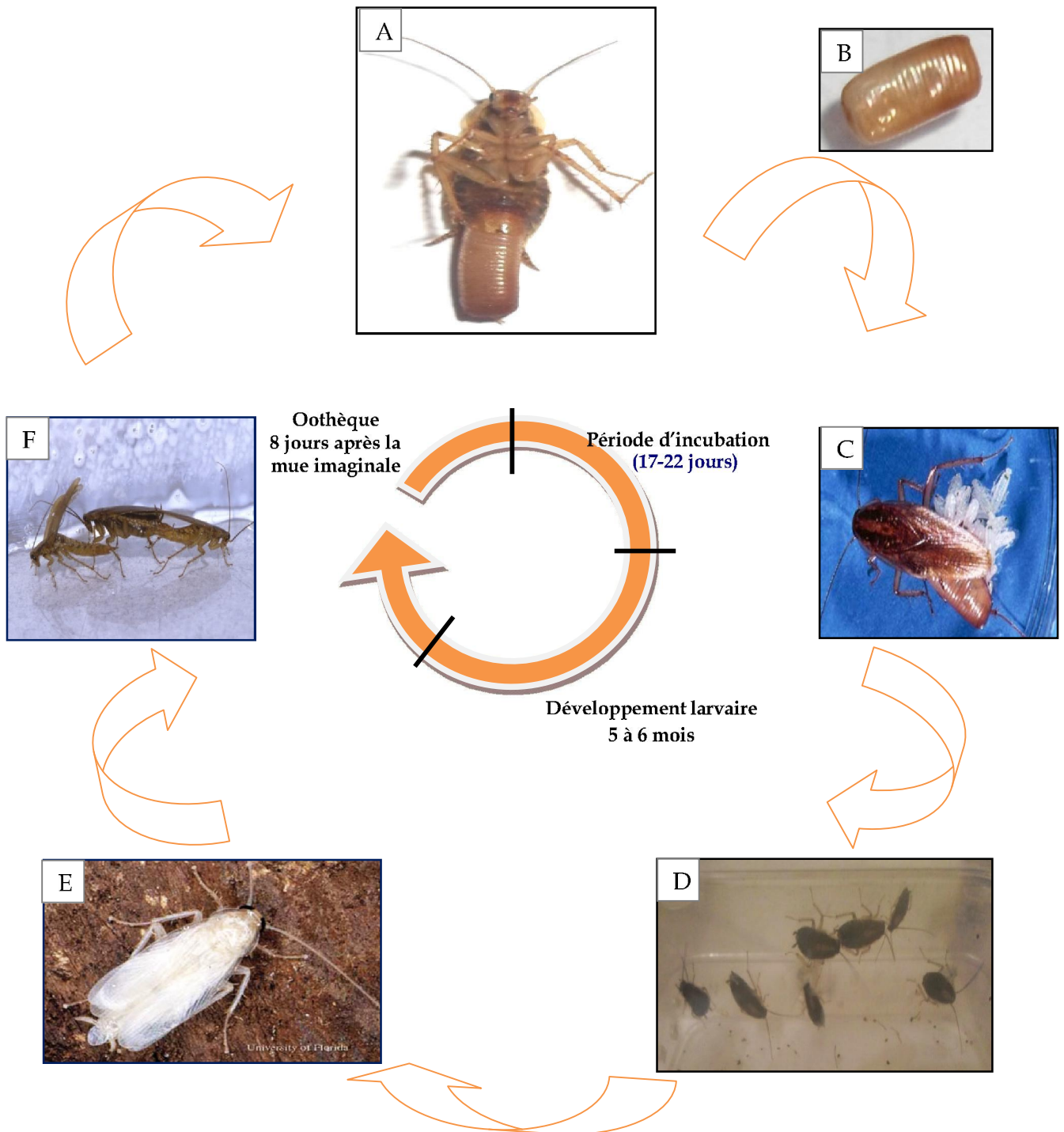


Figure 4. Cycle biologique de *B. germanica* (L.). D'après Cornwell (1968).

- A- Une femelle portant une oothèque (Gr: x 1,92).
- B- Oothèque (Gr: x 3,83).
- C- Ecllosion de l'oothèque (Gr: x 2,23).
- D- Des larves aptères aux différents stades (Gr: x 0,7).
- E- Adulte nouvellement exuvié (Gr: x 2,69).
- F- Parade du mâle et accouplement (Gr: x 1,07).

Photos: A. Badi (A, B, & D); J. Castner (E, C); J. P. Farine (F)



II.5. Présentation de l'insecticide

Le tébufénozide (> 95% de pureté, Rohm & Haas Co., Spring House, PA, USA), un agoniste des ecdystéroïdes, a été gracieusement fournie par le Pr G. Smagghe (Laboratory of Agrozoology, Département of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent, Belgium). Le tébufénozide est le nom commun du N-tert-butyl-N'(4-éthylbenzoyl)-3,5-diméthylbenzohydrazide, sa formule empirique est le $C_{22}H_{28}N_2O_2$ et son poids moléculaire est de 352,48g. Sa structure chimique est représentée sur la figure 5.

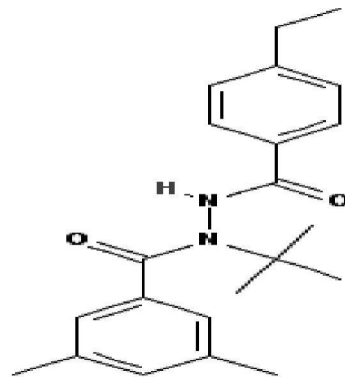


Figure 5. Structure chimique du tébufénozide (Dadhialla *et al.* 2005).

II.6. Traitement des insectes et bioessai:

L'insecticide a été dissous dans l'acétone et administré aux adultes nouvellement exuviés de *B. germanica* par application topique (3 μ l/insecte) au niveau des sternites abdominaux (Kawada *et al.*, 1992) et ce à l'aide d'une microseringue (Hamilton). Les témoins reçoivent 3 μ l de solvant. Les boîtes contenant les insectes des expérimentations sont maintenues dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Après un screening préalable, le tébufénozide a été testé à différentes doses (1, 10, 20, 50 et 75 μ g/insecte) sur les adultes mâles et femelles de *B. germanica* nouvellement exuviés. Trois répétitions de dix individus ont été réalisées pour chaque dose et chaque sexe. Une série témoin est conduite en parallèle et les



individus reçoivent 3 μ l de solvant (acétone). La mortalité des insectes a été enregistrée quotidiennement pendant une durée de 15 jours. En ce basant sur les intervalles de confiance (95%) et en absence de différences entre la mortalité des mâles et des femelles les résultats ont été regroupés. Dans le cas de l'existence d'une mortalité naturelle (< 20%) la mortalité observée et corrigée selon la formule d'Abbott (1925). Les DL₅₀ et DL₂₅ (doses causant respectivement la mortalité de 50% et 25% des insectes traités) ont été déterminées ainsi que leurs intervalles de confiance (95% IC) et le Hill slope. La DL₂₅ sera utilisé pour la suite des expérimentations.

II.7. Morphométrie des ovaires

Les adultes femelles nouvellement exuviées de *B. germanica* témoins et traitées au tébufenozide (DL₂₅: 10,96 μ g) sont isolées des mâles (Pascual *et al.*, 1992) dans des boîtes en plastique (9,5 cm x 6,5 cm x 2 cm) contenant de la nourriture et de l'eau. Les femelles des séries témoins et traitées sont échantillonnées à différents âges au cours de la vie adulte (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16), anesthésiées au froids, et leurs ovaires sont disséqués sous loupe binoculaire (Fig. 6). Deux paramètres biométriques sont considérés, à savoir, le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et la longueur de l'ovocyte basal. 15 répétitions sont effectuées pour chaque série.

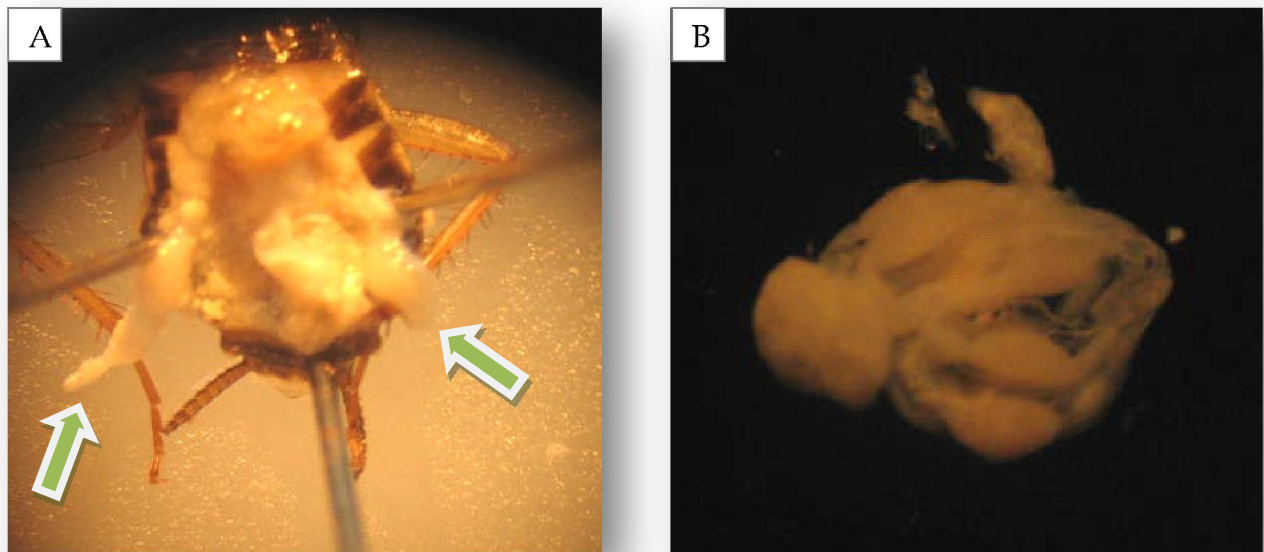


Figure 6. (A): Dissection des ovaires de *B. germanica* sous loupe binoculaire (B) (Gr x: 4,61), Ovaire de *B. germanica* (Gr: x 8,48). (Photos: S. Kilani-Morakchi).

II.8. Observations comportementales:

Les observations ont été réalisées en enceinte close (19 cm x 13 cm x 4 cm), sous lumière rouge de faible intensité (Fig. 7), dont les longueurs d'ondes émises sont imperceptibles par les blattes (Bell & Sams, 1937). Toutes les études comportementales ont été effectuées dans les mêmes conditions de température et d'hygrométrie que celles de la salle d'élevage et ont eu lieu pendant les premières heures de la scotophase correspondant à la période maximal d'activité sexuelle chez *B. germanica* (Liang & Schal, 1993). Les expériences sont menées en conditionnant de non choix (un seul partenaire sexuel pour chaque blatte) sur des adultes vierges n'ayant jamais été en contact avec leurs partenaires. Dans le but d'évaluer le comportement sexuel des insectes, des mâles et femelles âgés de 15 jours (Habbachi *et al.*, 2009) des séries témoins et traités ($DL_{25}=10,96 \mu\text{g}$) sont utilisés pour constituer



quatre dyades: mâle témoin *vs* femelle traitée, mâle traité *vs* femelle témoin, mâle traité *vs* femelle traitée et mâle témoin *vs* femelle témoin. Les observations sont réalisées durant une période de 15 min et quatre étapes clés de la séquence comportementale sont notées : a) le temps de latence, correspondant au temps écoulé entre le début de l'expérience et le premier contact entre les deux partenaires, b) nombre de contact antennaire des mâles avec la cuticule de la femelle permettant le déclenchement du comportement de parade des mâles, c) nombre de parade des mâles traduisant l'état "d'excitation" des mâles et d) nombre de montée de la femelle sur le dos du mâles en vue d'un éventuel accouplement (indicateur de la réceptivité des femelles). 20 à 30 répétitions sont réalisées pour chaque dyade.

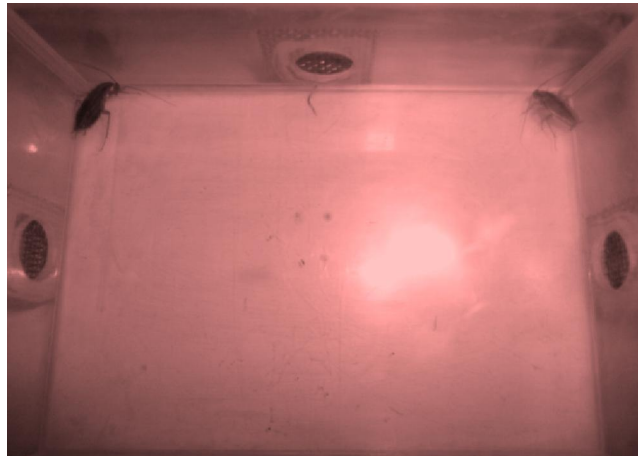


Figure 7. Couple âgé de 15 jours maintenu dans une boîte en plastique (19 cm x 13 cm x 4 cm), pendant 15 minutes sous lampe rouge durant les premières heures de la scotophase (Gr: x0,61). *Photo : A. Badi.*

II.9. Succès reproducteur:

Le pourcentage d'accouplement est estimé à partir des quatre différentes dyades testées par observations directe à intervalle de 30 min jour et nuit, pendant 24 heures et ce jusqu'au succès de l'accouplement. Le choix de cet intervalle est basé sur le fait que l'accouplement chez cette espèce dure plus de 45 min (Schal & Chiang, 1995). Le pourcentage de formation de l'oothèque ainsi que le nombre de larve viable



sont calculés. 20 à 30 répétitions sont réalisées pour chaque

Procédure:

D'abord, d'éliminé toutes interactions physiologiques, la réponse des mâles est testée en utilisant une variante du test d'antenne & Willis (1952). Selon Bell *et al.*, (1978), l'utilisation d'une femelle excisée de femelle vierge âgées de 15 jours (témoin ou traitée à la DL₂₅) est utilisée pour l'étude du comportement sexuel des mâles et traduit leurs réponses à un phéromone de contact femelle. Lors de cette expérimentation, une pipette Pasteur est excisée de femelle vierge âgées de 15 jours (témoin ou traitée à la DL₂₅) et utilisée immédiatement pour tester le comportement sexuel des mâles (témoin et traité à la DL₂₅ et âgé de 15 jours) par contact des antennes du mâle (Fig. 8). Une réponse positive est enregistrée à la fois si le mâle adopte le comportement de parade (relèvement des ailes à 90°) et une réponse caractéristique intervenant

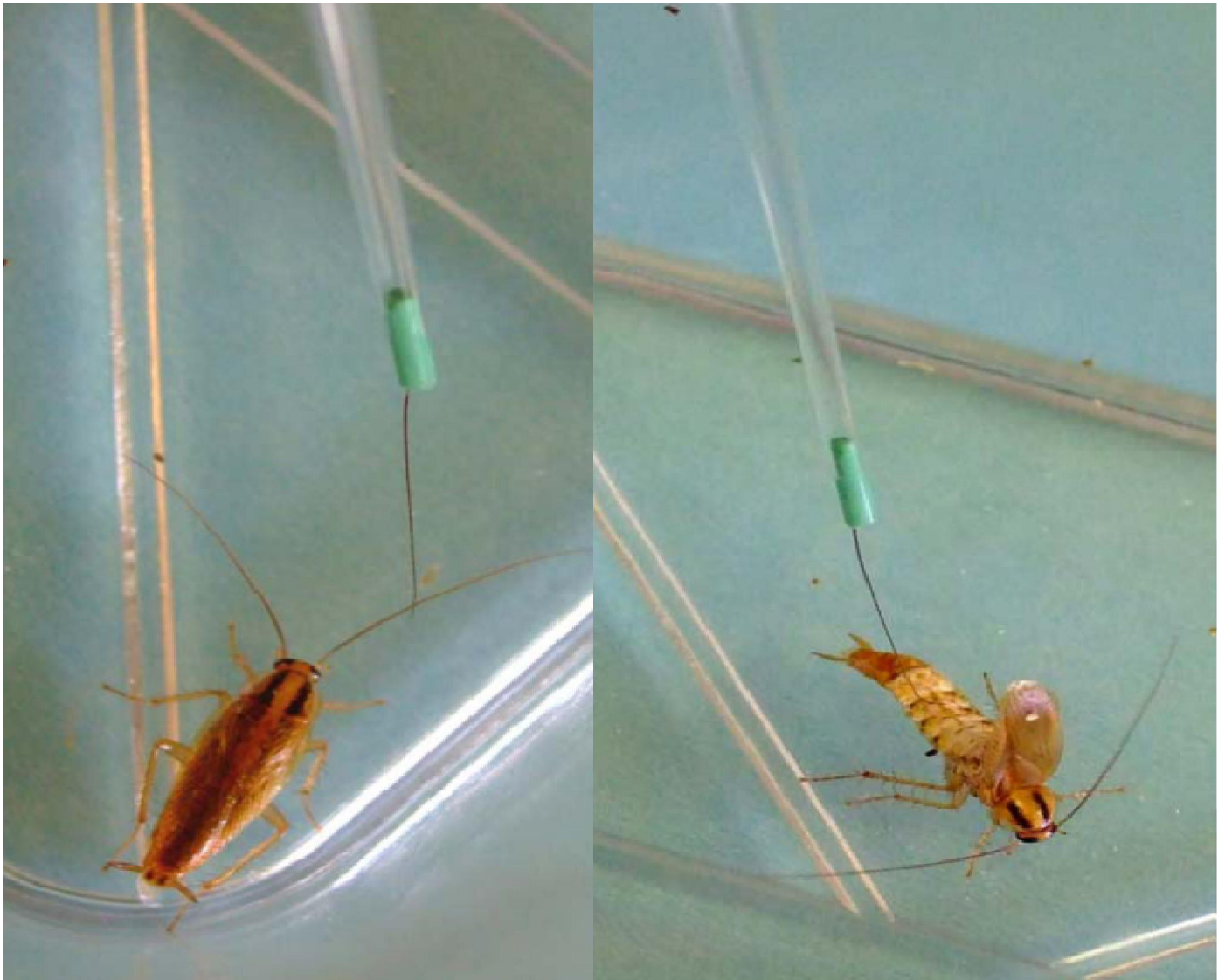


Figure 8. Test d'antenne: une antenne fraîchement excisé de femelle vierge âgées de 15 jours est fixée à une pipette Pasteur et utilisée immédiatement pour tester le comportement du mâle (A), comportement de parade du mâle (B) Photo: *Eliyahu (2007)*. (Gr: x 3).



des logarithmes des doses a permis d'estimer les DL_{50} et DL_{25} (Sadeghi *et al.*, 2009). Le test « *t* » de Student est utilisé pour traiter les résultats concernant les quantités en hydrocarbures cuticulaires, les paramètres ovariens et la fécondité. Les données concernant les observations comportementales sont analysées grâce au test de Kruskal-Wallis combiné avec le test de Dunn's. Le test binomial est utilisé pour comparer les différents pourcentages (parades des mâles, montée des femelles, réponses aux tests d'antenne, accouplement et production de l'oothèque). Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.1 pour Windows (GraphPad software, La Jolla California, USA, www.Graphpad.com).

CHAPITRE 1

TOXICITÉ ET MORPHOMÉTRIE DES OVAIRES



1. INTRODUCTION

La Blatte Germanique, vecteur de nombreux agents pathogènes, pullule en milieu urbain du fait de son potentiel reproducteur élevé (Mpuchane *et al.*, 2006; Nejati *et al.*, 2012). L'utilisation des insecticides conventionnels, à action neurotoxique, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes (Reierson *et al.*, 1983; Appel, 1990; Garfield, 1990; Reid *et al.*, 1990; Appel & Benson, 1995) représente l'une des solutions majeure dans la lutte contre les blattes. Toutefois, de multiples résistances ont été enregistrées (Lee *et al.*, 1996; Limoe *et al.*, 2007; Nasirian *et al.*, 2010; Chain & Lee, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

Différentes molécules ont également prouvé leurs efficacité contre *B. germanica* telles que l'acide borique, un insecticide inorganique (Habes *et al.*, 2001; Apple *et al.*, 2004; Habes *et al.*, 2006; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009c; Habes *et al.*, 2013). Ce dernier n'est cependant plus autorisé, dans l'union Européenne, comme produit phytosanitaire (INRS, 2011) en raison de sa reprotoxicité et sa toxicité systémique après passage transcutané (ANSM, 2013). Les néonicotinoïdes comme l'acétamipride (Morakchi 2005 *et al.*, Morakchi *et al.*, 2010) et les phenylpyrazoles comme le fipronil (Kaakeh *et al.*, 1997; Nasirian *et al.*, 2010) sont également utilisés mais des phénomènes de résistance ont été signalés (Wenn & Scott, 1997; Holbrook *et al.*, 2003).

Parmi les régulateurs de croissance des insectes, seuls les analogues de l'HJ et les inhibiteurs de la synthèse de la chitine (Tsuji & Taneike 1988; King & Bennett 1988; Ross & Cochran, 1990; Kawada *et al.*, 1992; Schenker & Moyses, 1994; Mosson *et al.*, 1995; Aguilera *et al.*, 2001; Fathpour *et al.* 2007) ont été utilisés dans le contrôle des blattes. La liste des insecticides utilisés dans la lutte contre les blattes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est fournie dans le tableau 1.



Tableau 1. Insecticides utilisables dans la lutte contre les blattes (Source: WHO, 2006)
 IGR : Régulateurs de croissance de l'insecte, II : modérément dangereux, III : plutôt dangereux, U : pas de danger dans les utilisations normales.

Insecticide	Classe chimique	Formulation	Concentration (g/l ou g/kg)	Risque chimique
Bendiocarbe	Carbamate	Spray, Poudre	2.4-4.8	II
Flufénoxurone	IGR	Spray	0.3	U
Méthoprène	IGR	Spray, Aérosol	0.9	U
Chlorpyrifos	Organophosphate	Spray, Aérosol, Poudre	2-5	II
Malathion	Organophosphate	Spray, Poudre	20	III
Pirimiphos-methyl	Organophosphate	Spray, Poudre	10	III
α -Cyperméthrine	Pyréthriinoïde	Spray	0.3-0.6	II
β -Cyfluthrine	Pyréthriinoïde	Spray	0.25-0.5	II
Bifenthrine	Pyréthriinoïde	Spray	0.48-0.96	II
Cyfluthrine	Pyréthriinoïde	Spray, Poudre, Aérosol	4	II
Cyperméthrine	Pyréthriinoïde	Spray, Poudre, Aérosol	0.5-2	II
Cyphénothrine	Pyréthriinoïde	Poudre, Spray, Aérosol	0.5-1	II
Deltaméthrine	Pyréthriinoïde	Poudre, Spray, Aérosol	0.3 (0.5b)	II
Λ -cyhalothrine	Pyréthriinoïde	Spray	0.03	II
Perméthrine	Pyréthriinoïde	Poudre, Spray, Aérosol	1.25	II
D-Phénothrine	Pyréthriinoïde	Poudre, Spray, Aérosol	1.0-2.0	U
Resméthrine	Pyréthriinoïde	Poudre	3	III
Tétraméthrine	Pyréthriinoïde	Poudre, Spray, Aérosol	1-2	U

Des recherches récentes sur l'utilisation de molécules alternatives dans la lutte contre les blattes ont permis de mettre en évidence l'efficacité de certains biopesticides tels que l'azadirachtine (Shaffek *et al.*, 2004; Tine *et al.*, 2011) et le spinosad (Shneider *et al.*, 2004; Maïza *et al.*, 2013) ou encore des oxadiazines comme l'indoxacarb (Maïza *et al.*, 2013). De plus, les travaux préliminaires de notre équipe (Maïza *et al.*, 2004; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a,b) ont démontré l'impact négatif des agonistes des ecdystéroïdes sur certains paramètres de la reproduction de la blatte germanique.

B. germanica est une blatte ovipare (Roth, 1970) dont l'ovaire est de type panoïstique et où toutes les cellules germinales issues des mitoses goniales peuvent évoluer en ovules. Les ovarioles sont caractérisés par l'existence de deux zones fonctionnelles, le germarium apical et le vitellarium (Cassier *et al.*, 1997) (Fig. 9). Le germarium est le siège de la multiplication des ovogonies qui donneront les ovocytes



sans aucune formation de cellules nourricières. Le vitellarium permet aux ovocytes, entourés par une assise de cellules folliculaires, d'accumuler des réserves (vitellus) et d'acquérir des enveloppes protectrices, sécrétées par le follicule, appelées enveloppe vitelline et chorion (Raikhel & Dhadialla, 1992).

Chez les insectes, l'hormone juvénile (HJ) et la 20-hydroxyecdysone (20E) jouent un rôle crucial dans la régulation de la croissance, le développement et la reproduction des insectes (Cassier *et al.*, 1997). L'HJ sécrétée par les corps allates, fut reconnue très tôt comme étant impliquée dans la reproduction des insectes (Wigglesworth, 1936). Or ce n'est que 40 ans plus tard que l'ecdysone fut identifiée dans les ovaires des femelles du moustique *Aedes aegypti* (Hagedorn *et al.*, 1975) et ainsi suspectée de jouer un rôle dans la reproduction des insectes. En effet, puisque les glandes prothoraciques sécrétant l'ecdysone dégénèrent rapidement chez les adultes de nombreux insectes, il a été longtemps spéculé que cette hormone n'avait aucune fonction reproductive. Si les rôles de l'ecdysone dans la régulation des activités reproductives sont de mieux en mieux connus chez les différentes espèces d'insectes (Hoffman *et al.*, 1980; Rubenstein *et al.*, 1982; Parlak *et al.*, 1992; Pascual *et al.*, 1992; Kozlova & Thummel, 2000), la fonction et l'importance de l'ecdysone dans la reproduction des insectes varient grandement d'une espèce à l'autre.

Chez *B. germanica*, la reproduction est contrôlée principalement par l'HJ (Schal *et al.*, 1997); l'activité ovarienne étant régulée par des facteurs intrinsèques (ex: neurohormones et hormones) et extrinsèques (ex: stimuli environnementaux, interactions sociales) (Fig. 10). La synthèse de l'HJ par les corps allates est sous la dépendance de deux neurohormones sécrétées par le cerveau, les allatotropines qui stimulent sa sécrétion et les allatostatines qui l'inhibent (Tobe *et al.*, 1985; Miyamoto *et al.*, 1993; Hoffmann *et al.*, 1999; Stay, 2000; Gäde, 2002) (Fig. 10). La production de l'HJ augmente avec la croissance de l'ovocyte après la mue imaginale, pour stimuler la vitellogénèse et l'absorption des vitellogénines par les ovocytes. Les taux d'HJ diminuent ensuite juste avant l'ovulation et restent faibles pendant la gestation (Bellés *et al.*, 1987). L'HJ stimule également la production et la libération des



phéromones sexuelles et contrôle l'acquisition de la réceptivité sexuelle chez la femelle (Schal & Ching, 1995).

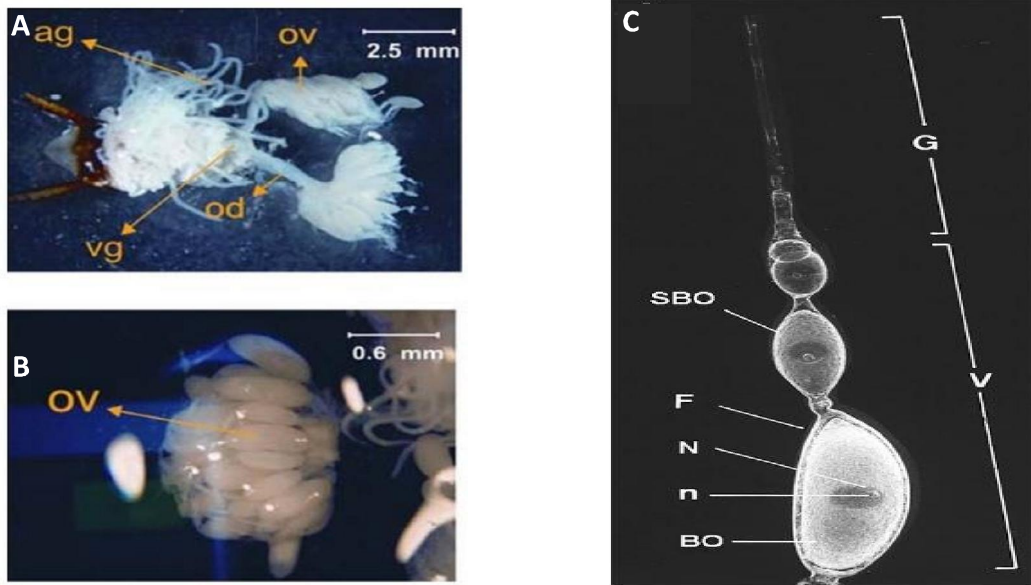


Figure 9. A et B: Système reproducteur interne d'une femelle de *Blattella germanica* (ag: Glande accessoire, od: Oviducte, ov: Ovariolo, vg: Vagin) (Fathpour *et al.*, 2007); C: Ovariolo de l'ovaire panoïstique de *B. germanica*: germarium (G), vitellarium (V), ovocyte basal (BO), ovocyte sub-basal (SBO), épithélium folliculaire (F), nucleus (N), nucleolus (n) (Irlles *et al.*, 2009)

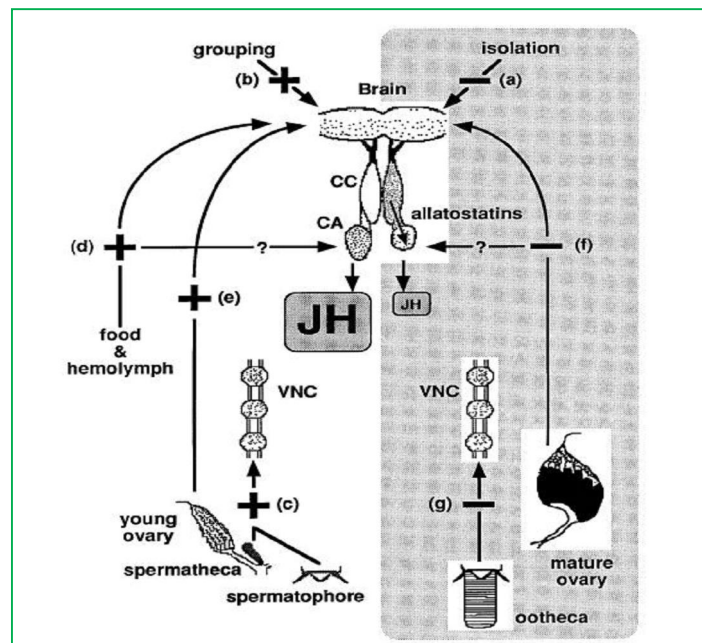


Figure 10. Modèle schématique de la régulation extrinsèque et intrinsèque de la synthèse de l'HJ chez la femelle de *B. germanica*. JH : Hormone juvénile, CC : corpora cardiaca; CA: corpora allata ; VNC: chaîne nerveuse ventrale (Schal *et al.*, 1997).



Chez la blatte germanique, les écdystéroïdes ovariens interviennent dans la réinitiation méiotique, fournissent une source d'ecdystéroïdes à l'embryon et inhibent la production de l'hormone juvénile (Lafont *et al.*, 2005). Chez cette espèce, les taux d'ecdystéroïdes ovariens et hémolymphatiques sont faibles chez les femelles nouvellement exuviées, augmentent au cours de la vitéllogénèse jusqu'à atteindre un pic durant la choriogénèse, et diminuent après la ponte suggérant l'implication des écdystéroïdes dans le contrôle de la choriogénèse (Pascual *et al.*, 1992).

Certaines études ont démontré que la présence artificielle de l'ecdysone inhibait l'action gonadotrope de l'hormone juvénile (Satyanarayana *et al.*, 1992, 1994). Toutefois, bien que les rôles de l'ecdysone et de l'HJ aient été élucidés dans certaines étapes du développement des oocytes chez les insectes, la maturation ovarienne dans son ensemble demeure très complexe puisque de nombreuses interactions synergiques et inhibitrices existent entre ces deux hormones et d'autres neurohormones (Bellés, 1995). Aussi et à fin de mieux comprendre ces interactions et d'approfondir les résultats préliminaires obtenus sur l'impact des agonistes des écdystéroïdes chez *B. germanica* (Maïza *et al.*, 2004 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a, b), nous examinons dans ce chapitre les effets d'un agoniste des écdystéroïdes, le tébufénozide, sur une espèce à reproduction HJ-dépendente, *B. germanica*.

Après détermination de la toxicité du tébufénozide, ces effets sont évalués sur la reproduction de l'insecte en examinant deux paramètres clés, le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires considéré comme indicateur de la capacité reproductrice (Maïza *et al.*, 2013), et la longueur de l'ovocyte basal, moyen d'estimation indirect du taux de biosynthèse de l'HJ chez cet insecte (Gadot *et al.*, 1989; Sevala *et al.*, 1999; Treiblmayr *et al.*, 2006).



2. RÉSULTATS

2.1. Toxicité du tébufénozide à l'égard des adultes de *B. germanica*:

Le tébufénozide a été testé par application topique sur les adultes nouvellement exuviés de *B. germanica* à des doses variant de 1 à 75 µg/insecte. D'une façon générale, les insectes traités ont présenté des symptômes d'intoxication via l'inhibition de l'activité locomotrice suivie par la paralysie et la mort.

Les mortalités enregistrées au cours des tests de toxicité varient de $6,66 \pm 0,96$ % à la dose de 1 µg/insecte à $77,6 \pm 1,47$ % à la dose de 75 µg/insecte (Tableau 2). Aucune mortalité n'a été enregistrée chez les séries témoins. L'analyse de la variance à un critère de classification (Tableau 3) effectuée après transformation angulaire des pourcentages de mortalité révèle une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre les doses utilisées. Le classement des doses par le test HSD de Tukey révèle l'existence de 4 groupes (Fig. 11): le premier groupe renferme les doses de 1 et 10 µg, le second groupe les doses de 10 et 20 µg, le troisième groupe est constitué des doses de 20 et 50 µg et enfin le dernier groupe englobe les doses de 50 et 75 µg.

La courbe dose-réponse exprimant les pourcentages de mortalité en fonction du logarithme de la dose appliquée (Fig. 12) a permis l'estimation des valeurs de la DL_{50} et de la DL_{25} ainsi que leurs intervalles de confiance et le Hill Slope (Tableau 4)



Tableau 2. Toxicité du tébufénozide ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) administré par application topique sur les adultes de *B. germanica* nouvellement exuviés: Mortalité enregistrée (%) au bout de 15 jours de traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n= 3$ répétitions de 20 individus chacune).

Dose ($\mu\text{g}/\text{insecte}$)	1	10	20	50	75
R1	8,33	12,5	40	40	80,2
R2	6,66	25	45,4	66,66	75,1
R3	5	30,76	33,33	69,2	77,5
m \pm SEM	6,66 \pm 0,96	22,75 \pm 5,38	39,57 \pm 3,49	58,62 \pm 9,33	77,6 \pm 1,47

Tableau 3. Toxicité du tébufénozide ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) administré par application topique sur les adultes de *B. germanica* nouvellement exuviés: Analyse de la variance à un critère de classification après transformation angulaire des mortalités enregistrées (%).

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Âges (jours)	4546	4	1137	31,33	0,000***
Erreur résiduelle	362,8	10	36,28	-	-
Total	4909	14			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

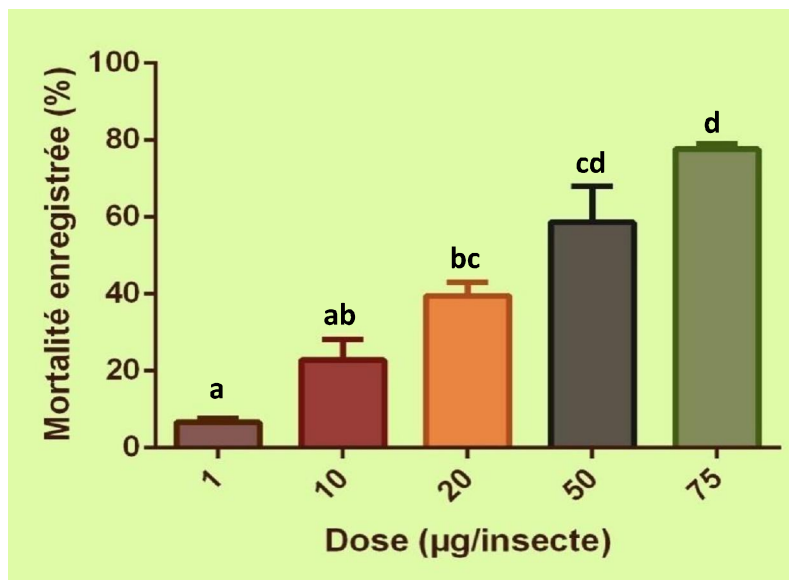


Figure 11. Toxicité du tébufénozide (µg/insecte) administré par application topique sur les adultes de *B. germanica* nouvellement exuviés: Mortalité enregistrée (%) au bout de 15 jours de traitement ($m \pm SEM$, $n=3$ répétitions de 20 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.

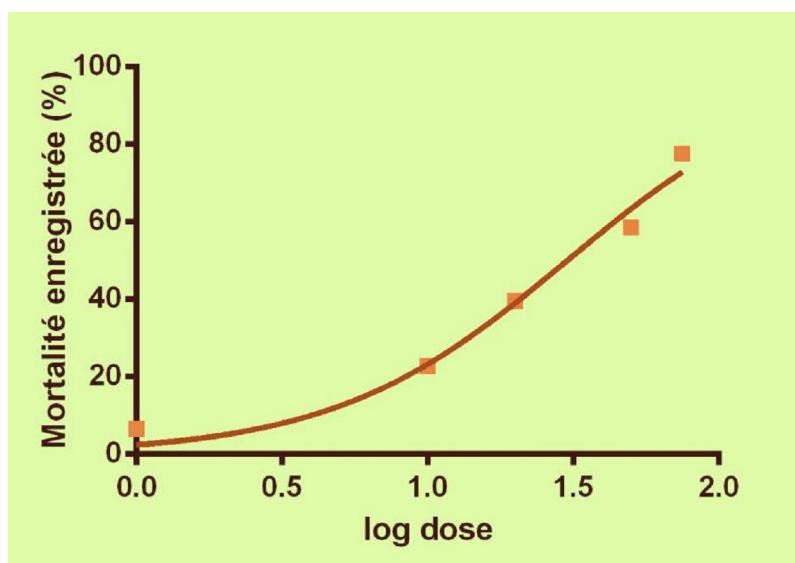


Figure 12. Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la dose du tébufénozide chez les adultes nouvellement exuviés de *B. germanica* après 15 jours de traitement. $R^2= 0,98$. $Y=100/1+10^{(\log EC50 - X)*Hill Slope}$



Tableau 4. Toxicité du tébufénozide ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), par application topique, sur des adultes nouvellement exuviés de *B. germanica* âgés de 15 jours: Détermination de la DL_{50} et de la DL_{25} et leurs intervalles de confiance (95% Fiducial limits: FL).

Temps (jours)	DL_{50} (95% FL) ($\mu\text{g}/\text{insecte}$)	DL_{25} (95% FL) ($\mu\text{g}/\text{insecte}$)	Hill Slope (95% FL)
15	30,20 (22,01-41,43)	10,96 (6,38-18,79)	1,08 (0,62-1,54)

2.2. Morphométrie de l'ovaire:

Le tébufénozide a été testé à une dose sub létale ($LD_{25} = 10,96 \mu\text{g}/\text{insecte}$) par application topique sur des adultes femelles vierges nouvellement exuviées (0 jour) de *B. germanica*. Les effets de cet agoniste des ecdystéroïde ont été évalués sur deux paramètres morphométriques de l'ovaire: le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et la longueur de l'ovocyte basal au cours de la vie adulte (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 jours).

2.2.1. Effets sur le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires:

Le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires chez les adultes femelles vierges de *B. germanica* fluctue au cours de la vie adulte. L'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA) révèlent des différences hautement significatives ($p < 0,001$) du nombre d'ovocytes par paire d'ovaires en fonction de l'âge et ce aussi bien chez les séries témoins que traitées (Tableaux 5 et 6).

Chez les femelles témoins, le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires augmente à 2 jours ($p < 0,001$) puis diminue ($p < 0,001$) entre 4 et 8 jours (Tableau 7). Cette diminution correspond à la période de ponte. Après le 8^{ème} jour, au cours de la période de post-oviposition, le nombre d'ovocytes par paire d'ovaire reste stable ($p > 0,05$). Chez les femelles traitées, le nombre d'ovocytes par paire



d'ovaires augmente à 4 jours ($p < 0,05$) et reste stable jusqu'à 16 jours ($p > 0,05$). La comparaison entre séries témoins et traitées montre que le tébufénozide réduit de manière significative le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires à 2 jours ($p < 0,001$), 4 jours ($p < 0,001$) et 6 jours ($p = 0,019$). Une augmentation ($p < 0,05$) de ce paramètre est enregistrée entre 8 et 16 jours et ce toujours comparativement aux témoins.

Tableau 5. Nombre d'ovocytes par paires d'ovaires au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de *B. germanica* témoins ($m \pm SEM$; $n=15$): Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Agés (jours)	21126	8	2641	76,13	0,000***
Erreur résiduelle	4371	126	34,69	-	-
Total	25496	134			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

Tableau 6. Nombre d'ovocytes par paires d'ovaires au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de *B. germanica* traitées par application topique au tébufénozide (DL_{25}) le jour de l'émergence ($m \pm SEM$; $n=15$): Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Agés (jours)	3032	8	379,1	12,21	0,000***
Erreur résiduelle	3912	126	31,04	-	-
Total	6944	134			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 7. Effets du tébufénozide (DL₂₅) sur le nombre d'ovocytes par pair d'ovaire, au cours de la vie adultes des femelles de *B. germanica*, traitées par application le jour de l'émergence (m ± SEM; n = 15).

Ages (jours après l'émergence)	Témoins	Tébufénozide (DL ₂₅)
0	54,06 ± 1,35 a	—
2	74,06 ± 0,90 Ab	35,06 ± 1,33 Ba
4	51,06 ± 0,81 Ac	39,13 ± 1,22 Bb
6	49,33 ± 1,04 Ac	43,60 ± 2,07 Bb
8	35,93 ± 2,53 Ad	43,66 ± 1,01 Bb
10	35,86 ± 2,24 Ad	43,00 ± 2,15 Bb
12	36,33 ± 1,56 Ad	43,53 ± 1,14 Bb
14	35,26 ± 0,77 Ad	42,20 ± 0,85 Bb
16	35,46 ± 1,36 Ad	42,73 ± 1,23 Bb

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges; les lettres en majuscules comparent les moyennes d'un même âge entre les différentes séries. (comparaison : test t de Student, $p < 5\%$).

2.2.2. Effets sur la longueur de l'ovocyte basal :

Chez les femelles vierges de *B. germanica* la longueur de l'ovocyte basal varie au cours de l'âge adulte. L'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA) révèle un effet âge hautement significative ($p < 0,001$) sur la longueur de l'ovocyte basal chez les séries témoins mais aussi chez les séries traitées (Tableaux 8 et 9).

La longueur de l'ovocyte basal, chez les femelles de *B. germanica* des séries témoins, augmente ($p < 0,001$) au cours de la maturité sexuelle; elle passe de $0,71 \pm 0,02$ mm à 0 jour à $2,70 \pm 0,08$ mm à 10 jours pour décroître ($p < 0,001$) par la suite (Tableau 10). Chez les séries traitées au tébufénozide (DL₂₅), la longueur de l'ovocyte



basal augmente avec l'âge pour atteindre $1,32 \pm 0,05$ mm à 6 jours, les valeurs enregistrent une diminution significative à partir de 8 jours ($p < 0,001$).

La comparaison entre série témoins et traitées montrent que l'application topique du tébufénozide (DL_{25}) chez les femelles nouvellement exuviées de *B. germanica*, réduit de manière significative ($p < 0,001$) la longueur de l'ovocyte basal et ce pour tout les âges testés (Tableau 10).

Tableau 8. Longueur de l'ovocyte basal au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de *B. germanica* témoins ($m \pm SEM$; $n=15$): Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Ages (jours)	48,50	8	6,063	171,2	0,000***
Erreur résiduelle	4,392	124	0,035	-	-
Total	52,89	132			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification

Tableau 9. Longueur de l'ovocyte basal au cours de la vie adultes (0-16 jours) des femelles de *B. germanica* traitées par application topique au tébufénozide (DL_{25}) le jour de l'émergence ($m \pm SEM$; $n=15$): Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Ages (jours)	5,424	8	0,67	18,08	0,000***
Erreur résiduelle	4,650	124	0,03	-	-
Total	10,07	132			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 10. Effets du tébufénozide (DL₂₅) sur la longueur de l'ovocyte basal, au cours de la vie adultes des femelles de *B. germanica*, traitées par application le jour de l'émergence (m ± SEM; n = 15).

Ages (jours après l'émergence)	Témoins	Tébufénozide (DL ₂₅)
0	0,71 ± 0,02 a	—
2	0,84 ± 0,02 Ab	0,72 ± 0,01 Ba
4	1,23 ± 0,06 Ac	0,90 ± 0,03 Bb
6	1,56 ± 0,04 Ad	1,32 ± 0,05 Bc
8	1,99 ± 0,07 Ae	1,11 ± 0,09 Bd
10	2,70 ± 0,07 Af	1,20 ± 0,08 Be
12	2,33 ± 0,04 Ag	1,05 ± 0,04 Be
14	1,91 ± 0,04 Ah	1,14 ± 0,05 Be
16	1,62 ± 0,02 Ai	1,16 ± 0,03 Be

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges; les lettres en majuscules comparent les moyennes d'un même âge entre les différentes séries. (comparaison : test t de Student, $p < 5\%$).

3. Discussion

Le tébufénozide administré par application topique aux adultes mâles et femelles nouvellement exuviés de *B. germanica*, entraîne une hyperactivité, un manque de coordination et une inhibition de l'activité locomotrice suivie par la paralysie et la mort de l'insecte. Ces observations sont en accord avec différents travaux antérieurs, en effet, il a été rapporté que le tébufénozide et le RH- 5849 (1 - tert-butyl -1 ,2 -dibenzoyl hydrazine, le prototype des agonistes des ecdystéroïdes), en plus de leurs effets hormonomimétiques, pouvaient entraîner des symptômes neurotoxiques excitateurs au niveau du système nerveux central chez différentes espèces d'insectes (Darvas *et al.*, 1992; Smagghe & Degheele, 1994). Chez les blattes, Smagghe *et al.*, (1996) ont rapporté que les nymphes de *Blattella orientalis* ont présenté



des effets neurotoxiques rapides se traduisant par une hyperactivité et des troubles de l'activité locomotrice suite à un traitement par injection de tébufénozide. Ces symptômes d'intoxication peuvent être expliqués par l'activité neurotoxique du tébufénozide *via* le blocage des canaux neuronaux potassium voltage-dépendant au niveau des muscles et des nerfs (Salgado, 1998).

Nos résultats révèlent une faible activité insecticide du tébufénozide à l'égard de *B. germanica* avec une DL_{50} de 30,20 $\mu\text{g}/\text{insecte}$. Le tébufénozide est moins toxique en comparaison à d'autres molécules utilisées dans les programmes de lutte intégrée (IPM) et de gestion de la résistance telles que le spinosad et l'indoxacarbe qui présentent, par application topique, chez les adultes de *B. germanica* une DL_{50} respective de 0,42 $\mu\text{g}/\text{insecte}$ et 0,05 $\mu\text{g}/\text{insecte}$ (Maiza *et al.*, 2013). Le fipronil présente également par application topique une toxicité plus importante que celle du tébufénozide à l'égard des adultes de *B. germanica*, avec une DL_{50} de 0,0022 $\mu\text{g}/\text{insecte}$ (Kaakeh *et al.*, 1997). Toutefois une résistance aux fipronil a été rapportée chez la blatte germanique (Holbrook *et al.*, 2003; Gondhalekar & Scharf, 2012).

Chez les insectes, le développement embryonnaire et post-embryonnaire, l'homéostasie, ainsi que la reproduction sont basés sur une coordination précise de l'activité endocrine. Chez *B. germanica*, comme chez toutes les espèces de blattes, la vitellogenèse ainsi que la maturation cyclique des ovocytes dépendent de la synthèse de l'HJ par les corps allates (Feyereisen, 1985; Scharrer, 1987).

En plus de contrôler la maturation gonadique chez les femelles, l'HJ intervient dans la régulation de la production des phéromones sexuelles, leurs libération ainsi que sur l'acquisition de la réceptivité sexuelle (Liang & Schal 1993; Schal *et al.*, 1997). En effet, le cerveau intègre une multitude de stimuli extrinsèques et intrinsèques et rythme l'activité des corps allates (CA) en dictant les taux et l'amplitude de tous les événements HJ-dépendant (Liang & Shal, 1993). De plus, il a été clairement établi que la longueur de l'ovocyte basal représente un excellent moyen indirect dans



l'estimation des taux de biosynthèse de l'HJ chez les femelles de *B. germanica* (Uzsák & Schal., 2012).

En ce qui concerne le rôle des ecdystéroïdes dans la reproduction de *B. germanica*, La fonction majeure des pics d'ecdystéroïdes ovarien, chez cette espèce, est représentée par l'initiation de la choriogenèse dans les cellules folliculaires à la fin du cycle de maturation (Pascual *et al.*, 1992).

Les résultats obtenus au cours de nos expérimentations, montrent que chez *B. germanica*, le nombre d'ovocytes par paires d'ovaires, augmente à 2 jours puis diminue entre 4 et 8 jours chez les séries témoins; cette diminution du nombre d'ovocytes à 4 jours s'explique par le début de la ponte (Schal *et al.*, 1997 ; Maiza *et al.*, 2013).

Le traitement par application topique des femelles vierges de *B. germanica*, le jour de l'émergence adulte, avec une dose sub létale de tébufénozide (DL₂₅) perturbe l'ovogénèse en provoquant une réduction du nombre d'ovocytes par paire d'ovaires au cours de la maturité sexuelle ainsi qu'une réduction de la longueur de l'ovocyte basal. De plus, le tébufénozide perturbe également l'oviposition tels qu'il est indiqué par les valeurs stables du nombre d'ovocytes par paire d'ovaires enregistrées chez les séries traitées durant la maturation sexuelle et ce en comparaison aux séries témoins.

Nos résultats sont en accord avec différents travaux sur les agonistes des ecdystéroïdes qui ont démontré que ces molécules affectaient de manière négative les événements de la reproduction tels que la croissance ovarienne, la vitellogénèse et l'oviposition chez différents ordre d'insectes (Taibi *et al.*, 2003; Maiza *et al.*, 2004; Smagghe *et al.*, 2004; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

En effet, l'halofénozide réduit de manière significative le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires, le volume de l'ovocyte basal, les taux d'ecdystéroïdes ovariens ainsi que le contenu en protéines ovarienne (Maiza *et al.*, 2004; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a) chez *B. germanica*. L'halofénozide, le tébufénozide et le RH-5849 réduisent également la taille et le volume de l'ovocyte basal ainsi que le poids des ovaires chez *Ephestia kuehniella* (Hami *et al.*, 2004).



Luna *et al.* (2011) ont démontré que le méthoxyfénozide réduisait de manière significative la fécondité et la vitellogénèse chez *Spodoptera exigua*. Le méthoxyfénozide affecte également l'oviposition, la croissance ovarienne, la viabilité des œufs, le contenu en ecdystéroïdes ovarien ainsi que les métabolites ovariens chez *Ephestia Kuehniella* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

Le tébufénozide, l'halofénozide et le méthoxyfénozide affectent la fécondité et la fertilité de différentes espèces de Lépidoptères et de Coléoptères telles que *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Sun *et al.*, 2000), *Spodoptera exigua* et *spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Pineda *et al.*, 2009; Rodri'guez Enrí'quez *et al.*, 2010), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Farino's *et al.*, 1999) et *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Taïbi *et al.*, 2003).

Bien que les effets des agonistes des ecdystéroïdes sur les différents paramètres de la reproduction des insectes soient bien documentés, les mécanismes par lesquels ces effets sont exercés restent peu connus. Toutefois, il est bien établie que les ovaires sont un site de synthèse d'ecdystéroïdes chez les insectes adultes, ce qui en fait une cible potentielle des agonistes des ecdystéroïdes. Ces molécules interfèrent avec différents processus associés à la reproduction, tels que la vitellogénèse et l'ovogénèse et peuvent ainsi conduire à une altération de la croissance ovocytaire et de la formation des œufs. Ces effets pourraient donc contribuer à la réduction de la densité des populations en réduisant la progéniture des adultes traités par ces composés (Sun *et al.*, 2000).

Chez *B. germanica*, les taux d'ecdystéroïdes ovariens sont faibles au début du cycle ovarien et augmentent pour atteindre un pic à la fin du cycle de maturation en déclenchant la choriogénèse dans les cellules folliculaires (Pascual *et al.*, 1992). L'application du tébufénozide aux femelles nouvellement exuviées de *B. germanica*, à un moment où les taux d'ecdystéroïdes sont relativement faibles, pourrait interférer avec la maturation des ovocytes par une interaction possible avec le niveau d'HJ. Cette hypothèse est soutenue par la réduction de la longueur de l'ovocyte (critère de mesure indirect des taux d'HJ) enregistrée au cours de notre étude après traitement



au tébufénozide. Cette interaction possible entre 20E et JH pourrait expliquer les effets dépressifs du tébufénozide sur la morphométrie de l'ovaire.

CHAPITRE 2

COMMUNICATION CHIMIQUE ET SUCCES REPRODUCTEUR



1. INTRODUCTION

La communication chez l'homme fait appel à un ensemble de signaux auditifs (sons, langages, intonation) et physiques (mimiques, gestuels, posture du corps), ainsi qu'à d'autres moyens culturels et technologiques. L'homme semble également utiliser les odeurs corporelles pour communiquer (Wyatt, 2003). Dans les règnes animal et végétal, le mode de communication universel, passe par l'utilisation de molécules chimiques; on parle alors de communication chimique (Bradbury & Vehrencamp, 1998; Wyatt, 2003). Les insectes dépendent très fortement des signaux chimiques par rapport aux autres formes de communication. Basés sur l'origine de l'émission et sur le receveur, ces signaux chimiques peuvent être divisés en deux grands groupes :

- Les allélochimiques: signaux qui sont émis d'un animal d'une espèce vers un membre d'une espèce différente (Whittaker & Feeny, 1970).
- Les phéromones: signaux chimiques qui transportent l'information d'un individu à un autre membre de la même espèce (Karlson & Lüscher, 1959).

La communication chimique intraspécifique joue un rôle essentiel dans le comportement sexuel et la vie sociale des insectes.

Avant même la création du terme de phéromone (Karlson & Lüscher, 1959), Roth & Willis (1952) avaient montré que des substances chimiques, émises par les individus des deux sexes, jouaient un rôle dans le comportement sexuel de *B. germanica*. Ce qui fait de cette espèce un modèle de choix dans l'étude du comportement reproducteur.

Parmi les différentes molécules impliquées dans ces phénomènes de communication, les hydrocarbures cuticulaires jouent un rôle prépondérant. Ces molécules de nature lipidique, recouvrent la surface du corps des insectes et leurs assure une protection contre la déshydratation, une régulation de la perméabilité cuticulaire (Gibbs, 1998) et une protection contre les microorganismes et les champignons entomopathogènes (Herzner & Strohm, 2007).



Chez la majorité des insectes, les hydrocarbures constituent les principaux composants de l'épicuticule (Jackson & Blomquist, 1976; Nelson & Blomquist, 1995; Juarez, 2004); et ils représentent un excellent critère chimiotaxonomique (Brown *et al.*, 1996; Howard & Blomquist, 2005). En effet, la spécificité des profils cuticulaires, est fonction des espèces; et constitue la seule « signature chimique » chez de nombreux insectes de différents ordres (Blomquist *et al.*, 2005; Saïd *et al.*, 2005). De plus, les hydrocarbures cuticulaires agissent comme médiateurs chimiques jouant un rôle déterminant dans la biologie et le comportement des insectes (Brossut & Sreng, 1985). En effet, ces composés sont impliqués dans la communication chimique en agissant comme phéromones sexuelles (Blomquist *et al.*, 2005), phéromones d'agrégations (Wertheim, 2005; Saïd *et al.*, 2005), kairomones, aphrodisiaques, phéromones d'alarme, sécrétions défensives (Howard & Blomquist, 1982) et comme signaux de reconnaissances intra- et inter espèces (Clément *et al.*, 1987; Espelie *et al.*, 1994; Everaerts *et al.*, 1997).

Chez *B. germanica*, les hydrocarbures cuticulaires servent comme précurseurs de synthèse de molécules bioactives, tel que la phéromone sexuelle de contact, la 3, 11-diméthylnonacosanone (Juarez, 2004). Ce dérivé oxygéné provient de l'hydrocarbure majoritaire, le 3, 11-diméthylnonacosane (Chase *et al.*, 1992) (Fig. 13). Les hydrocarbures cuticulaires sont synthétisés au niveau des oenocytes du tégument abdominal (Fan *et al.*, 2003) grâce à l'élongation des acyl-CoAs appropriés, suivie de la réduction des acides gras en aldéhydes et la décarboxylation des aldéhydes en alcanes à (n-1) atomes de carbones, sous l'influence d'une enzyme à P450 nécessitant la présence du NADPH et l'oxygène moléculaire (Reed *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2012) (Fig. 13).

Le comportement sexuel précédant l'accouplement chez *B. germanica* est régi par une succession de séquences comportementales complexes. Le rapprochement des sexes se fait par le biais d'une phéromone sexuelle volatile émise par les femelles, qui présentent un comportement d'appel caractéristique (Liang & Schal 1993; Nojima *et*



al., 2005). Cette phéromone volatile nommée Blattellaquinone est produite par les glandes pygidiales situées à l'extrémité de l'abdomen (Nojima *et al.*, 2005).

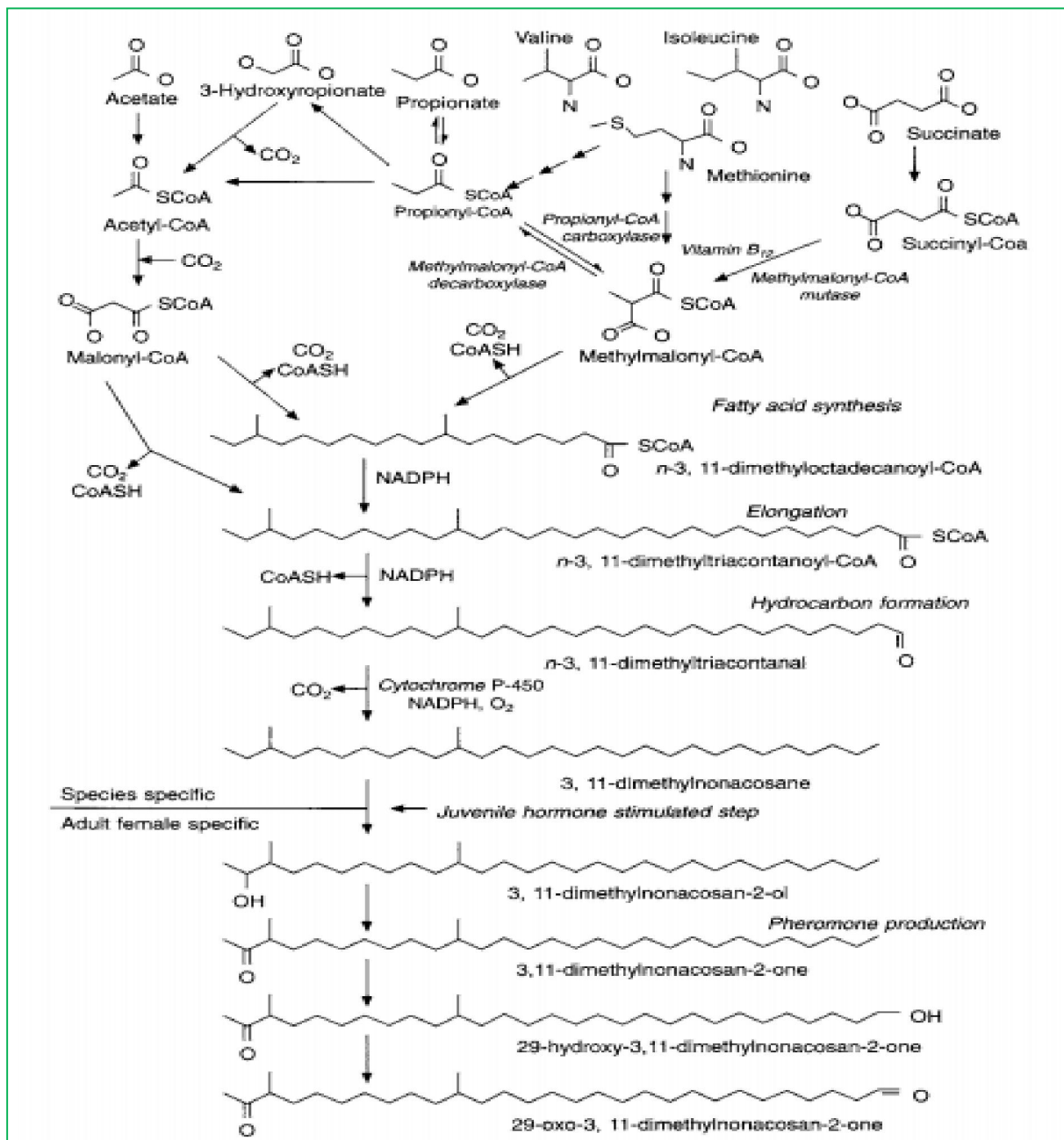


Figure 13. Voies métaboliques de la biosynthèse de la 3,11-dimethylnonacosan-2-one et des composés spécifiques de la phéromone sexuelle de contact de *Blattella germanica* (Howard & Blomquist, 2005).



Lorsque les partenaires sont presque au contact l'un de l'autre, le mâle caresse la femelle de ses antennes et perçoit ainsi une phéromone sexuelle de contact femelle qui est adsorbée dans les cires cuticulaires qui recouvrent l'ensemble du corps. Le composant le plus abondant de la phéromone sexuelle de contact femelle est le (3S, 11S)-diméthylnonacosan-2-one (Nishida *et al.*, 1974). Immédiatement, le mâle adopte le comportement de parade, effectue aussitôt une rotation de 180° loin de la femelle et relève ses ailes à 90°, découvrant son dos et en particulier les glandes tergaes (dorsales), situées sur les tergites 7 et 8 qui produisent des "aphrodisiaques", mélanges de protéines et de produits plus volatils, dont les femelles sont friandes. La femelle monte alors sur le dos du mâle pour lécher ces sécrétions tergaes et se trouve ainsi dans une position propice à l'accouplement (Roth & Willis, 1952; Nojima *et al.*, 1999a, b, 2002; Kugimiya *et al.*, 2002). Profitant de l'immobilité de la femelle, le mâle étend son abdomen sous celui de la femelle et agrippe ses genitalia; l'accouplement ce termine dos à dos (Brossut, 1996) (Fig. 14).

Si l'impact des agonistes des ecdystéroïdes sur la reproduction a été largement documenté chez les insectes de différents ordres (Taïbi *et al.*, 2003; Pineda *et al.*, 2007; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a; Pineda *et al.*, 2009; Rodríguez Enríquez *et al.*, 2010; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012; Bouzeraa & Soltani-Mazouni, 2014), très peu de travaux ont évalué les effets probables des agonistes des ecdystéroïdes sur le comportement sexuel des insectes où seuls les Lépidoptères ont été étudiés (Dallaires *et al.*, 2004; Hoelscher & Barrett 2003; Barrett 2008). Par ailleurs, à notre connaissance, les effets d'analogues de l'ecdysone sur les activités pré-copulatoires associées à la communication chimique des deux sexes chez *B. germanica* n'ont fait l'objet d'aucune étude hormis les travaux préliminaires de notre équipe (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a, 2009b).



Phase A- Comportement d'appel de la femelle

- 1 Emission des phéromones volatiles attractrices à distance
Phéromone volatile : **blattellaquinone**



Phase B- Contacts antennaires

- 2 Reconnaissance du partenaire sexuel
Phéromone de contact femelle:
3,11diméthylnonacosanone



Phase C- Phase copulatoire

- 3 Parade du mâle
- 4 Montée de la femelle sur le dos du mâle
- 5 Copulation en position opposée



Figure 14. Comportement sexuel de *B. germanica* (Nojima *et al.*, 2005). Photos A: P.G. Koehler (Gr: x 2,3), B, C, D: J.P. Farine (Gr: x 1,07), E: B. Littlehales (Gr: x 1,07).



Le chapitre précédent nous a permis de mettre en évidence l'impact de doses sublétales de tébufénozide sur la morphométrie des ovaires de *B. germanica*. En effet, l'insecticide affecte l'ovogénèse en réduisant le nombre d'ovocyte et la taille de l'ovocyte basal et en perturbant le phénomène de ponte. Les résultats obtenus suggèrent également une interférence de l'agoniste des ecdystéroïdes avec les taux de biosynthèse de l'HJ. De plus, [Kilani-Morakchi et al. \(2009a\)](#) ont permis de mettre en évidence une perturbation de la reproduction et du comportement sexuel chez *B. germanica* avec une réduction drastique des quantités d'hydrocarbures cuticulaires, connus pour être les précurseurs de synthèse de la phéromone de contact femelle chez cette espèce ([Kilani-Morakchi et al., 2009a](#)). Aussi et afin d'approfondir les résultats préliminaires, le présent chapitre vise à évaluer les effets sublétaux du tébufénozide sur *B. germanica* et ce en analysant:

- Les étapes clés de la séquence comportementale conduisant à l'accouplement.
- Le succès reproducteur de l'insecte.
- L'impact de l'insecticide sur le profil cuticulaire.



2. RESULTATS

2.1. Effets sublétaux du tébufénozide sur le comportement sexuel :

Les effets du tébufénozide (DL₂₅), administré par application topique aux adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*, ont été évalués sur le comportement sexuel de l'insecte et ce en étudiant les différentes étapes clés précédant l'accouplement. Les tests ont été réalisés sur 4 dyades (mâle témoin *vs* femelle témoin, mâle traité *vs* femelle témoin, mâle témoin *vs* femelle traitée et mâle traité *vs* femelle traitée).

2.1.1. Effets sur le temps de latence:

Les résultats du temps de latence, temps nécessaire au premier contact entre les partenaires sexuels, diffèrent de manière significative entre les groupes testés (Kruskal-Wallis: $p < 0,001$). Le temps de latence augmente de manière significative dans les différents groupes traités et ce en comparaison aux témoins (Fig. 15). Des différences très significatives ont été enregistrées ($p < 0,01$) entre les groupes où seul les mâles ou les femelles ont subi le traitement et ceux où les deux sexes ont été traités.

Comparativement aux témoins, où le temps de latence enregistré est de $50,5 \pm 3,90$ s, les valeurs moyennes sont de $114,14 \pm 9,52$ s pour les femelles traitées *vs* mâle témoins ($p < 0,01$), $115,3 \pm 19,07$ s ($p < 0,05$) pour les femelles témoins *vs* mâles traités et $228,4 \pm 19,57$ s pour les femelles traitées *vs* mâle traités ($p < 0,001$) (Tableau 11).

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été enregistrée entre les femelles traitées *vs* mâles témoins et femelles témoins *vs* mâles traités. Le test de Dunn's a permis de classer les couples testés en trois groupes différents: le premier groupe est représenté par les femelles témoins *vs* les mâles témoins, le second par les femelles traitées *vs* les mâles témoins et femelles témoins *vs* mâles traités, et le troisième groupe par les femelles traitées *vs* mâles traités.



Tableau 11. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: temps de latence (s) ($m \pm SEM$; $n= 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).

Temps de latence (s)	FT/MT	FR/MT	FT/MR	FR/MR
M \pm SEM	50,5 \pm 3,9	114,19 \pm 9,52	115,3 \pm 19,07	228,4 \pm 19,57

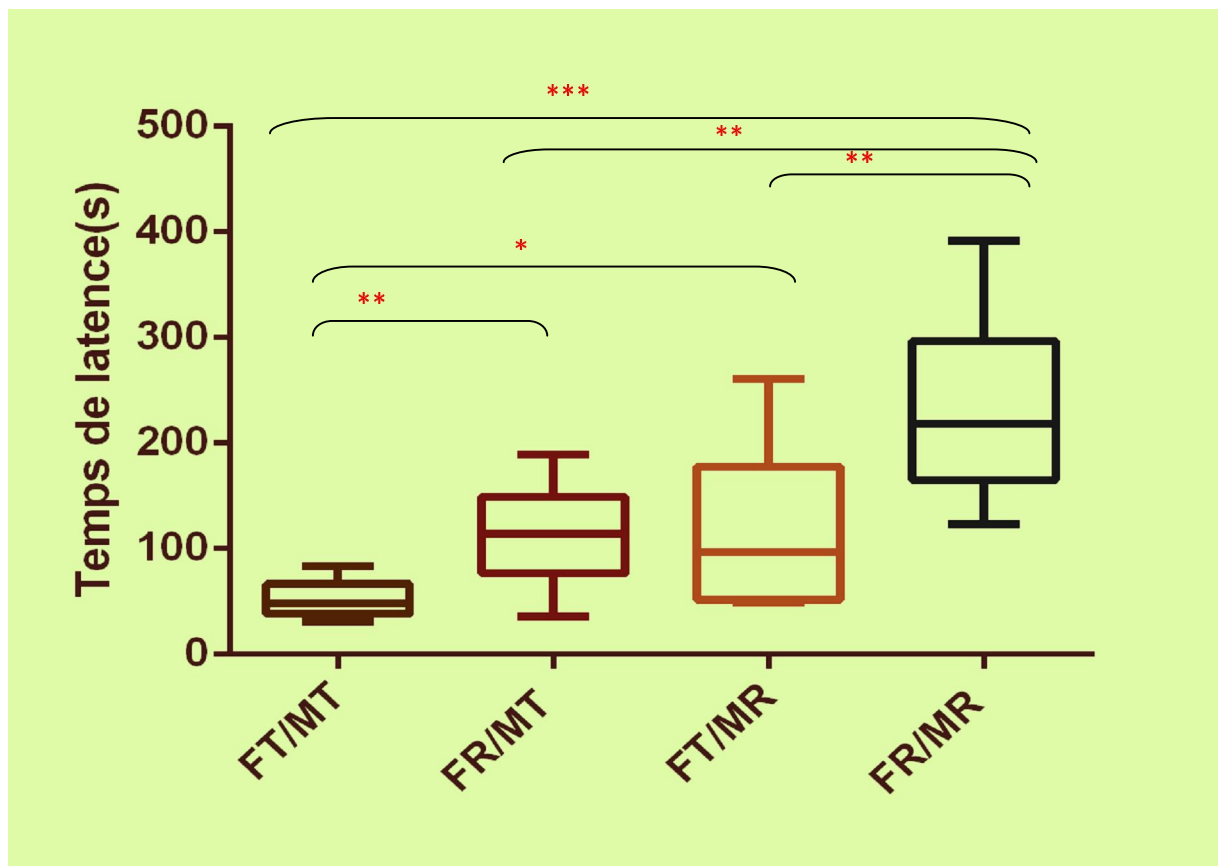


Figure 15. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: temps de latence (s) ($m \pm SEM$; $n= 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



2.1.2. Effets sur le nombre de contacts antennaires:

Le nombre de contacts antennaires entre les deux partenaires sexuels diffère significativement entre les différents groupe testés (Kruskal-Wallis: $p < 0,001$). L'analyse statistique des données montre que le nombre de contacts antennaires est plus élevé ($p < 0,001$) chez les femelles traitées *vs* mâles témoins ($7,78 \pm 0,61$), femelles témoins *vs* mâles traités ($7,89 \pm 0,76$) et femelles traitées *vs* mâles traités ($10,47 \pm 0,56$) en comparaison aux témoins ($3,16 \pm 0,30$) (Tableau 12). Aucune différence significative n'a été enregistrée ($p < 0,05$) entre les différents groupes traités. Le tébufénozide affecte donc de la même manière le nombre de contacts antennaires dans tous les groupes testés et ce comparativement aux témoins (Fig. 16).

Tableau 12. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: nombre de contacts antennaires ($m \pm SEM$; $n = 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).

Nb Cnt. antennaires	FT/MT	FR/MT	FT/MR	FR/MR
M \pm SEM	$3,16 \pm 0,30$	$7,78 \pm 0,61$	$7,89 \pm 0,76$	$10,47 \pm 0,56$

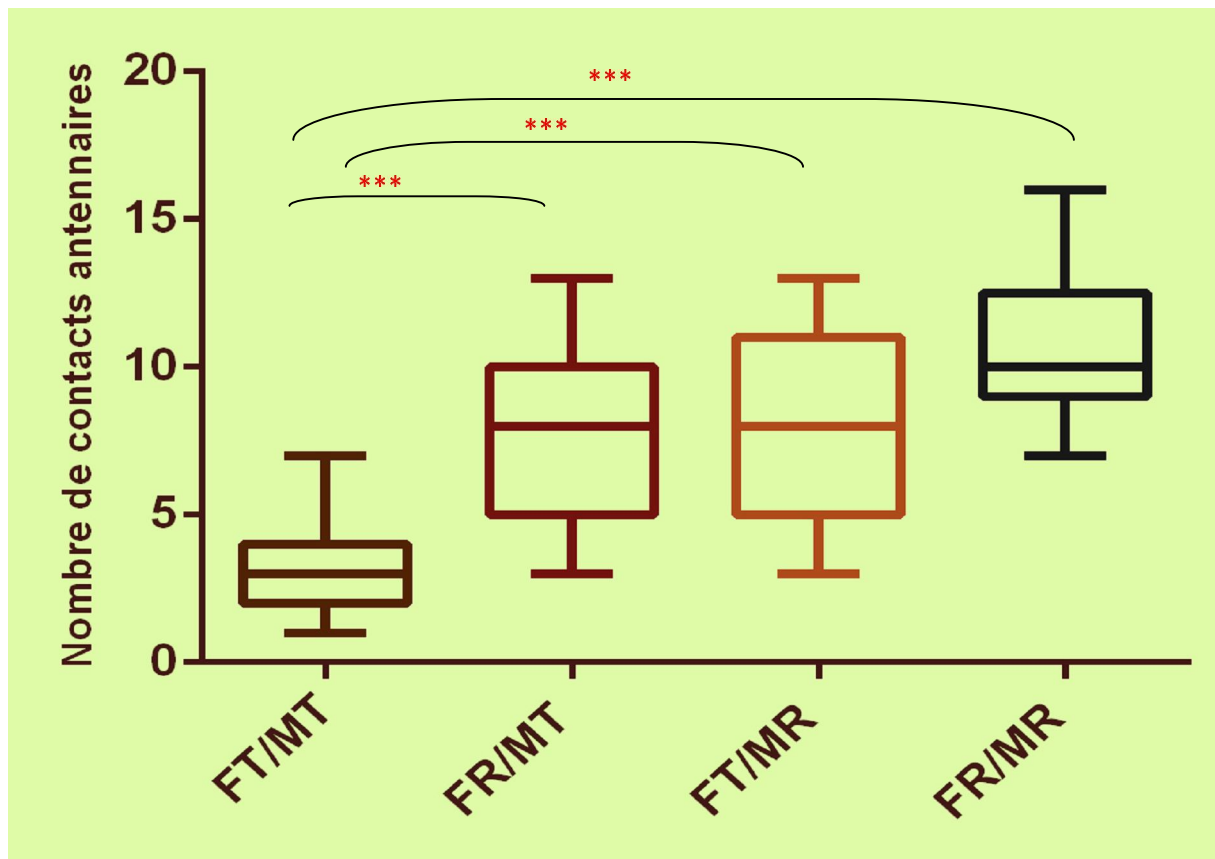


Figure 16. Effets du tébufénozide (DL₂₅), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: nombre de contacts antennaires ($m \pm SEM$; $n = 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.1.3. Effets sur le comportement de parade:

Le tébufénozide (DL₂₅) induit une réduction significative (Test binomial, $p < 0,001$) du pourcentage de parades des mâles de *B. germanica* et ce comparativement aux témoins (100% de parades). En effets, les pourcentages de parades enregistrés sont de 30% chez les femelles traitées *vs* mâles témoins et de 45% chez les femelles témoins *vs* mâles traités. Le tébufénozide affecte donc la capacité des mâles à localiser les femelles vierges.

L'insecticide induit une perte totale du comportement de parade lorsque les deux sexes sont traités (Femelle traitée *vs* mâle traité).



De plus, le nombre de parades chez le mâle diminue de manière significative ($p < 0,01$) chez les groupes traités en comparaison aux groupes témoins ($4,62 \pm 0,46$) (Fig. 17). Aucune différence n'est enregistrée ($p < 0,05$) entre femelles traitées vs mâles témoins ($1,28 \pm 0,18$) et femelles témoins vs mâles traités ($1,11 \pm 0,11$) (Tableau 13).

Tableau 13. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: nombre de parades ($m \pm SEM$; $n = 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).

Nb. parade	FT/MT	FR/MT	FT/MR	FR/MR
M \pm SEM	$4,62 \pm 0,46$	$1,28 \pm 0,18$	$1,11 \pm 0,11$	0

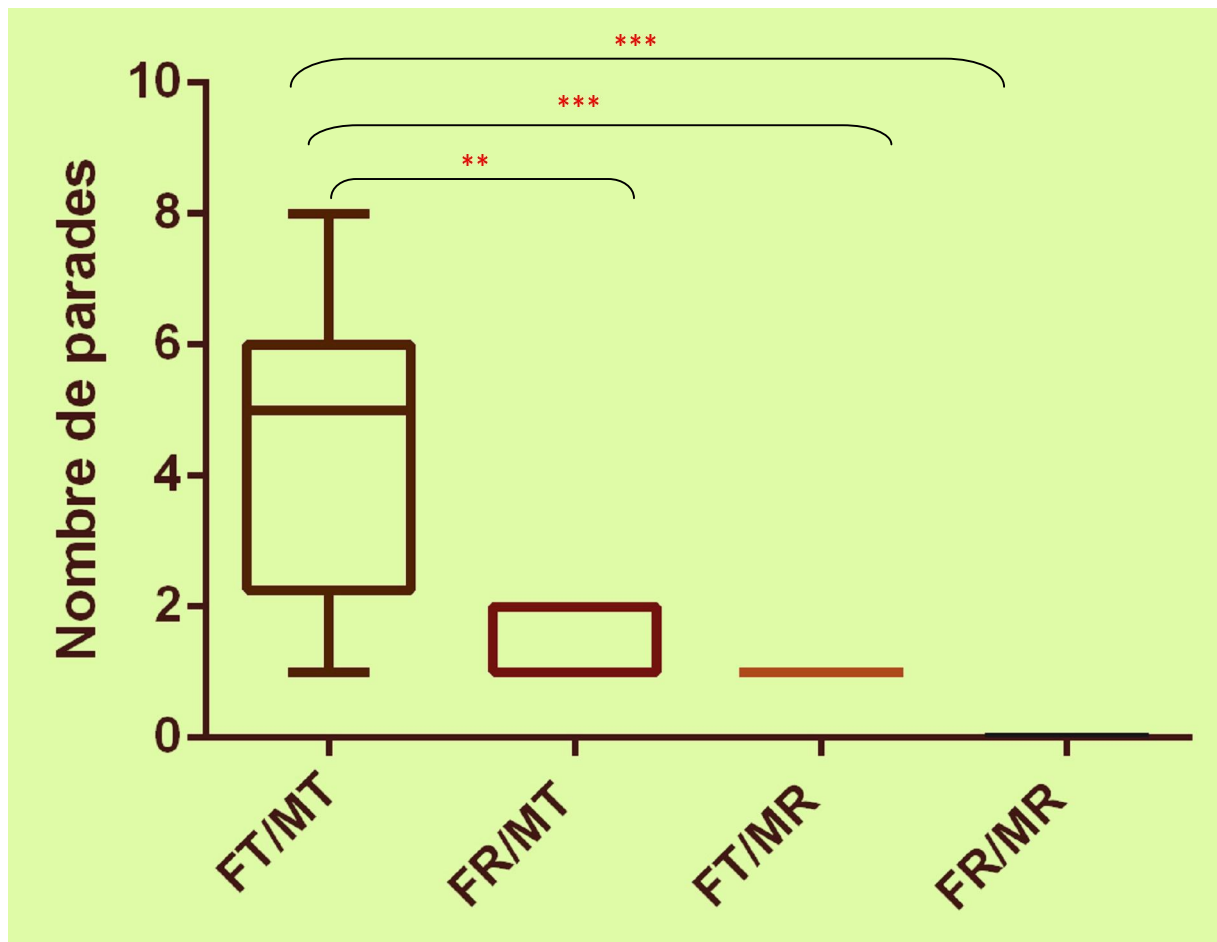


Figure 17. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: nombre de parades ($m \pm SEM$; $n = 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (Kruskal-Wallis: $p < 0,001$).

2.1.4. Effets sur le comportement de montée:

Chez les témoins, le pourcentage de montée de la femelle sur le dos du mâle est de 80%. On enregistre une nette diminution (test binomial, $p < 0,001$), du nombre de montées chez les femelles traitées *vs* mâles témoins (16,67%) et chez les femelles témoins *vs* mâles traités (23,81%). Le tébufénozide n'affecte pas le nombre de montées (Tableau 14) chez les femelles traitées *vs* mâle témoins et femelles



témoins *vs* mâle traités et ce comparativement aux témoins ($p > 0,05$). Aucune montée n'a été enregistrée chez les femelles traitées *vs* mâles traités (Fig. 18).

Tableau 14. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: nombre de montées ($m \pm SEM$; $n = 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité).

Nombre de montée	FT/MT	FR/MT	FT/MR	FR/MR
M \pm SEM	2,15 \pm 0,24	2,33 \pm 0,42	2,6 \pm 0,5	0

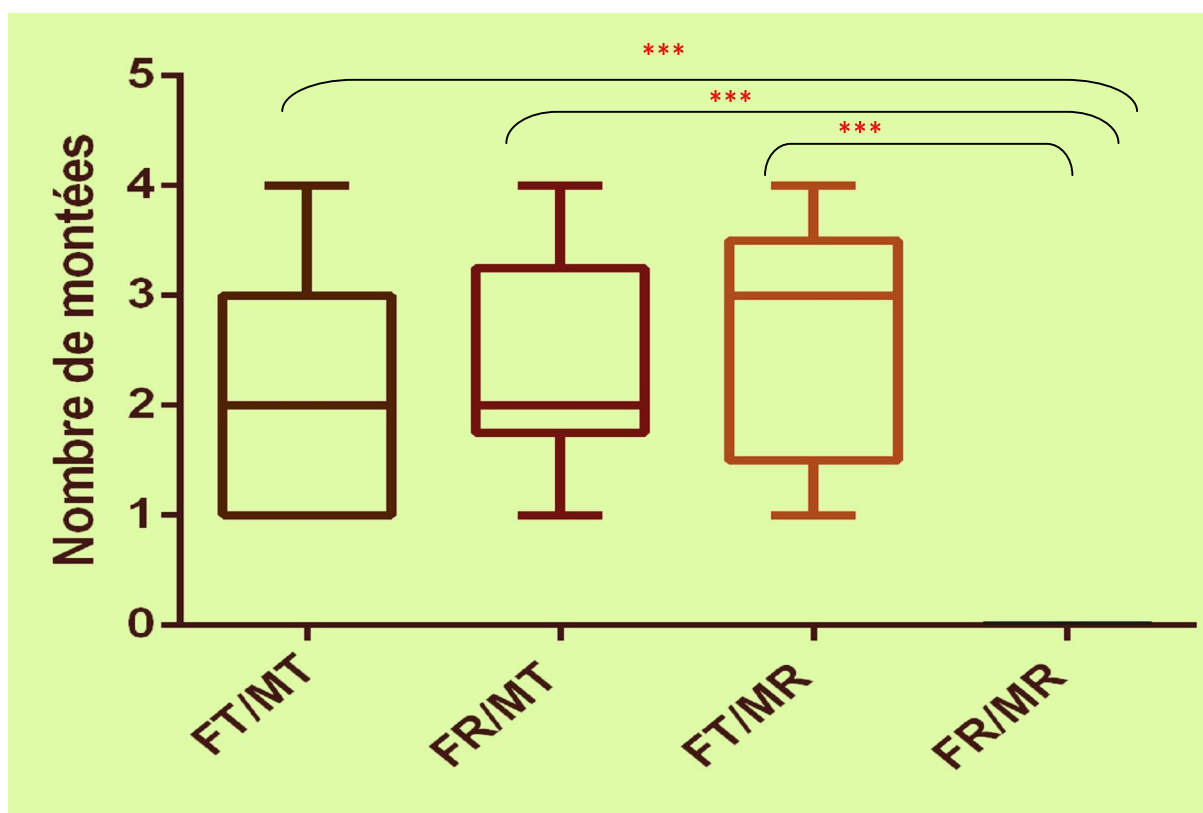


Figure 17. Effets du tébufénozide (DL_{25}), administré par application topique, sur des adultes vierges nouvellement exuviés de *B. germanica*: nombre de montées ($m \pm SEM$; $n = 20-30$; FT: femelle témoin; MT: mâle témoin; FR: femelle traitée; MR: mâle traité; * différence significative : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (Kruskal-Wallis: $p = 0,003$).



2.1.5. Effets sur les tests d'antennes:

La présence ou l'absence, de la phéromone sexuelle de contact femelle a été évaluée en utilisant le test d'antenne. Nos résultats ont démontré que l'antenne d'une femelle témoin provoquer des parades chez 100% des mâles témoins. La capacité d'une antenne de femelle témoin à stimuler le comportement de parade a été réduit de manière significative (70% de réponse) si les mâles ont été préalablement traités au tébufénozide (DL₂₅) (test binomial, $p < 0,001$). Enfin, aucune parade n'a été enregistrée chez les mâles (0% de réponse) testés à l'aide d'antenne de femelle traitée au tébufénozide (DL₂₅).

2.2. Effets sublétaux du tébufénozide sur le succès reproducteur:

2.2.1. Effets sur le pourcentage d'accouplement:

Chez les séries témoins, l'accouplement a été enregistré chez 90% des couples testés. Chez les séries traitées au tébufénozide (DL₂₅), le pourcentage d'accouplement diminue de manière significative comparativement aux témoins (test binomial, $p < 0,001$). En effet, seul 25% d'accouplement sont enregistrés pour les couples femelles traitées *vs* mâles témoins, 30% chez les femelles témoins *vs* mâles traités et 20% chez les femelles traitées *vs* mâles traités. Aucune différence significative n'a été notée entre femelles traitées *vs* mâles témoins et femelles traitées *vs* mâles traités (test binomial, $p > 0,05$). Cependant une différence significative (test binomial, $p = 0,016$) a été enregistrée entre femelles témoins *vs* mâles traités et femelles traitées *vs* mâles traités.

2.2.2. Effets sur le pourcentage de formation de l'oothèque et la viabilité des larves:

Nos résultats montrent que chez les séries témoins, la formation de l'oothèque a été observée chez 90% des femelles testées. Chez les séries traitées le taux de formation de l'oothèque diminue significativement comparativement aux



témoins (test binomial, $p < 0,001$). En effet, la formation de l'oothèque chez les femelles n'a été observée que chez 20% des insectes testés pour les couples femelles traitées *vs* mâles témoins, 30% chez les femelles témoins *vs* mâles traités et 10% seulement chez les femelles traitées *vs* mâles traités. Des différences significatives ont été notées entre femelles traitées *vs* mâles témoins et femelles témoins *vs* mâles traités ($p = 0,016$), entre femelles traitées *vs* mâles témoins et femelles traitées *vs* mâles traités (0,002) et enfin entre femelles témoins *vs* mâles traités et femelles traitées *vs* mâles traités ($p < 0,001$).

Le nombre de larves viables produites par femelle chez les séries témoins est de $31,28 \pm 1,85$. L'agoniste des ecdystéroïdes affecte de manière négative ($p < 0,001$) la fécondité des femelles de *B. germanica*. En effet, nos résultats enregistrent une absence totale de larves viables chez les différents groupes traités au tébufénozide (DL_{25}).

2.3. Effets sublétaux du tébufénozide sur les hydrocarbures cuticulaires:

L'analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG) des extraits cuticulaires chez les adultes mâles et femelles de *B. germanica* âgés de 15 jours a permis de mettre en évidence la présence de 25 pics cuticulaires tels qu'il a été rapporté par Rivault *et al.* (2002). En raison des faibles concentrations de certains composés, nous avons choisie de quantifier les 15 pics majoritaires (Fig. 18, Tableau 15) représentés par des quantités d'hydrocarbures cuticulaires (HC) supérieur à 7 μg par insecte (Fig. 18). Ces composés, identifiés par Rivault *et al.* (2002), regroupent deux n-alcanes, huit monométhylalcanes et cinq diméthylalcanes (Tableau 15). Cependant, un certain nombre de pics contiennent plusieurs composés qui ne peuvent être séparés dans les conditions chromatographiques utilisées (ex : pics 2 et 5; Tableau 15). De ce fait, et durant toutes nos expérimentations nous ne pouvons affirmer si l'un ou l'autre de ces composés est responsable de la variation d'un pic donné.



Les résultats obtenus révèlent une similitude qualitative des profils cuticulaires des différents groupes étudiés (insectes témoins et traités). En effet, les 15 pics majoritaires sont retrouvés sur tous les chromatogrammes.

Nos résultats révèlent que l'application topique du tébufénozide (DL₂₅) aux adultes nouvellement exuviés de *B. germanica* affecte le profil cuticulaire avec une réduction significative des quantités du 3-méthylheptacosane (pic 4), du 9-, 11-, 13- et 15-méthylnonacosane (pic 8) chez les deux sexes. Les quantités du n-heptacosane (pic 1), du 9-, 11- et 13-méthylheptacosane (pic 2) ainsi que du 5-méthylheptacosane (pic 3) sont également significativement réduites chez les mâles. Chez les femelles, le tébufénozide induit une réduction significative du 3,11 et 3,9- diméthylheptacosane (pic 6), du 5-méthylnonacosane (pic 10), du 11,15- et 13,17- diméthylnonacosane (pic 11), du 3-méthylnonacosane (pic 12) et du 3,7-, 3,9- et 3,11- diméthylnonacosane (pic 14) (Tableau 15). Les six composés de la phéromone de contact femelle dérivant du 3,11-diméthylnonacosane et du 3,11-diméthylheptacosane sont présents en très faible quantité chez les femelles (< 1 ng par femelle) et ne sont donc pas détectés dans nos conditions chromatographiques.

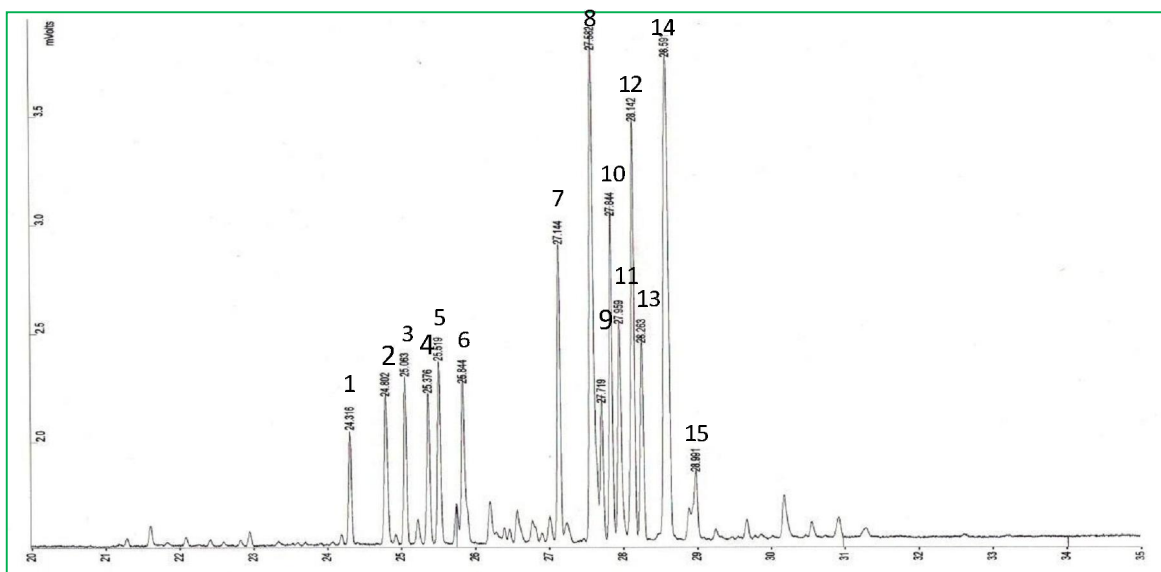


Figure 18. Profil d'hydrocarbures cuticulaires, chez les adultes mâles et femelles de *B. germanica*, âgés de 15 jours, après analyse en chromatographie en phase gazeuse (1-15 : composés cuticulaires: voir tableau 15).



Tableau 15. Quantification ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) des 15 principaux hydrocarbures cuticulaires testés chez les adultes mâles et femelles, témoins et traités (tebufénoside LD₂₅) de *B. germanica* âgés de 15 jours ($m \pm \text{SEM}$, $n = 6$). Les pics sont identifiés selon Rivault *et al.*, (2002). Pour chaque sexe, les quantités d'HC ont été comparées entre témoins et traités par le test *t* de Student à $p < 0,05$. (ddl: degré de liberté).

Pics	Composés	Témoins mâles	Traités mâles	<i>t</i> (10ddl)	<i>p</i>	Témoins femelles	Traités femelles	<i>t</i> (10 ddl)	<i>p</i>
1	n-Heptacosane	20,36 ± 1,84	8,68 ± 1,12	5,407	0,0003	10,09 ± 1,31	9,46 ± 1,49	ns	$p > 0,05$
2	9-,11- et 13-Methylheptacosane	44,06 ± 7,37	13,80 ± 2,44	3,861	0,0032	18,15 ± 1,39	12,47 ± 2,28	ns	$p > 0,05$
3	5-Methylheptacosane	21,44 ± 2,31	11,98 ± 2,34	2,875	0,0165	18,47 ± 1,37	12,48 ± 2,59	ns	$p > 0,05$
4	3-Methylheptacosane	26,14 ± 3,02	13,46 ± 1,18	3,894	0,003	19,32 ± 1,45	11,09 ± 2,19	3,122	0,0108
5	5-, 9- et 5-, 11-Dimethylheptacosane	8,76 ± 2,31	11,43 ± 2,55	ns	$p > 0,05$	20,97 ± 1,62	13,88 ± 3,13	ns	$p > 0,05$
6	3-, 11- et 3-, 9-Dimethylheptacosane	9,45 ± 1,76	12,47 ± 3,10	ns	$p > 0,05$	25,27 ± 2,77	14,32 ± 3,47	2,461	0,0336
7	n-Nonacosane	30,93 ± 3,39	25,30 ± 6,50	ns	$p > 0,05$	34,29 ± 2,76	27,41 ± 3,26	ns	$p > 0,05$
8	9-, 11-, 13- et 15-Methylnonacosane	105,33 ± 12,81	65,44 ± 11,31	2,333	0,0418	86,68 ± 3,11	55,93 ± 9,73	3,008	0,0132
9	7-Methylnonacosane	15,66 ± 1,47	11,73 ± 2,30	ns	$p > 0,05$	17,67 ± 1,80	11,38 ± 2,21	ns	$p > 0,05$
10	5-Methylnonacosane	34,83 ± 3,46	28,55 ± 6,91	ns	$p > 0,05$	42,62 ± 3,37	24,57 ± 4,96	3,005	0,0132
11	11-, 15- et 13-, 17-Dimethylnonacosane	31,65 ± 4,70	19,19 ± 3,77	ns	$p > 0,05$	35,53 ± 1,97	22,68 ± 4,72	2,512	0,0308
12	3-Methylnonacosane	43,42 ± 4,72	34,47 ± 8,11	ns	$p > 0,05$	59,27 ± 5,33	38,00 ± 5,91	2,67	0,0235
13	5-, 9- et 5-, 11-Dimethylnonacosane	23,88 ± 4,34	13,32 ± 2,82	ns	$p > 0,05$	23,82 ± 1,01	17,49 ± 4,19	ns	$p > 0,05$
14	3-, 7-, 3-, 9- et 3-, 11-Dimethylnonacosane	74,85 ± 12,71	49,92 ± 12,48	ns	$p > 0,05$	112,65 ± 8,83	67,63 ± 18,04	2,241	0,0489
15	11-, 13- et 15-Methyltriacontane	10,20 ± 1,58	7,66 ± 1,41	ns	$p > 0,05$	13,54 ± 1,33	15,00 ± 3,81	ns	$p > 0,05$



3. DISCUSSION

L'impact potentiel des doses sublétales d'insecticides sur la communication chimique des insectes a fait l'objet de nombreuses études. En effet, différents travaux ont permis de mettre en évidence les effets négatifs d'insecticides neurotoxiques sur la communication sexuelle des insectes et ce *via* la perturbation de la sensibilité et de la spécificité de la perception des phéromones (Wei *et al.*, 2004; Zhoo *et al.*, 2005). Chez les Lépidoptères, la perméthrine (pyréthrianoïde) et le malathion (organophosphoré), ont affecté les mâles en réduisant leurs temps d'initiation de vol (Haynes & Baker, 1985; Zhoo *et al.*, 2005). Des effets similaires ont également été rapportés sous l'effet des agonistes des ecdystéroïdes tels que le méthoxyfénozide (Barret, 2008) et le tébufénozide (Dallaire *et al.*, 2004). Hoelscher & Barrett (2003) ont mis en évidence une réduction de la capacité des mâles à s'orienter vers les femelles après leurs expositions à des surfaces traitées au méthoxyfénozide.

Les résultats obtenus au cours de notre étude, révèlent que l'application d'une dose sublétale (DL_{25}) de tébufénozide affecte négativement le comportement sexuel de *B. germanica*. En effet, le traitement des mâles et/ou des femelles induit une augmentation du temps de latence nécessaire au premier contact entre les deux partenaires sexuels et ce pour tous les couples testés; avec des effets plus marqués lors du traitement des femelles seules ou le traitement des deux sexes. Cette augmentation du temps de latence peut être expliquée par l'inhibition de l'activité locomotrice du mâle et/ou une réduction des capacités du mâle à localiser la femelle, probablement causée par une interférence avec le système chimiosensoriel.

Le tébufénozide augmente également le nombre de contacts antennaires et réduit le comportement de parade chez les mâles. Le comportement de parade disparaît complètement lorsque les deux sexes sont traités. L'augmentation du nombre de contacts antennaires traduit une mauvaise perception de la phéromone de contact femelle indispensable à la décision du mâle de poursuivre ou non son comportement sexuel. L'effet observé sur le nombre de contacts antennaires se répercute donc sur les parades des mâles avec une absence totale de parade ou une



réduction significative de ce paramètre. Les résultats préliminaires de notre équipe révèlent, chez *B. germanica*, une diminution significative du nombre de contacts antennaires chez 80% des couples âgés de 6 jours et traités avec une faible dose de tébufénozide (1 µg/insecte); aucun effet n'a été rapporté sur le nombre de parade (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009b). En revanche, une absence totale de parade a été notée chez 20% des mâles testés (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009b). Une diminution du nombre de parade chez les mâles a également été rapportée sous l'effet de l'halofénozide mais avec des effets moins marqués que pour le tébufénozide (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a). Toutefois, l'halofénozide présente un effet drastique sur le profil d'hydrocarbure cuticulaire avec une réduction importante des quantités de tous les composés cuticulaires (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a).

Les différences constatées entre les deux agonistes de l'ecdysone (tébufénozide et halofénozide) sur le comportement sexuel de *B. germanica* pourraient être expliquées par leurs affinités inégales vis-à-vis des récepteurs des ecdystéroïdes (ECR) (Dhadialla *et al.*, 2010). De plus, la stabilité métabolique élevée de l'halofénozide chez les insectes sensibles permet de compenser sa faible affinité (Dhadialla *et al.*, 2010).

Nos résultats, révèlent également que les antennes des femelles traitées n'ont pas réussi à déclencher le comportement de parade chez les mâles. Ceci appuie l'hypothèse que le tébufénozide pourrait réduire la production et/ou la libération de la phéromone de contact femelle, affectant ainsi sa perception par les mâles. En effet, Freeman *et al.* (1999) ont démontré que toute interférence avec la synthèse des hormones stéroïdiennes conduisait à une altération de la réponse olfactive chez les drosophiles adultes.

De plus, il a été rapporté que les effets sublétaux des insecticides pouvaient influencer la fonction des organes sensoriels et ainsi modifier le comportement des insectes en réduisant ou en changeant l'information sensorielle atteignant le cerveau (Delpuech *et al.*, 2001). Par conséquent, les effets observés chez les adultes de *B. germanica* après traitement au tébufénozide pourraient être dus à une interférence



possible de ce composé avec les taux d'HJ, ou tout autre médiateur contrôlant la reproduction, et la perception chimiosensorielle.

Nos résultats révèlent également une réduction significative des pourcentages d'accouplement et de la formation de l'oothèque ainsi qu'une absence totale de larves viables sous l'effet du tébufénozide. De nombreux travaux ont rapporté l'effet négatif des agonistes des ecdystéroïdes (tébufénozide, halofénozide ou méthoxyfénozide) sur la reproduction de différentes espèces d'insectes en affectant le développement des ovocytes, la fécondité, la fertilité et le taux d'éclosion des œufs (Taïbi *et al.*, 2003; Pineda *et al.*, 2007; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). De plus, différentes études ont rapporté l'impact négatif des concentrations sublétales des agonistes de l'ecdysone sur le succès de l'accouplement et la spermatogenèse (Dallaire *et al.*, 2004; Seth *et al.*, 2004). Les résultats de notre premier chapitre, ont mis en évidence une réduction significative du nombre d'ovocytes et de la longueur des ovocytes basaux (méthode indirect pour l'estimation des taux d'HJ), chez les femelles vierges de *B. germanica* suggérant une réduction des taux d'HJ. Il a également été rapporté que l'halofénozide réduisait le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires, le volume des ovocytes basaux, les taux en ecdystéroïdes corporels et modifiait le comportement sexuel chez *B. germanica* (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a). Selon Dhadialla *et al.* (2010), toute interférence avec les taux d'ecdystéroïdes en utilisant un agoniste d'ecdystéroïde, se traduirait par une croissance anormale de l'ovocyte, de la formation des œufs et de l'embryogenèse, pouvant conduire à une perte totale de la descendance.

Chez les insectes, les hydrocarbures cuticulaires, et un certain nombre de composants de phéromones, sont formés par un processus d'élongation des acides gras suivis d'une décarboxylation (Howard & Blomquist, 2005). Les insectes utilisent des enzymes à P450 pour produire oxydativement les hydrocarbures à partir des aldéhydes (Qiu *et al.*, 2012). Les HCs de *B. germanica* sont constitués d'un mélange de composés apolaires contenant des n-alcanes, monométhylalcanes et diméthylalcanes (Rivault *et al.*, 2002). Les n-alcanes et monométhylalcanes sont des invariants



spécifiques de l'espèce et sont responsables des phénomènes d'agrégations et de la reconnaissance entre individus (Rivault *et al.*, 1998).

Différents travaux ont rapporté les effets négatifs des insecticides sur le profil des hydrocarbures cuticulaires de *B. germanica*, tels que sous l'effet de l'acide borique (Kilani-Morakchi *et al.*, 2005), l'acétamipride (Kilani-Morakchi *et al.*, 2006), ou encore le spinosad (Habachi *et al.*, 2009). Nos résultats révèlent que le tébufénozide affecte le profil cuticulaire des adultes de *B. germanica* en réduisant les quantités d'un certain nombre d'alcanes, méthylalcanes et diméthylalcanes chez les mâles (pics 2, 3, 4 et 8) et chez les femelles (pics 4, 6, 8, 10, 11, 12 et 14). De plus, chez les femelles, deux des trois diméthylalcanes (pics 6, 14) affectés par le traitement sont connus pour être des précurseurs de la phéromone sexuelle de contact femelle chez cette espèce (Eliyahu *et al.*, 2008). Ceci pourrait expliquer l'impact négatif de cet insecticide sur le comportement sexuel. De plus, l'action ciblée du tébufénozide sur le profil des HCs de *B. germanica* pourrait expliquer ses effets plus marqués sur le comportement sexuel en comparaison à l'halofénozide.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**



Conclusion et perspectives:

Nos expérimentations ont été menées chez les adultes nouvellement exuviés de *Blattella germanica* en vue d'évaluer les effets d'un agoniste des ecdystéroïdes, le tébufénozide, administré par application topique, sur la communication chimique et le succès reproducteur de l'insecte.

Les bioessais révèlent une faible toxicité du tébufénozide avec une DL_{50} de 30,20 $\mu\text{g}/\text{insecte}$ après 15 jours de traitement. Une dose sublétales DL_{25} (10,96 $\mu\text{g}/\text{insecte}$) a été estimée à partir de la courbe dose-réponse et utilisée pour le reste des expérimentations.

Le tébufénozide entraîne une réduction significative du nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et une perturbation de la ponte. L'insecticide réduit également la longueur de l'ovocyte basal suggérant une réduction des taux d'hormone juvénile. Une réduction des pourcentages d'accouplement, de la formation de l'oothèque et de la fécondité de l'insecte sont également notés.

L'agoniste des ecdystéroïdes, perturbe le comportement sexuel de *B. germanica* en augmentant le temps de latence et le nombre de contact antennaire. L'insecticide réduit le nombre et le pourcentage de parade des mâles ainsi que le nombre de montées chez les femelles. Les résultats du test d'antenne suggèrent une réduction de la production et/ou de la perception de la phéromone de contact femelle.

Le profil quantitatif des hydrocarbures cuticulaires est également perturbé sous l'effet du tébufénozide, et ce chez les deux sexes, avec une réduction significative de certains composés cuticulaires impliqués dans les phénomènes d'agrégations chez cet insecte mais aussi des deux précurseurs de la phéromone de contact femelle.

Le tébufénozide modifie donc le profil cuticulaire des adultes de *B. germanica* ce qui affecte de manière négative la communication sexuelle et, par conséquent, les événements de la reproduction.



En se basant sur les résultats obtenus, nous estimons que le tébufénozide pourrait donc être utilisé dans le contrôle de *B. germanica*, et ce dans le cadre des programmes de lutte intégrée.

A l'avenir il serait intéressant de compléter le présent travail par:

- Un dosage de l'hormone juvénile.
- Un dosage de la phéromone de contact.
- Des tests de comportement en utilisant un à un les différents composés cuticulaires affectés par l'insecticide.
- Des tests sur la phéromone volatile, la blattellaquinone.

RÉSUMÉS



Résumé:

L'activité d'un agoniste des ecdystéroïdes, le tébufénozide, a été évaluée sur la reproduction et le comportement sexuel de *B. germanica*. Une dose sub létale (DL₂₅: 10,96 µg/insecte), déterminée à partir d'une courbe dose-réponse, a été administrée par application topique aux adultes nouvellement exuviés des deux sexes.

Les résultats révèlent que l'insecticide réduit de manière significative le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et la taille de l'ovocyte basal, et ce comparativement aux témoins.

Le tébufénozide affecte également les différentes étapes de la séquence d'accouplement. En effet, les résultats révèlent une augmentation du temps de latence et du nombre de contacts antennaires et une réduction ou une suppression du comportement de parade chez les mâles. Le nombre de montées chez les femelles est également affecté. Le tébufénozide réduit les pourcentages d'accouplement, la production de l'oothèque et affecte la fécondité de l'insecte.

De plus, l'analyse chromatographique des hydrocarbures cuticulaires révèle une altération d'un certain nombre de composés chez les deux sexes. Chez les mâles, le tébufénozide réduit de manière significative les quantités de certains n-alcanes et monométhylalcanes connus pour leurs implications dans les phénomènes d'agrégations. Chez les femelles, en plus de la réduction des quantités de certains monométhylalcanes, une réduction significative des quantités des deux précurseurs de la phéromone de contact femelle (3, 11-diméthylnonacosane et 3,11-diméthylheptacosane) est également enregistrée.

Les résultats obtenus semblent être liés à une réduction de la production de la phéromone de contact femelle et à une mauvaise perception de cette phéromone par le mâle, probablement *via* des interférences, au niveau endocrine, avec les taux de production et/ou de l'émission de la phéromone.

Mots clés : *B. germanica*, tébufénozide, comportement sexuel, accouplement, hydrocarbures cuticulaires.

**Abstract:**

The activity of the non-steroidal ecdysteroid agonist tebufenozide was evaluated on the reproduction and sexual behavior of the cockroach *Blattella germanica*. A sublethal dose of this insecticide ($LD_{25} = 10.96 \mu\text{g}/\text{Insect}$), determined by a dose-response curve, was topically applied to newly emerged adults of both sexes.

Data showed that the compound caused a significant reduction in both the number of oocytes per paired ovaries and the size of basal oocytes, as compared to controls.

Moreover, treatment was found to affect the different steps of the mating sequences. The latency time and the number of antennal contacts between both sexes increase. A reduction of wing-raising posture or total loss of this courtship is noted. The number of female mounting is also affected. Moreover, tebufenozide reduced the mating success of treated couples and the percentage of ootheca production and affected the fecundity of insect.

In addition, gas-chromatography analyses of cuticular hydrocarbons revealed that tebufenozide altered a number of components in both sexes. In males, a significant reduction of various n-alkanes and monomethylalkanes, which are known to be related to aggregation behavior, was observed. In females, beside the reduction of some monomethylalkanes, a significant decrease in the amounts of the two known female contact sex pheromone precursors (3, 11-dimethylnonacosane and 3,11-dimethylheptacosane) could be noted. All these results might be linked to a reduction of the female contact sex pheromone production and to an alteration of the female pheromone perception by the male, probably *via* interferences of tebufenozide at endocrine level with production and/or emission of pheromones.

Key Words- *B. germanica*, tebufenozide, reproduction, sexual behavior, mating, cuticular hydrocarbons.



ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم نشاط مماثل الأوكستروبيد، *le tebufénozide*، على التكاثر و السلوك الجنسي للصرصور الألماني *B. germanica*. تم تحديد جرعة دون المميتة ($10,96 \mu\text{g}$ / *DL25 insecte*)، من خلال منحنى تركيز- استجابة، و تطبيقها موضعيا على الحشرات البالغة حديثة التسليخ للجنسين.

بينت النتائج أن المبيد الحشري يخفض بشكل كبير من عدد البويضات في كل زوج من المبايض و كذا حجم البويضة القاعدية و هذا بالمقارنة مع الحشرات الشاهدة.

يؤثر *tébufénozide* أيضا على مختلف مراحل تسلسل التزاوج. في الواقع، تكشف النتائج عن تزايد زمن الكمون و عدد الإتصالات بقرون الإستشعار، و تناقص أو غياب لسلوك الإستعراض عند الذكور. كما أن عدد سلوكيات الصعود عند الإناث قد تأثر. يعمل المبيد الحشري كذلك على خفض نسبة التزاوج، إنتاج محفظة البيوض كما يؤثر على خصوبة الحشرات.

بالإضافة لذلك، فإن التحليل الكروماتوغرافي للهيدروكربيرات الجلدية يظهر تغيرا في بعض عدد المركبات لدى الجنسين. فعند الذكور، يخفض *tébufénozide* بشكل كبير كميات بعض n - *alcanes* و *monométhylacanes* المعروفين بتدخلهما في ظاهرة التجميع. عند الإناث، بالإضافة إلى تناقص كميات بعض من *monométhylacanes*، نسجل كذلك تناقصا كبيرا في كميات ممهدا فيرومون الإتصال لدى الأنثى (*3, 11-dimethylnonacosane et 3,11-dimethylheptacosane*).

يبدو أن النتائج المحصل عليها مرتبطة بتناقص في إنتاج فيرومون الإتصال لدى الأنثى و سوء فهم لهذا الفيرومون من قبل الذكر، ربما عن طريق التدخلات على مستوى الغدد الصماء، مع معدل إنتاج و / أو تحرير الفيرومون.

كلمات مفتاحية: *B. germanica*، *tébufénozide*، سلوك جنسي، تزاوج، هيدروكربيرات جلدية.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Aguilera, L., Marquetti, M., Fuentes, O & Navarro, A. 2001.** Actividad biológica del diflubenzuron sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **53**:48-52.
- Amira, K., Boudjelida, H. & Farine, J.P. 2013.** Effect of an insect growth regulator (halofenozide) on the cuticular hydrocarbons of *Culex pipiens* larvae. *African Entomology*. **21**(2): 343–348.
- ANSM. 2013.** Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Risques liés à l'utilisation de préparations hospitalières, magistrales et officinales contenant de l'acide borique et/ou ses dérivés. Juillet 2013. 2p. FormatPDF.http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/b5a8c5d304ae4778f43ead4f69483bf.pdf.
- Appel, A.G. 1990.** Laboratory and field performance of consumer bait products for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control. *Journal of Economic Entomology*. **83**(1): 153–159.
- Appel, A. G. & Benson, E. P. 1995.** Performance of abamectin bait formulations against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*. **88**: 924–931.
- Appel, A.G. 2004.** Contamination affects the performance of insecticidal baits against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*. **97**: 2035-2042.
- Aribi, N., Quennedy, A., Soltani, N. & Delbecque, J.P. 1999.** L'initiation de la métamorphose chez *Zophobas atratus* (Coléoptera : Tenebrionidae): effets des ligatures et des régulateurs de croissance. *Annales de la Société Entomologique de France*. **35** (Suppl): 59-64.
- Aribi, N., Smagghe, G., Lakbar, C., Soltani-Mazouni, N. & Soltani, N. 2006.** Effects of pyriproxyfen a juvenile hormone analogue, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **84**: 55-62.
- Barrett, B.A. 2008.** Assessment of methoxyfenozide exposure on the sexual attractiveness and responsiveness of adult codling moth, *Cydia pomonella* L., in small orchard blocks. *Pest Management Science*. **64**: 916–922.
- Baumholtz M., Parish L.C., Witkowski J., Nutting W. 1997.** The medical importance of cockroaches. *International Journal of Dermatology*. **36**: 90-96.
- Bellés, X., Casas, J., Messeguer, A. & Piulachs, M.D. 1987.** *In vitro* biosynthesis of JH III by the corpora allata of adult females of *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochemistry*. **17**: 1007–1010.



- Bellés, X. 1995.** Interactions between corpora allata, fat body and ovary in insect reproduction: which controls which? *Netherlands Journal of Zoology*. **45**: 152-156.
- Blanc, N., 2000.** *Les animaux et la ville*. Paris : Odile Jacob (Eds). 232 p.
- Blomquist, G.J., Jurenka, R., Schal, C., Tittiger, C. 2005.** Biochemistry and molecular biology of pheromone production. In: Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S. (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier Academic, Saint Francisco. **3** : 705-751.
- Bouzeraa, H. & Soltani-Mazouni, N. 2014.** Comparative Effects of Two Moulting Hormone Agonists (Methoxyfenozide and Tebufenozide) on the Mediterranean Flour Moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae): Ecdysteroids Amounts of Testes and Reproductive Events. *World Applied Sciences Journal*. **31 (11)**: 1903-1910.
- Bradbury, J. W. & Vehrencamp, S. L. 1998.** Principles of Animal Communication. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 882p
- Brook, G. T. & McCaffery, A. R., 1990.** The Precocene Anti juvenile Hormones (Allatotoxins): A Case History in Insect Toxicology. *Chromatographie society symposium series*.
- Brossut, R. & Sreng, L. 1985.** L'univers chimique des Blattes. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 150^e anniversaire. **90**: 266-280.
- Brossut, R. 1996.** Pheromones. La communication chimique chez les animaux, (Eds.) CNRS.
- Brown, A.W.A. 1978.** Ecology of Pesticides. John Wiley & Sons, New-York.
- Brown, W.V., Walson, J.A.L. & Lacey, M.J. 1996.** A chemotaxonomic survey using cuticular hydrocarbons of some species of the Australian harvester termite genus *Drepanotermes* (Isoptera, Termitidae). *Society of Biology*. **27**: 199-209.
- Carson, R. 1962.** Silent spring. Boston, Massachusetts, USA.
- Casida, J.E. & Durkin, K.A. 2013.** Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions*. **203**: 221-225.



- Cassier, P., Lafont, R., Descamps, M., Porchet, M. & Soyez D., 1997. La reproduction des invertébrés : stratégies, modalités et régulation, intérêt fondamental et appliqué. *Masson (Eds.)*, 354 p.
- Castro, A.A., Lacerda, M.C., Zanuncio, T.V., de S. Ramalho, F., Polanczyk, R.A., Serraõ, J.E. & Zanuncio, J.C. 2012. Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology*. **21**: 96-103.
- Chain, Y. & Lee, C.Y. 2010. Insecticide resistance profiles and synergism in field populations of German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) from Singapore. *Journal of Economic Entomology*. **103**: 460-471.
- Chase, J., Toahara, K., Prestwich, G.D., Schal C. & Blomquist, G.J. 1992. Biosynthesis and endocrine control of the production of the German cockroach sex pheromone, 3-11-dimethyl-nonacosan-2-one. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **89**: 6050-6054.
- Clément, J.L., Bonavita-Cougourdan, A. & Lange, C. 1987. Nestmate recognition and cuticular hydrocarbons in *Camponotus vagus*. In: Eder J., Rembold H. (Eds.). *The chemistry and biology of social insects*. Verlag J. Peperny, Munich, 473-474.
- Cornwell P. B., 1968. The cockroach. A laboratory insect and an industrial pest. **I**: 116 pp.
- Daas-Maamcha, O., Houd-Chaker, K., Soucha, M., Daas, T. & Scaps, P. 2013. Effects of an Ecdysteroid Analog (RH-0345) on the Ovarian and Testicular Components of *Eupolybothrus nudicornis* (Myriapoda: Chilopoda). *Jordan Journal of Biological Sciences*. **6(2)**: 91-98.
- Dallaire, R., Labrecque, A., Marcotte, M., Bauce, E. & Delisle, J. 2004. The sublethal effects of tebufenozide on the precopulatory and copulatory activities of *Christoneura fumiferana* and *C. rosaceana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **112(3)**: 169-181.
- Darvas, J.M., Kotze, J.M. & Wehner, F.C. 1990. Effect of treatment after picking on the incidence of postharvest fruit disease of avocado. *Phytophylactica*. **22**: 93-96.
- Darvas, B., Polgar, L., Dinan, M.H.T., Eross, K. & Wing, K.D. 1992. Developmental disturbance in different order caused by an ecdysteroid agonist, RH-0345. *Journal of Economic Entomology*. **85**: 2107-2112.



- Delbecque, J.P., Bitsch C., Mathelin, J. & Bitsch. 1986.** Effects of precocene on intermoult length and ecdysteroid titers in relation to ovarian maturation in *Thermobia domestica*. *Journal of Insect Physiology*. **32(6)**: 535-541.
- Delpuech, J.M., Legallet, B. & Fouillet, P. 2001.** Partial compensation of sublethal effect of deltamethrin on the sex pheromonal communication on *Trichogramma brassicae*. *Chemosphere*. **42**: 985-991.
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R. & Le, D. P. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*. **43**: 545-569.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A. & Smagghe, G. 2005.** Insect growth and developmental-disturbing insecticides. In: Gilbert, L.I., Iatrou K. & Gill, S.S. (Eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, U.K. **6**: 55-116.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A., Smagghe, G. 2010.** Insect growth- and development-disrupting insecticides. In: Gilbert, L.I., Gill, S.S. (Eds.), *Insect Control*. Elsevier, New York, 121-184.
- Ebling, W. 1978.** Urban entomology. University of California, Berkeley.
- Elbert A., Nauen R., 2000.** Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Management Science*. **56**: 60-64.
- Elie M.P., 1998.** Blattes: une vie cachée. *Magazine Québec science*. 40 p.
- Eliyahu, D., Nojima, S., Capracotta, S.S., Comins, D. & Coby, C. 2008.** Identification of cuticular lipids eliciting interspecific courtship in the German cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften*. **95**: 403-412.
- Espelie, K.E., Bamboa, G.J., Grudzien, T.A. & Bura, E.A. 1994.** Cuticular hydrocarbons of the paper wasp *Polistes fuscatus*: a search for recognition pheromones. *Journal of Chemical Ecology*. **20**: 1677-1687.
- Everaerts, Cl., Farine, J.P. & Brossut R. 1997.** Changes of species specific cuticular hydrocarbons profiles in the cockroaches *Nauphoeta cinerea* and *Leucophaea maderae* reared in heterospecific groups. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **85**: 145-150.



- Fan, Y., Zurek, L., Dykstra, M.J. & Schal, C. 2003. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften*. **90**: 121-126.
- Farinós, G.P., Smaghe, G., Tirry, L. & Castañera, P. 1999. Action and Pharmacokinetics of a Novel Insect Growth Regulator, Halofenozide, in Adult Beetles of *Aubeonymus mariaefranciscae* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **41**:201–213.
- Farnesi, L.C., Brito, J.M., Linss, J.G., Pelajo- Machado, M., Valle, D. & Rezande, G.L. 2012. Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. *PLOS ONE*. **7(1)**: 1–9.
- Fathpour, H., Noori, A. & Zeinali, B. 2007. Effects of juvenoids pyriproxyfen on reproductive organ development and reproduction in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Iranian Journal of Science and Technology*. **31(A1)**: 89–98.
- Feyereisen, R. 1985. Regulation of juvenile hormone titer: Synthesis. In Kerkut GA, Gilbert LI (eds): *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press. **7(1)**: 391–429.
- Freeman, M.R., Dobritsa, A., Gaines, P., Segraves, W.A. & Caelson, J.R. 1999. The dare gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*. *Development*. **126**: 4591-4602.
- Frichman, A.M. & Alcamo, I.E. 1977. Domestic cockroaches and human bacterial disease. *Pest Control*, 16-20.
- Gäde, G., 2002. Allatoregulatory peptides—molecules with multiple functions. *Invertebrate Reproduction and Development*. **41**: 127–135.
- Gadenne, C., Grenier, S., Mauchamp, B. & Plantevin, G. 1990. Effects of a juvenile hormone mimetic, fenoxycarb, on post-embryonic development of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hbn. *Experientia*. **46**: 744-747.
- Gadot, M., Chiang, A. S. & Schal, C. 1989. Farnesoic acid-stimulated rates of juvenile-hormone biosynthesis during the gonotrophic cycle in *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*. **35** : 537-547.
- Gadot, M., Chiang, A. S., Burns, E. L. & Schal, C. 1991. Cyclic juvenile-hormone biosynthesis in the cockroach, *Blattella germanica*— effects of ovariectomy and *corpus allatum* denervation. *General and Comparative Endocrinology*. **82**: 163-171.



- Garfield E. 1990.** The cockroach connection-Ancient, seemingly Indestructible Pest. Part 2. Population Control. *Current Comments*, **46**:5-13.
- Gibbs, A.G. 1998.** Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist*. **38**: 471-482.
- Gondhalekar, A.D., & Scharf, M.E. 2012.** Mechanisms underlying fipronil resistance in a multiresistant field strain of the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Medical Entomology*. **49(1)**:122-31.
- Grandcolas, P. 1998.** The evolutionary interplay of social behavior, resource use and anti-predator behavior in Zetoborinae plus Blaberinae plus Gyninae plus Diplopterinae cockroaches: A phylogenetic analysis. *Cladistics*. **14(2)**:117-127.
- Habachi, W., Bensafi, H., Adjami, Y., Ouakid, M.L., Farine, J.P. & Everaerts, C. 2009.** Spinosad affects chemical communication in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Journal of Chemical Ecology*. **35**: 1423-1426.
- Habes, D., Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P. & Soltani N. 2001.** Toxicity of boric acid to *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae) and analysis of residues in several organs. *Medical Faculty of Landbouww. University of Gent*. **66(2a)**: 525-534.
- Habes, D., Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P. & Soltani, N., 2006.** Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alteration in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S- transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **84**: 17-24.
- Habes, D., Messiad, R., Gouasmia, S. & Grib, L. 2013.** Effects of an inorganic insecticide (boric acid) against *Blattella germanica*: Morphometric measurements and biochemical composition of ovaries. *African Journal of Biotechnology*. **12(18)**:2492-2497.
- Hagedorn, H. H., O'Connor, J. D., Fuchs, M. S., Sage, B., Schlaeger, D. A. & Bohm, M. K. 1975.** The ovary as a source of α -ecdysone in an adult mosquito. *Proceeding of the National Academy of Science. USA*. **72** : 3255-3259.
- Hami, M., Taibi, F. & Soltani-Mazouni, N. 2004.** Effects of flucycloxuron, chitin synthesis inhibitor on reproductive events and thickness of chorion in mealworms. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. **69(3)**: 249-255.



- Hami, M., Taibi, F., Smaghe, G. & Soltani-Mazouni, N. 2005.** Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides against the mediterranean flour moth. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent university*. **70(4):** 767.
- Harrop, T.W.R., Sztal, T., Lumb, C., Good, R. T., Daborn, P.J., and al., 2014.** Evolutionary Changes in Gene Expression, Coding Sequence and Copy-Number at the Cyp6g1 Locus Contribute to Resistance to Multiple Insecticides in *Drosophila*. *PLoS ONE*. **9(1):** e84879. doi:10.1371/journal.pone.0084879.
- Haubruge, E & Amichot, M. 1998.** Compréhension des mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les Insectes et les Acariens. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **2 (3):** 161-174.
- Hemingway, J., Field, L. & Vontas, J. 2002.** An overview of insecticide resistance. *Science*. **298:**96-97.
- Herzney, G. & Strohm, E. 2007.** Fighting fungi with physics : food wrapping by a solitary wasp prevents water condensation. *Current Biology*. **17 :** R46-R47.
- Hoelscher, J.A. & Barrett, B.A. 2003.** Effects of methoxyfenozide-treated surfaces on the attractiveness and responsiveness of adult codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*. **96:** 623-628.
- Hoffmann, J. A. 1980.** Ecdysone et reproduction chez les femelles adultes d'insectes. *Reproduction Nutrition Development*. **20:** 443-456.
- Hoffmann, K.H., Meyering-Vos, M. & Lorenz, M.W. 1999.** Allatostatins and allatotropins: is the regulation of corpora allata activity their primary function? *European Journal of Entomology*. **96:** 255-266.
- Holbrook, G.L., Roebuck, J., Moore, C.B., Waldvogel, M.G & Schal, C. 2003.** Origin and extent of resistance to fipronil in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*. **96(5):** 1548-58.
- Howard, R.W. & Blomquist, G.J. 1982.** Chemical ecology and biochemistry of cuticular hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*. **27:** 149-172.
- Howard, R.W. & Blomquist, G.J. 2005.** Ecological, behavioural and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*. **50:** 371-393.
- INRS. 2011.** Institut National de Recherche et Sécurité. Fiche toxicologique : Acide borique.7p.FormatPDF.
www.inrs.fr/default/dms/inrs/FicheToxicologique/TI-FT-138/ft138.pdf.



- Irlés, P., Bellés, X., Piulachs, MD. 2009. *Brownie*, a Gene Involved in Building Complex Respiratory Devices in Insect Eggshells. *PLoS ONE*. **4(12)**: e8353. doi:10.1371/journal.pone.0008353.
- Ishaaya, I. 1990. Benzoylphenyl ureas and other selective control agents -mechanism and application. In: Casida, J. E. (Eds.) *Pesticides and alternatives*. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 365-376.
- Ishaaya, L., 2001. Biochemical sites of insecticide action and resistance. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 293-321.
- Jackson, L.L. & Blomquist, G.J. 1976. In: *Kolattukudy P.E.* (Eds.). *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier North Holland, Amsterdam, 201-233.
- Juarez, M.P. 2004. Fatty acyl-CoA elongation in *Blattella germanica* in tegumental microsomes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **56**: 170-178.
- Kaakeh, W. & Bennett, G.W. 1997. Evaluation of trapping and vacuuming compared with low impact insecticide tractics for managing German cockroaches in residences. *Journal of Economic Entomology*. **90(4)**: 976-982.
- Kaakeh, W., Talukder, F., Aldahmani, J.H., Maraqa, M., Deadman, M.L., Al Jabri, S.A., Al-Sadi, A.M., Al Raesi, A.A., Al Hasani, H., Al Subhi, L. & Bosamrah, A.A. 2007. Assessment of pest and pesticide trends in vegetable crops in the United Arabs Emirates and Sultanate of Oman. *Pakistan journal of scientific and industrial research*. **50**:346-351.
- Kadano-Okuda, K., Kuwano, E., Eto, M. & Yamashita, O. 1987. Inhibitory action of an imidazole compound on ecdysone synthesis in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development Growth and Differentiation*. **29**: 527-533.
- Karlson, P. & Lüscher, M. 1959. Pheromones: A new term for a class of biologically active substances. *Nature*. **183**: 55-56.
- Karr, L.L., Sheets, J.J., King, J.E. & Dripps, J.E. 2004. Laboratory performance and pharmacokinetics of the benzoylphenylurea noviflumuronin eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*. **97**: 593-600.
- Kawada, H., Senbo, S. & Abe, Y. 1992. Effects of pyriproxyfen on the reproduction of the housefly *Musca domestica*, and the German cockroach *Blattella germanica*. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*. **43(3)**: 169-175.



- Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P., Smagghe, G. & Soltani, N. 2009a.** Halofenozide affects sexual behaviour, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Belgian Journal of Zoology*. **139**: 147-155.
- Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P., Smagghe, G. & Soltani, N. 2009b.** Effects of tebufenozide in reproduction of the female German cockroaches: *Blattella germanica*. *Communication in Agriculture and Applied Biological Science, Ghent*. **74** (2): 429-437.
- Kilani-Morakchi, S., Aribi, N. & Soltani, N. 2009c.** Activity of boric acid on German cockroaches: Analysis of residues and effects on reproduction. *African Journal of Biotechnology*. **8** (4): 703-708.
- King, J.E. & Bennett, G.W. 1988.** Mortality and developmental abnormalities induced by two juvenile hormone analogs on nymphal German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*. **81**: 225-227.
- Koehler, P.G., & Patterson, R.S. 1987.** Implications of cockroach infestations to human health. *Infections in Medicine*. **4**: 349-355, 358-359, 393.
- Kozlova, T. & Thummel, C.S. 2000.** Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolisme*. **11**(7):276-80.
- Kugimiya, S., Nishida, R., Kuwahara, Y. & Sakuma, M. 2002.** Phospholipid composition and pheromonal activity of nuptial secretion of the male German cockroach, *Blattella germanica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **104**: 337-344.
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J.T. & Rees, H. 2005.** Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.K. (Eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science*. **3**: 125-195.
- Lee, C.Y., Yap, H.H. & Chong, N.L. 1996.** Comparison of selected biological parameters of laboratory susceptible and field collected strains of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Malaysian Journal of Science*. **17A**: 37 - 48.
- Liang, D. & Schal, C. 1993.** Female calling behaviour of the German cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Insect Behavior*. **6**: 603-614.



- Liang, D. S. & Schal, C. 1994. Neural and hormonal regulation of calling behavior in *Blattella germanica* females. *Journal of Insect Physiology*. **40**: 251-258.
- Limoe, M., Enayati, A.A., Ladonni, H., Vatandoost, H., Baseri, H. & Oshaghi, M.A. 2007. Various mechanisms responsible for permethrin metabolic resistance in seven field collected-strains of the German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) from Iran. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **87**:138-146.
- Lorenz, J., Lenz, M. & Hoffmann, K.H. 1995. Effects of pharmacological agents on ecdysteroid synthesis in vitro in ovaries and abdominal integument from adult crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. **50(C)**:507-513.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. & Ton, J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **24**: 183-193.
- Maiza, A., Kilani-Morakchi, S., Farine, J.P., Smagghe, G., Aribi, N. & Soltani, N. 2004. Reproductive effects in german cockroaches by ecdysteroid agonist RH-0345, juvenile hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences*, Ghent University. **69(3)**:257-266.
- Maïza, A., Aribi, N., Smagghe, G., Kilani-Morakchi, S., Bendjedid, M. & Soltani, N. 2013. Sublethal effects on reproduction and bio-markers by spinosad and indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*. *Bulletin of Insectology*. **66(1)**: 11-20.
- Masner, P., Bowers, S., Kälin, M. & Mühlet, T. 1979. Effects of precocene I on the endocrine regulation of development and reproduction in the role of juvenile hormone. *Physiological Entomology*. **20** : 59-65.
- Mauchamp, B., Malosse, C. & Saroglia, P. 1989. Biological effects and metabolism of fenoxycarb after treatment of the fourth and fifth instars of the tobacco bud worm *Heliothis virescens*. *F. Pesticide Science*. **26**: 283-301.
- Miyamoto, M., Naruo, K.-I., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T. & Kurokawa, T. 1993. Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Molecular and Cellular Biology*. **13**: 4251-4259.
- Morakchi, S., Maïza, A., Farine, J.P., Aribi, N. & Soltani, N. 2005. Effects of a neonicotinoid insecticide (Acetamiprid) on acetylcholinesterase activity and



- cuticular hydrocarbons profile in German cockroach. *Communication in Agriculture and Applied Biological Science, Ghent*. **70(4)**: 843-848.
- Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P. & Soltani, N. 2010.** Analyse des hydrocarbures cuticulaires chez *Blattella germanica* : Effets de divers groupes de pesticides. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat*, N° 47, Tome I, 141-145.
- Mosson, H.J., Short, J. E., Schenker, R. & Edwards, J. P. 1995.** The effect of the insect growth regulator lufenuron on Oriental cockroach, *Blatta orientalis*, and German cockroach, *Blattella germanica*, populations in simulated domestic environments. *Pesticide Science*. **45 (3)**:237-246.
- Mpuchane, S., Matsheka, I.M., Gashe, B.A., Allotey, J., Murindamombe, G. & Mrema, N. 2006.** Microbiological studies of cockroaches from three localities in Gaborone, Botswana. *African Journal of Food & Nutritional Sciences*, 6.
- Muyle, H. & Gordon, R. 1989.** Effects of selected juvenile hormone analogs on sixth-instar larvae of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera: Tortricidae). *Canadian Entomologist*. **121**: 1271-1272.
- Nasirian, H. 2007.** Duration of Fipronil and Imidacloprid Gel Baits Toxicity against *Blattella germanica* Strains of Iran. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases*. **1(2)**: 40-47.
- Nasirian, H. 2010.** An overview of German cockroach, *Blattella germanica*, studies conducted in Iran. *Asian Network for Scientific Information*. **13(22)**: 1077-1084.
- Nauen, R., Elbert, A., McCaffery, A., Slater, R., Sparks, T.C., IRAC. 2012.** Insecticide resistance, and mode of action classification of insecticides, *In*: W. Krämer, U. Schirmer, P. Jeschke, M. Witschel (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*, second ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 935-955.
- Nejati, J., Keyhani, A., Moosa-Kazemi, S.H., Mohammadi, M., Mahjoob, M. & Boostan-Bakhsh, A. 2012.** Cockroaches' bacterial infections in wards of hospitals, Hamedan city. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **2(5)**: 381-384.



- Nelson, D.R. & Blomquist, G.J. 1995.** Insect waxes. In: R.J. Hamilton (Eds.), *Waxes : Chemistry, Molecular Biology, and Function*. Dundee, Scotland, The Oily Press, England, 1-90.
- Nicholson, G.M. 2007.** Fighting the global pest problem: preface to the special *Toxicon* issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*. **49 (4)**: 413-422.
- Nishida, R., Fukami, H. & Ishii, S. 1974.** Sex pheromone of the German cockroach *Blattella germanica* (L.) responsible for male wing-raising: 3,11-dimethyl-2-nonacosane. *Experientia*. **30**: 978-979.
- Niven, J.E., Graham, C.M. & Burrows, M. 2008.** Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. *Annual Review of Entomology*. **53**: 253-271.
- Nojima, S., Nishida, R., Kuwahara, Y. & Sakuma, M. 1999a.** Nuptial feeding stimulants: a male courtship pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Naturwissenschaften*. **86**: 193-196.
- Nojima, S., Sakuma, M., Nishida, R. & Kuwahara, Y. 1999b.** A glandular gift in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): the courtship feeding of a female on secretion from male tergal glands. *Journal of Insect Behavior*. **12**: 627-640.
- Nojima, S., Kugimiya, S., Nishida, R., Sakuma, M. & Kuwahara, Y. 2002.** Oligosaccharide composition and pheromonal activity of male tergal gland secretions of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Journal of Chemical Ecology*. **28**: 1483-1494.
- Nojima, S., Schal, C., Webster, F.X., Santangelo, R.G. & Roelofs, W.L. 2005.** Identification of sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Science*. **307**: 1104-1106.
- Odegaard, F. 2000.** How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. *Biological Journal of Linnean Society*. **71**: 583-597.
- OMS. 2011.** Organisation mondiale de la santé, *Santé 2020*, à paraître, OMS, Genève.
- Parlak, O., Sakurai, S., Kaya, M. & Ohtaki, T. 1992.** Content and possible role of ecdysteroids in the larval ovary of the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebrate Reproduction and Development*. **21**: 1-6.
- Pascual, N., Cerda, X., Benito, B., Tomas, J., Piulachs, M.D. & Belles, X. 1992.** Ovarian ecdysteroid levels and basal oocyte development during



- maturation in the cockroach *Blattella germanica* (L.). *Journal of Insect Physiology* **38**(5): 339-348.
- Pener, M. P & Dhadialla, T. S. 2012.** An Overview of Insect Growth Disruptors; Applied Aspects. *Advances in Insect Physiology*. **43**: 1-162.
- Philogène, B. J. R., Regnault-Roger, C. & Vincent, C. 2002.** Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale : promesses d'hier et d'aujourd'hui. Biopesticides d'origine végétale (C. Regnault-Roger, P. B.J.R. and C. Vincent). *Paris, Lavoisier* pp. 1-17.
- Pineda, S., Schneider, M.I., Smagghe, G., Martínez, A.M., Del Estal, P., Viñuela, E., Valles, J. & Budia, F. 2007.** Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. **100**(3): 773-780.
- Pineda, S., Martínez, A.M., Figueroa, J.I., Schneider, M.I., Del Estal, P., Viñuela, E., Gómez, B., Smagghe, G., Valle, J. & Budia, F. 2009.** Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. **102**: 1490-1496.
- Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E. Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G.J. & Feyereisen, R. 2012.** An insect-specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Science of the States of America* (PNAS). **109**: 1458-63.
- Quennedy, A., Aribi, N., Everaerts, C. & Delbecq, J .P. 1995.** Post embryonic development of *Zophoba atratus*. (Coleoptera : Tenebrionidae) under crowded or isolated condition and effects of juvenile hormone analogue application. *Journal of Insect Physiology*. **41**(2): 143-152.
- Raikhel, A.S. & Dhadialla, T.S. 1992.** Mechanism of yolk protein accumulation in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*. **37**:217-251.
- Ramade, F. 2011.** *Introduction à l'écochimie*. Les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. DOC T. &. (Ed.)Paris: Lavoisier ISBN.
- Reed, J.R., Quilici, D.R., Blomquist, G.J. & Reitz, R.C. 1995.** Proposed mechanism for cytochrome-P450 catalyzed conversion of aldehydes to hydrocarbons in the housefly, *Musca domestica*. *Biochemistry*. **34**: 26221-26227.
- Reierson, D. A., Rust, M. K., VanDyke, A. M. & Appel, A. G. 1983.** Control of German cockroaches with amidinohydrazone bait, *In*: A. C. York (Eds.),



- Insecticide and acaricide tests, vol. 8. Entomological Society of America, College Park, MD, USA, p. 54.
- Reid, B.L., Bannett, G.W. & Barcay, S.J. 1990.** Topical and oral toxicity of sulfluramid, a delayed-action insecticide, against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*. **83**: 148-152.
- Rivault, C., Cloarec, A., Mathieu, N. & Blane, N. 1993.** Bacterial contamination of food by cockroaches. *Journal of Environmental Health*. **55**: 21-22.
- Rivault, C., Cloarec A., Mathieu N. & Blane N. 1994.** Les blattes : un animal de ville à toutes saisons. *Annales de la Recherche Urbaine*. **61**: 33 - 38.
- Rivault, C., Cloarec, A. & Sreng, L. 1998.** Cuticular extracts inducing aggregation in the German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). *Journal of Insect Physiology*. **44** : 909-918.
- Rivault, C., Cloarec, A. & Sreng, L. 2002.** Are differences in hydrocarbon profiles able to mediate strain recognition in German cockroach (Dictyoptera : Blattellidae) ? *European Journal of Entomology*. **99**: 437-444.
- Rodríguez-Enríquez, C.L., Pined, A.S., Figueroa, F.I., Schneider, M.I. & Martínez, A.M. 2010.** Toxicity and sublethal effects of methoxyfenozide on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. **103(3)**: 662-667.
- Ross, M.H. & Cochran, D.G. 1990.** Response of late-instar *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) to dietary insect growth regulators. *Journal of Economic Entomology*. **83(6)**:2295-305.
- Roth, L.M. & Willis, E.R. 1952.** A study of cockroach behaviour. *American Midland Naturalist*. **47** : 66-129.
- Roth, L.M. & Willis, R. 1960.** The Biotic Association of cockroaches. Baltimore : *The Lord Baltimore Press*.
- Roth, L.M. 1970a.** Evolution and taxonomic significance of reproduction in Blattaria. *Annual Review of Entomology*. **15**: 75 - 96.
- Rubenstein, E.C., Kelly, T.J., Schwartz, M.B. & Woods, C.W. 1982.** *In vitro* synthesis and secretion of ecdysteroids by *Drosophila melanogaster* ovaries. *Journal of Experimental Zoology*. **223**: 305-309.



- Saïd, I., Costagliola, G., Leoncini, I. & Rivault, C. 2005. Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta, Dictyoptera). *J. Insect. Physiol.*, 51(9), 995-1003. and establishment of reproductive dominance in a polistine wasp. *Journal of Insect Physiology*. **50**: 73-83.
- Salgado, V.L. 1998. Block of neuronal voltage-dependent K⁺ channels by diacylhydrazine insecticides. *Neurotoxicology*. **19**(2): 245-252.
- Saltzman, K.A., Saltzman, K.D., Neal, J.J., Scharf, M.E. & Bennett, G.W. 2006. Effects of the juvenile hormone analog pyriproxyfen on German cockroach, *Blattella germanica* (L.), tergal gland development and production of tergal gland secretion protein. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **63**(1): 15-23.
- Satyanarayana, K., Yu, J. H., Bhaskaran, G., Dahm, K. H. & Meola, R. 1992. Regulation of vitellogenin synthesis by juvenile hormone in the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Invertebrate Reproduction and Development*. **21**: 169-178.
- Satyanarayana, K., Bradfield, J. Y., Bhaskaran, G. & Dahm, K. H. 1994. Stimulation of vitellogenin production by methoprene in prepupae and pupae of *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochemistry and Physiology*. **25**: 21-37.
- Schal, C. & Chiang, A.S. 1995. Hormonal control of sexual receptivity in cockroaches. *Experientia*. **51** (9-10): 994-998.
- Schal, C., Holbrook, G.L., Bachmann, J.A.S. & Sevala, V.L. 1997. Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica*: juvenile hormone as a pleiotropic master regulator. *Archives in Insect Biochemistry and Physiology*, **35**: 405-426.
- Scharrer, B. 1987. Insects as models in neuroendocrine research. *Annual Review of Entomology*. **32**:1-16.
- Schenher, R. & Moyses, E.W. 1994. Effect of the chitin synthesis inhibitor lufenuron on the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases*.
- Schneider, M.I., Smagghe, G., Gobbi, A. & Viñuela, E. 2003. Toxicity and pharmacokinetics of insect growth regulators and other novel insecticides on pupae of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of early larval instars of lepidopteran pests. *Journal of Economic Entomology*. **96**(4): 1054-1065.



- Schneider, M.I., Smagghe, G., Pineda, S. & Viñuela, E. 2004. Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on life history parameters and absorption in third-instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biological Control*. **31**: 189–198.
- Seth, R.K., Kaur, J.J., Rao, D.K. & Reynolds, S.E. 2004. Effects of larval exposure to sublethal concentrations of the ecdysteroid agonist RH-5849 and tebufenozide (RH-5992) on male reproductive physiology in *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology*. **50(6)**: 505–517.
- Sevala, V., Shu, S.Q., Ramaswamy, S.B. & Schal, C. 1999. Lipophorin of female *Blattella germanica* (L.): characterization and relation to hemolymph titers of juvenile hormone and hydrocarbons. *Journal of Insect Physiology*. **45**: 431–441.
- Shafeek, A., Jaya Prasanthi, R.P., Hariprasad, Reddy, G., Chetty, C.S. & Rajarami Reddy, G., 2004. Alterations in acetylcholinesterase and electrical activity in the nervous system of cockroach exposed to the neem derivative, azadirachtin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **59**: 205–208.
- Sheets, J.J., Karr, L.L. & Dripps, J.E. 2000. Kinetics of uptake, clearance, transfer, and metabolism of hexaflumuron by eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*. **93**: 871–877.
- Smagghe, G. & Degheele, D. 1992. Effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist, RH-5849 on reproduction of *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitica*. **48**: 23–29.
- Smagghe, G. & Degheele, D. 1994. Action of a novel nonsteroidal ecdysone mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. *Pesticide Science*. **42**: 85–92.
- Smagghe, G., Jacas, J.A., Delestel, P., Viñuela, E. & Degheele, D. 1996. Tebufenozide: effects of a nonsteroidal ecdysone agonist in the oriental cockroach *Blattella orientalis*. *Parasitica*. **52(2)**: 53–59.
- Smagghe, G., Bylemans, D., Medina, P., Budia, F., Avila, J. & Viñuela, E. 2004. Tebufenozide distorted larval growth and reproduction in codling moth, and controlled field populations. *Annals of Applied Biology*, **145**: 291–298.
- Soltani, N., Chebira, S., Delbecq, J.P. & Delachambre, J. 1993. Biological activity of flucycloxon, a novel benzoylphenyl urea derivative on *Tenebrio molitor* comparison with diflubenzuron and triflumuron. *Experientia*. **49**: 1088–1091.



- Soltani, N., Soltani-Mazouni, N. & Delachambre, J. 1996.** Evaluation of triflumuron, a benzoylphenyl urea derivative, on *Tenebrio molitor* pupae (Col., Tenebrionidae): effects on cuticle. *Journal of Applied Entomology*. **120**: 627-629.
- Soltani-Mazouni, N, Taibi, F, Berghiche, H, Smagghe, G. & Soltani, N. 2001.** RH-0345 restored partly the effect induced by KK-42 on reproductive event in mealworms. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences. Ghent University*. **66(2a)**: 437-444.
- Soltani-Mazouni, N., Hami, M. & Gramdi, H. 2012.** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction and Development*. **56(2)**: 157-163.
- Stay, B., 2000.** A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharrer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **30** : 653-662.
- Sun, X., Barret, B.A. & Biddinger, D.J. 2000.** Fecundity and fertility reductions in adult leafrollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonists tebufenozide and methoxyfenozide. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **94**: 75-78.
- Sun, X., Song, Q. & Barrett, B. 2003.** Effect of ecdysone agonist on vitellogenesis and the expression of EcR and USP in codling moth (*Cydia pomonella*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **52**: 115-129.
- Taibi, F., Smagghe, G., Amrani, L. & Soltani- Mazouni, N. 2003.** Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **135**: 257-267.
- Tine, S., Aribi, N. & Soltani, N. 2011.** Laboratory evaluation of azadiractin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *African Journal of Biotechnology*. **10(85)**:19816-19824.
- Tobe, S.S., Ruegg, R.P., Stay, B.A., Baker, F.C., Miller, C.A. & Schooley, D.A. 1985.** Juvenile hormone titre and regulation in the cockroach *Diploptera punctata*. *Experientia*. **41**:1028-1034.
- Tomé, H.V.V., Martins, J.C., Corrêa, A.S., Galdino, T.V.S., Picanço M.C. & Guedes, R.N.C. 2013.** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomatoleafminer *Tuta absoluta*. *Crop Protection*. **46**: 63-69.



- Tomizawa, M., Casida, J.E. 2003.** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*. **48**: 339-364.
- Tomlin, C.D.S. 2000.** The pesticide manual, 12thedn. British Crop Protection Council Publications.
- Treiblmayr, K., Pascual, N., Piulachs, M., Keller, T. & Belles, X. 2006.** Juvenile hormone titer versus juvenile hormone synthesis in female nymphs and adults of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Journal of Insect Science*, **6**: 1-7.
- Tsuji, H. & Taneike, Y. 1988.** Insecticidal effect of diflubenzuron against cockroaches. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*. **39**: 19-25.
- Tunaz, H. & Uygun, N. 2004.** Insect growth regulators for insect pest control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. **28**: 377-387.
- Uzsak, A. & Schal, C. 2012.** Differential physiological responses of the German cockroach to social interactions during the ovarian cycle. *Journal of Experimental Biology*. **215**: 3037-3044.
- Wei, H.Y., Suang, Y.P. & Du, J.W. 2004.** Sex pheromone communication of tobacco cutworm moths survived after treating the larvae with selected insecticide. *Journal of Chemical Ecology*. **30**: 1457-1466.
- Wenn, Z & Scott, J.G. 1997.** Cross-Resistance to Imidacloprid in Strains of German Cockroach (*Blattella germanica*) and House Fly (*Musca domestica*). *Pesticide Science*. **45(4)**: 367-371.
- Wertheim, B., Van Baalen, E.J.A., Dicke, M. & Vet, L.E.M. 2005.** Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: an evolutionary ecological perspective. *Annual Review of Entomology*. **50**: 321-326.
- Whittaker, R.H. & Feeny, P.P. 1970.** Allelochemicals: chemical interactions between plants. *Science*. **171**: 757-770.
- WHO. 2006.** Water sanitation health, Chapter five Cockroaches [Document électronique]. Pp 288-281. Format PDF. Disponible sur [http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/vector288 to301.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/vector288%20to301.pdf).



- Wigglesworth, V.B. 1936.** The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius proxilus* (Hemiptera). *Quarterly Journal of Microscopical Science*. **79**: 91-121.
- Willis, E.R., Riser, G.R. & Roth, L.M. 1985.** Observation on reproduction and development in cockroaches. *Annals of the Entomological Society of America*. **51**: 53-59.
- Wing, K. D., Slawecki, R. A. & Carlson, G. R. 1988.** RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist : effects on larval Lepidoptera. *Science*. **241**: 470-472.
- Wing, K.D., Sacher, M., Kagaya, Y., Tsurubuchi, Y., Mulderig, L., Connair, M & Schnee, M. 2000.** Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Crop Protection*. **19**: 537-545.
- Wyatt, T.D. 2003.** Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge.
- Zhang, F., Wang, X. J., Huang, Y. H., Zhao, Z. G., Zhang, S. S., Gong, X. S., Xie, L., Kang, D. M., and Jing, X. 2014.** Differential expression of hemolymph proteins between susceptible and insecticide-resistant *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *Environmental Entomology*. **43(4)**: 1117-1123.
- Zhoo, H., Du, J. & Huang, Y. 2005.** Effects of sublethal doses of malathion on responses to sex pheromones by male Asian corn borer moths, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Journal of Chemical Ecology*. **31**: 1645-1656.

ANNEXES

Production scientifique :

I/ Publication Internationale:

S. Kilani-Morakchi, **A. Badi**, N. Aribi, J.P. Farine & N. Soltani. 2014. Toxicity of tebufenozide, an ecdysteroid agonist, to *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *African Entomology*. **22(2)**: 337–342.

II/Communications Internationales :

- 1- **BADI A.**, KILANI-MORAKCHI S et ARIBI N. 2012. Effets sublétaux d'un régulateur de croissance des insectes, le tébufénozide sur le comportement sexuel de *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae). Les 3^{èmes} journées scientifiques de l'Association Tunisienne de Toxicologie, Tabarka, 03-05 Février 2012.
- 2- KILANI-MORAKCHI S., **BADI A** et ARIBI N. 2012. Effets du tébufénozide chez *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae): comportement sexuel et potentiel reproducteur. 3^{ème} congrès Franco-Maghrébin de Zoologie et d'Ichtyologie, Marrakech 6-10 Novembre 2012.
- 3- KILANI-MORAKCHI S., **BADI A** et ARIBI N. 2014. Effets du tébufénozide sur la reproduction et le comportement sexuel d'une espèce à intérêt médical, *Blattella germanica*. 8^{ème} Conférence Internationale Francophone d'Entomologie. CIFE VIII- Hammamet, Tunisie. 23-27 juin 2014.
- 4- KILANI-MORAKCHI S., **BADI A** et ARIBI N. 2014. Activity of tebufenozide on sexuel behavior and cuticular hydrocarbons of the *German cockroach*. Seventh International Symposium on Molecular Insect Science. NH Grand Krasnapolsky, Amsterdam, The Netherlands. 13-16 July 2014.

Toxicity of tebufenozide, an ecdysteroid agonist, to *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae)

S. Kilani-Morakchi¹, A. Badi¹, N. Aribi¹, J.P. Farine² & N. Soltani^{1*}

¹Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Baâji Mokhtar Annaba, 23000-Annaba, Algeria

²Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS UMR 6265, INRA UMR 1324, UB, Faculté des Sciences, 6 Bd Gabriel, Université de Bourgogne, 21000-Dijon, France

The toxicity of the non-steroidal ecdysteroid agonist tebufenozide was evaluated topically on adults of the cosmopolitan cockroach *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). The LD₅₀ value was estimated at 402 µg/g of insect (range, 95% fiducial limits: 293–552) at 15 days after treatment. The effects on reproduction were observed in adult females of cockroaches that survived exposure to a LD₂₅ (146 µg/g of insect) of tebufenozide. Dissection of treated females showed a clear reduction in both the number of oocytes per paired ovaries and the size of basal oocytes, as compared to controls. In addition, tebufenozide significantly reduced the mating success of pairs and altered the fertility as shown through the reduction of ootheca development and total absence of viable nymphs. Tebufenozide disrupted the German cockroach reproduction by interfering with the homeostasis of the insect hormones.

Key words: *Blattella germanica*, tebufenozide, toxicity, reproduction.

INTRODUCTION

The German cockroach, *Blattella germanica*, is a serious pest worldwide due to its high reproductive potential (Willis *et al.* 1985) and its ability to build up large infectious populations (Nejati *et al.* 2012). Neurotoxic insecticides, such as organophosphates (OP), carbamates and pyrethroids are commonly used to control cockroach infestations (Appel 1990) but these compounds have led to the development of insect resistance (Nasirian 2010). The relative fewer effects of ecdysone agonists on non-target organisms and their favourable environmental fate make them potential attractive insecticides for integrated pest management (IPM) programmes (Schneider *et al.* 2003, 2004; Dhadialla *et al.* 2005; Jenkins & Isaacs 2007; Chapman *et al.* 2009; Smaghe *et al.* 2012). Recently, due to environmental considerations, insect growth regulators (IGRs) are used worldwide to control German cockroach and other insect pests (Saltzman *et al.* 2006; Fathpour *et al.* 2007; Soltani-Mazouni *et al.* 2012; Farnesi *et al.* 2012; Amira *et al.* 2013).

Tebufenozide and other ecdysteroid agonists belong to MAC compounds (moulting accelerating compounds). This class of chemicals mimics the biological function of the natural insect moulting hormone 20-hydroxyecdysone (20E) and acts *via*

interaction with ecdysteroid receptor (Dhadialla *et al.* 2005; Fahrbach *et al.* 2012). In insects, the steroid moulting hormone 20E, and the sesquiterpenoid, juvenile hormone (JH), play a central role in the regulation of the growth and development as well as of the reproductive processes, and have been considered as potential specific target sites for pest control (Lafont *et al.* 2005; Dhadialla *et al.* 2010).

Tebufenozide, and its related compounds such as halofenozide and methoxyfenozide, are known to affect the reproduction of different insect orders, mainly by reducing sexual behaviour, fecundity and egg viability (Krupke *et al.* 2002; Taïbi *et al.* 2003; Pineda *et al.* 2007; Barrett 2008; Kilani-Morakchi *et al.* 2009; Rodríguez Enríquez *et al.* 2010; Soltani-Mazouni *et al.* 2012). Reproduction in German cockroaches is regulated mainly by JH; the JH biosynthetic rate increases after eclosion, stimulating vitellogenesis and its uptake by oocytes, declines through ovulation and remains low during gestation (Bellés *et al.* 1987). JH also stimulates the production and release of sex pheromones and controls the expression of sexual receptivity in the female (Schal & Ching 1995). Ovarian ecdysteroids include control of meiotic reinitiation, supply of a source of ecdysteroids to embryo and inhibition of juvenile hormone

*Author for correspondence.
E-mail: noureddine.soltani@univ-annaba.dz

production (Lafont *et al.* 2005). In *B. germanica* the ovarian and haemolymphatic ecdysteroid titre is low in freshly ecdysed females, increase during vitellogenesis to peak at choriogenesis, and decrease after ovulation suggesting the implication of ecdysteroids in the control of choriogenesis (Pascual *et al.* 1992).

The juvenoids and chitin synthesis inhibitors are two classes of IGRs that have received the most attention for useful chemicals to manage German cockroaches (Tsuji & Taneike 1988; King & Bennett 1988; Fathpour *et al.* 2007).

In order to extend our previous findings (Kilani-Morakchi *et al.* 2009), the purpose of this study was to test an ecdysteroid agonist on reproduction of *B. germanica*. We first determined the insecticidal potency of tebufenozide applied topically on adults of both sexes. In addition to the short-term activity, the long-term effects of the insecticide were investigated on reproduction. Here, the number of oocytes per paired ovaries and the length of basal oocytes were measured. The number of oocytes is considered as an indicator of reproductive capacity (Kilani-Morakchi *et al.* 2009; Maiza *et al.* 2013), while the length of the basal oocyte is a reliable measure to the female's reproductive stage because its correlation with JH biosynthesis and JH concentration (Gadot *et al.* 1989; Sevala *et al.* 1999; Treiblmayr *et al.* 2006). Finally, the reproductive success of pairs was evaluated by the percentage of mating, percentage of ootheca formation and the number of viable nymphs produced by each ootheca, respectively.

MATERIAL AND METHODS

Insect rearing

Colonies of *B. germanica* were reared in plastic boxes with dog food pellets and water *ad libitum*. Cockroaches were kept at 27 ± 1 °C under a 12D:12L (h) photoperiod and 70 % relative humidity (Habes *et al.* 2006). Newly emerged adults of both sexes were separated daily from colonies.

Insecticide and treatment of adults

Tebufenozide of technical grade (supplied by G. Smagghe, Ghent University, Belgium) was dissolved in acetone and topically applied onto the sternites ($3 \mu\text{l}$ per insect) of newly emerged adults as described previously by Kawada *et al.* (1992) and Maiza *et al.* (2013). Control insects were treated with acetone alone. Five doses (13, 133, 266,

666 and 1000 $\mu\text{g/g}$ of insect) previously selected after a screening, were tested (three replicates of 10 insects of both sexes). The mortality of the cockroaches was checked daily during 15 days. In the absence of significant differences in mortality between males and females, based upon overlap of 95 % confidence limits, data were pooled. The mortality percentages were corrected in accordance with Abbott (1925). The LD₅₀ and LD₂₅ (doses causing mortality in 50 % and 25 % of the treated insects, respectively) were determined together with the corresponding 95 % fiducial limits (95 % FL) and the Hill slope.

Ovarian measurements

Newly emerged females (<3 h after adult emergence) were topically treated using LD₂₅ of tebufenozide. The females were isolated from males (Pascual *et al.* 1992) in a plastic box (9.5 cm × 6.5 cm × 2 cm) containing food and water. Adult females from control and treated series were sampled at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 days after moulting, respectively, were ice-anaesthetized and their ovaries dissected out. After removal of circumovarian fat body, the numbers of oocytes per paired ovaries and the length of the basal oocyte were determined. The length of three basal oocytes in each ovary were averaged for each female and represented as a single replicate. Fifteen biological repeats were done for each series.

Mating and reproductive success

Each 15-day-old virgin female (control or LD₂₅ treated) was tested in experimental boxes (19 cm × 13 cm × 4 cm) with untreated male of the same age (15 days old). The percentage of mating was recorded by direct observation at 30 min intervals, night and day, during 24 hours until mating occurred. This interval between observations was chosen because mating lasts more than 45 min (Lihoreau *et al.* 2008). The percentage of ootheca formation and the number of viable nymphs hatching from each ootheca (fertility) were recorded. Twenty replicates were done for each experiment.

Statistical analyses

Results are represented as the mean \pm S.E.M. Binomial tests were used to compare the obtained percentages of mating and ootheca production. The effect of treatment on the ovarian parameters and fertility was assessed using Student's *t*-tests at $P < 0.05$. The percentages of mortality were

Table 1. Lethal and sublethal doses of tebufenozide when the compound was topically applied on newly moulted adults of *Blattella germanica*. The data are expressed as lethal LD₅₀ and sublethal LD₂₅ doses together with the corresponding 95 % fiducial limits (95 % FL) determined 15 days following treatment.

Time (days)	LD ₅₀ (95 % FL) (µg/g insect)	LD ₂₅ (95 % FL) (µg/g insect)	Hill slope (95 % FL)
15	402 (293–552)	146 (85–250)	1.08 (0.62–1.54)

analysed using non-linear sigmoid curve fitting. The activity of each treatment was evaluated on the basis of dose-response concentrations and the goodness of fit to the curve model was evaluated on the basis of R² values (Sadeghi *et al.* 2009). All statistical analyses were performed using GraphPad prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, U.S.A., www.Graphpad.com).

RESULTS

Insecticidal activity of tebufenozide on adults

After treatment of the newly emerged adults using various doses of tebufenozide (13 to 1000 µg/g of insect), treated adults typically showed symptoms of poisoning by inhibition of the insect locomotor activity followed by paralysis and death. Our data revealed that the mortality varied from 6.66 ± 0.9 % at a dose of 13 µg/g of insect to 77.6 ± 1.47 % at a dose of 1000 µg/g of insect. No mortality was recorded in the control series. The LD₅₀ and LD₂₅ values (95% fiducial limits, R² = 0.98) are given in Table 1.

Ovarian measurements

In virgin control females, the length of the basal oocytes increased (*P* < 0.001) during sexual maturation from 0.71 ± 0.02 mm at day 0 to 2.70 ± 0.08 mm at day 10 and decreased (*P* < 0.001) thereafter (Table 2). Topical treatment of tebufenozide (LD₂₅) on newly emerged females reduced significantly (*P* < 0.001) the basal oocyte length at all tested ages.

In control females, the number of oocytes per paired ovaries increased by day 2 (*P* < 0.001) and decreased (*P* < 0.001) between 4 and 8 days (Table 3). This reduction typically corresponds to the egg-laying period. After day 8, during the post-oviposition period, this number remained constant (*P* > 0.05). In treated females, the numbers of oocytes per paired ovaries was significantly reduced by day 2 (*P* < 0.001), day 4 (*P* < 0.001) and day 6 (*P* = 0.019), while an increase (*P* < 0.05) was

Table 2. Effect of tebufenozide (LD₂₅), applied topically on newly ecdysed female adults of *Blattella germanica*, on the length (mm) of basal oocyte. Value are the mean ± S.E.M. (*n* = 15). Different letters indicate a significant difference.

Ages (days following adult emergence)	Controls	Tebufenozide (LD ₂₅)
0	0.71 ± 0.02 a	–
2	0.84 ± 0.02 ab	0.72 ± 0.01 ba
4	1.23 ± 0.06 ac	0.90 ± 0.03 bb
6	1.56 ± 0.04 ad	1.32 ± 0.05 bc
8	1.99 ± 0.07 ae	1.11 ± 0.09 bd
10	2.70 ± 0.07 af	1.20 ± 0.08 be
12	2.33 ± 0.04 ag	1.05 ± 0.04 be
14	1.91 ± 0.04 ah	1.14 ± 0.05 be
16	1.62 ± 0.02 ai	1.16 ± 0.03 be

Table 3. Effect of tebufenozide (LD₂₅), applied topically on newly ecdysed female adults of *Blattella germanica*, on the numbers of oocytes per paired ovaries. Value are the mean ± S.E.M. (*n* = 15). Different letters indicate a significant difference.

Ages (days following adult emergence)	Controls	Tebufenozide (LD ₂₅)
0	54.06 ± 1.35 a	–
2	74.06 ± 0.90 ab	35.06 ± 1.33 ba
4	51.06 ± 0.81 ac	39.13 ± 1.22 bb
6	49.33 ± 1.04 ac	43.60 ± 2.07 bb
8	35.93 ± 2.53 ad	43.66 ± 1.01 bb
10	35.86 ± 2.24 ad	43.00 ± 2.15 bb
12	36.33 ± 1.56 ad	43.53 ± 1.14 bb
14	35.26 ± 0.77 ad	42.20 ± 0.85 bb
16	35.46 ± 1.36 ad	42.73 ± 1.23 bb

recorded between 8 and 16 days as compared to the control.

Mating and reproductive success

In controls, the percentage mating success was 90 %, against 25 % in tebufenozide-treated series (binomial test, *P* < 0.001). Ootheca formation was observed in 90 % of tested insects in the controls

series and only in 20 % in treated one (binomial test, $P < 0.001$). The total number of viable nymphs produced by females which estimate the reproductive success of mates was 31.28 ± 1.85 in the controls series. Tebufenozide altered the fertility with total absence of viable nymphs produced by ootheca (0 viable nymphs, $P < 0.001$).

DISCUSSION

Cockroaches treated with tebufenozide showed an inhibition of its locomotor activity followed by paralysis and death. It has been reported that tebufenozide and RH-5849 (1-tert-butyl-1,2-dibenzoyl hydrazine, the prototype of ecdysteroid agonists), in addition to their ecdysonergic effects, could produce excitatory neurotoxic symptoms at the level of the central nervous system in various insect species (Darvas *et al.* 1992; Smagghe & Degheele 1994). In cockroaches, Smagghe *et al.* (1996) reported that nymphs of *Blatta orientalis* displayed rapid neurotoxic effects with hyperactivity and locomotory disturbances after tebufenozide injection. These symptoms of poisoning can be explained by the neurotoxic activity of tebufenozide by blockage of neuronal voltage-dependent K^+ channels in muscle and nerves (Salgado 1998). On the insecticidal potency, the studied compound showed a lower potency against German cockroaches as its LD_{50} was $402 \mu\text{g/g}$ of insect. Tebufenozide is less toxic than other insecticides used in IPM and anti-resistance programmes like spinosad ($5 \mu\text{g/g}$ of insect) and indoxacarb ($0.6 \mu\text{g/g}$ of insect) (Maiza *et al.* 2013).

In *B. germanica* the brain integrates a multitude of extrinsic and intrinsic stimuli and paces the activity of corpora allata (CA), dictating the rate and magnitude of all JH-dependent events (Liang & Schal 1993). Moreover, the size of basal oocytes is an indirect indicator of the female's JH biosynthesis rate (Uzsák & Schal 2012). The major function of ovarian ecdysteroid peaks, in this species, is the initiating of the choriogenesis in the follicle cells at the end of the maturation cycle (Pascual *et al.* 1992).

In the present study, we demonstrated that tebufenozide reduced significantly the length of basal oocyte and the number of oocytes in virgin adult females of *B. germanica*. Tebufenozide disrupted oviposition as shown by the stable values of number of oocytes in the treated series during sexual maturation as compared to controls. The

ecdysone agonists were reported to alter the reproduction events in different insect orders by affecting ovarian growth, vitellogenesis and oviposition (Taibi *et al.* 2003; Smagghe *et al.* 2004; Soltani-Mazouni *et al.* 2012).

Moreover, tebufenozide reduced significantly the mating success and caused alteration in the fertility as demonstrated by the reduction of ootheca production and the absence of viable nymphs in treated series. In *B. germanica* females the oocyte size could be used to pinpoint a minimal threshold of JH production below which females would refuse to mate (Liang & Schal 1993). Most virgin *B. germanica* females accept males when their oocytes are >1.25 mm in length (Schal *et al.* 1997; Uzsák & Schal 2012). Our data show that a topical application of tebufenozide reduced significantly the oocyte length and the values recorded were low as compared to these minima.

Previous reports using tebufenozide, halofenozide or methoxyfenozide demonstrated a reduction of mating success, fecundity, fertility and egg hatchability of different insect species (Smagghe & Degheele 1992; Taibi *et al.* 2003; Dallaire *et al.* 2004; Seth *et al.* 2004; Pineda *et al.* 2007; Soltani-Mazouni *et al.* 2012). In an earlier study, we found that halofenozide reduced the number of oocytes per paired ovaries, volume of basal oocytes, ecdysteroids titres and altered the sexual behaviour in *B. germanica* (Kilani-Morakchi *et al.* 2009). Moreover, Dhadialla *et al.* (2005) reported that any interference in the ecdysteroid hormone response using an ecdysteroid agonist would result in abnormal oocyte growth, egg formation and embryogenesis, which may lead to a loss of progeny.

In newly emerged females, the ecdysteroid titre is relatively low, coinciding with the beginning of the ovarian cycle. Thus, tebufenozide applied on newly emerged females could disrupt the balance between 20E and JH levels modifying the rate of both hormones. This hypothesis is supported by the reduction in the oocyte length, an indirect indicator of JH level, after tebufenozide treatment. This endocrine disruption could explain the depressive effects of tebufenozide on reproductive events in *B. germanica*.

In conclusion, the present study showed that tebufenozide affected the reproduction of the German cockroach. The overall results suggested that tebufenozide can be used as a biorational insecticide for controlling cockroaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully thank G. Smagghe (Laboratory of Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent

University, Ghent, Belgium) for providing tebufenozide. This work was supported by the National Fund for Scientific Research to N. Soltani and CNEPRU and PNR projects to N. Aribi.

REFERENCES

- ABBOTT, W.B. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**: 265–267.
- AMIRA, K., BOUDJELIDA, H. & FARINE, J.P. 2013. Effect of an insect growth regulator (halofenozide) on the cuticular hydrocarbons of *Culex pipiens* larvae. *African Entomology* **21**(2): 343–348.
- APPEL, A.G. 1990. Laboratory and field performance of consumer bait products for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control. *Journal of Economic Entomology* **83**(1): 153–159.
- BARRETT, B.A. 2008. Assessment of methoxyfenozide exposure on the sexual attractiveness and responsiveness of adult codling moth, *Cydia pomonella* L., in small orchard blocks. *Pest Management Science* **64**: 916–922.
- BELLÉS, X., CASAS, J., MESSEGUER, A. & PIULACHS, M.D. 1987. *In vitro* biosynthesis of JH III by the corpora allata of adult females of *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochemistry* **17**: 1007–1010.
- CHAPMAN, A., KUHAR, T.P., SCHULTZ, P.B., LESLIE, T., FLEISCHER, S., DIVELY, G. & WHALEN, J. 2009. Integrating chemical and biological control of European corn borer in bell pepper. *Journal of Economic Entomology* **102**(1): 287–295.
- DALLAIRE, R., LABRECQUE, A., MARCOTTE, M., BAUCE, E. & DELISLE, J. 2004. The sublethal effects of tebufenozide on the precopulatory and copulatory activities of *Christoneura fumiferana* and *C. rosaceana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **112**(3): 169–181.
- DARVAS, B., POLGAR, L., TAG EL-DIN, M.H., ERÖSS, K. & WING, R.D. 1992. Developmental disturbances in different insect orders caused by an ecdysteroid agonist, RH-5849. *Journal of Economic Entomology* **85**: 2107–2112.
- DHADIALLA, T.S., RETNAKARAN, A. & SMAGGHE, G. 2005. Insect growth and developmental-disturbing insecticides. In: Gilbert, L.I., Iatrou K. & Gill, S.S. (Eds) *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 6, 55–116. Elsevier, Oxford, U.K.
- FAHRBACH, S.E., SMAGGHE, G. & VELARDE, R.A. 2012. Insect nuclear receptors. *Annual Review of Entomology* **57**: 83–106.
- FARNESI, L.C., BRITO, J.M., LINSS, J.G., PELAJOMACHADO, M., VALLE, D. & REZANDE, G.L. 2012. Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. *PLOS ONE* **7**(1): 1–9.
- FATHPOUR, H., NOORI, A. & ZEINALI, B. 2007. Effects of juvenoids pyriproxyfen on reproductive organ development and reproduction in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Iranian Journal of Science and Technology* **31**(A1): 89–98.
- GADOT, M., BURNS, E. & SCHAL, C. 1989. Juvenile hormone biosynthesis and oocyte development in adult female *Blattella germanica*: effects of grouping and mating. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **11**: 189–200.
- HABES, D., MORAKCHI, S., ARIBI, N., FARINE, J.P. & SOLTANI, N. 2006. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: alteration in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **84**: 17–24.
- JENKINS, P.E. & ISSACS, R. 2007. Reduced-risk insecticides for control of grape berry moth (Lepidoptera: Tortricidae) and conservation of natural enemies. *Journal of Economic Entomology* **100**: 855–865.
- KAWADA, H., SENBO, S. & ABE, Y. 1992. Effects of pyriproxyfen on the reproduction of the housefly *Musca domestica*, and the German cockroach *Blattella germanica*. *Japanese Journal of Sanitary Zoology* **43**(3): 169–175.
- KILANI-MORAKCHI, S., ARIBI, N., FARINE, J.P., SMAGGHE, G. & SOLTANI, N. 2009. Halofenozide affects sexual behaviour, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Belgian Journal of Zoology* **139**: 147–155.
- KING, J.E. & BENNETT, G.W. 1988. Mortality and developmental abnormalities induced by two juvenile hormone analogs on nymphal German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* **81**: 225–227.
- KRUPKE, C.H., ROITBERG, B.D. & JUDD, G. JR. 2002. Field and laboratory responses of male codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) to a pheromone-based attract-and-kill strategy. *Environmental Entomology* **31**(2): 189–197.
- LAFONT, R., DAUPHIN-VILLEMANT, C., WARREN, J.T. & REES, H. 2005. Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.K. (Eds) *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 3, 125–195. Elsevier, Oxford, U.K.
- LIANG, D. & SCHAL, C. 1993. Female calling behaviour of the German cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Insect Behavior* **6**: 603–614.
- LIHOREAU, M., ZIMMER, C. & RIVAULT, C. 2008. Mutual mate choice: when it pays both sexes to avoid inbreeding. *PLOS ONE* **3**(10): 1–7.
- MAIZA, A., ARIBI, N., SMAGGHE, G., KILANI-MORAKCHI, S., BENDJEDID, M. & SOLTANI, N. 2013. Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad and indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*. *Bulletin of Insectology* **66**(1): 11–20.
- NASIRIAN, H. 2010. An overview of German cockroach, *Blattella germanica*, studies conducted in Iran. *Asian Network for Scientific Information* **13**(22): 1077–1084.

- NEJATI, J., KEYHANI, A., MOOSA-KAZEMI, S.H., MOHAMMADI, M., MAHJOOB, M. & BOOSTAN-BAKSHI, A. 2012. Cockroaches' bacterial infections in wards of hospitals, Hamedan city. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2(5): 381–384.
- PASCUAL, N., CERDA, X., BENITO, B., TOMAS, J., PIULACHS, M.D. & BELLES, X. 1992. Ovarian ecdysteroid levels and basal oocyte development during maturation in the cockroach *Blattella germanica* (L.). *Journal of Insect Physiology* 38(5): 339–348.
- PINEDA, S., SCHNEIDER, M.I., SMAGGHE, G., MARTÍNEZ, A.M., DEL ESTAL, P., VIÑUELA, E., VALLES, J. & BUDIA, F. 2007. Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 100(3): 773–780.
- RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, C.L., PINEDA, S., FIGUEROA, F.I., SCHNEIDER, M.I. & MARTÍNEZ, A.M. 2010. Toxicity and sublethal effects of methoxyfenozide on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 103(3): 662–667.
- SADEGHI, A., VAN DAMME, E.M. & SMAGGHE, G. 2009. Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *Journal of Insect Science* 9(65): 1–8.
- SALGADO, V.L. 1998. Block of neuronal voltage-dependent K⁺ channels by diacylhydrazine insecticides. *Neurotoxicology* 19(2): 245–252.
- SALTZMAN, K.A., SALTZMAN, K.D., NEAL, J.J., SCHARE, M.E. & BENNETT, G.W. 2006. Effects of the juvenile hormone analog pyriproxyfen on German cockroach, *Blattella germanica* (L.), tergal gland development and production of tergal gland secretion protein. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 63(1): 15–23.
- SCHAL, C. & CHIANG, A.S. 1995. Hormonal control of sexual receptivity in cockroaches. *Experientia* 51(9–10): 994–998.
- SCHAL, C., HOLBROOK, G.L., BACHMANN, J.A.S. & SEVALA, V.L. 1997. Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica*: juvenile hormone as a pleiotropic master regulator. *Archives in Insect Biochemistry and Physiology* 35: 405–426.
- SCHNEIDER, M.I., SMAGGHE, G., GOBBI, A. & VIÑUELA, E. 2003. Toxicity and pharmacokinetics of insect growth regulators and other novel insecticides on pupae of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of early larval instars of lepidopteran pests. *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1054–1065.
- SCHNEIDER, M.I., SMAGGHE, G., PINEDA, S. & VIÑUELA, E. 2004. Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on life history parameters and absorption in third-instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biological Control* 31: 189–198.
- SEVALA, V., SHU, S.Q., RAMASWAMY, S.B. & SCHAL, C. 1999. Lipophorin of female *Blattella germanica* (L.): characterization and relation to hemolymph titers of juvenile hormone and hydrocarbons. *Journal of Insect Physiology* 45: 431–441.
- SMAGGHE, G. & DEGHEELE, D. 1992. Effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist, RH-5849 on reproduction of *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitica* 48: 23–29.
- SMAGGHE, G. & DEGHEELE, D. 1994. Action of a novel nonsteroidal ecdysone mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. *Pesticide Science* 42: 85–92.
- SMAGGHE, G., JACAS, J.A., DEL ESTAL, P., VIÑUELA, E. & DEGHEELE, D. 1996. Tebufenozide: effects of a nonsteroidal ecdysone agonist in the oriental cockroach *Blatta orientalis*. *Parasitica* 52(2): 53–59.
- SMAGGHE, G., BYLEMANS, D., MEDINA, P., BUDIA, F., AVILA, J. & VIÑUELA, E. 2004. Tebufenozide distorted larval growth and reproduction in codling moth, and controlled field populations. *Annals of Applied Biology* 145: 291–298.
- SMAGGHE, G., GOMEZ, L.E. & DHADIALLA, T.S. 2012. Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. In: Dhadialla, T.S. (Ed.) *Advances in Insect Physiology*. Vol. 43, 163–249. Academic Press, Burlington, MA, U.S.A.
- SOLTANI-MAZOUNI, N., HAMI, M. & GRAMDI, H. 2012. Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction and Development* 56(2): 157–163.
- SETH, R.K., KAUR, J.J., RAO, D.K. & REYNOLDS, S.E. 2004. Effects of larval exposure to sublethal concentrations of the ecdysteroid agonist RH-5849 and tebufenozide (RH-5992) on male reproductive physiology in *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology* 50(6): 505–517.
- TAIBI, F., SMAGGHE, G., AMRANI, L. & SOLTANI-MAZOUNI, N. 2003. Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135: 257–267.
- TREIBLMAYR, K., PASCUAL, N., PIULACHS, M., KELLER, T. & BELLES, X. 2006. Juvenile hormone titer versus juvenile hormone synthesis in female nymphs and adults of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Journal of Insect Science* 6: 1–7.
- UZSAK, A. & SCHAL, C. 2012. Differential physiological responses of the German cockroach to social interactions during the ovarian cycle. *Journal of Experimental Biology* 215: 3037–3044.
- WILLIS, E.R., RISER, G.R. & ROTH, L.M. 1985. Observation on reproduction and development in cockroaches. *Annals of the Entomological Society of America* 51: 53–59.