

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BADJI-MOKHTAR ANNABA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE



Thèse présentée pour l'obtention du titre **Docteur en Biologie Animale,**
Option : Développement et Reproduction

**ACTIVITE COMPAREE DE QUELQUES EFFECTEURS
DES ECDYSTEROIDES EN TRAITEMENT COMBINE CHEZ UN
MODELE DE LABORATOIRE, *EPHESTIA KUEHNIELLA* Zeller :
MECANISME D'ACTION**

Par

M^{me} Manel RAHMANI-HAMI

Directeur de thèse

M^{me} Nadia SOLTANI-MAZOUNI Professeur

Devant un jury composé de :

Président : Pr. N. SOLTANI

Examineur : Pr. L. ALLAL-BENFEKIH

Examineur : Pr. N. ARIBI

Examineur : Pr. G. SMAGGHE

Examineur : Pr. M.M. LAAMARI

Université Badji-Mokhtar, Annaba

Université Saad Dahleb, Blida

Université Badji-Mokhtar, Annaba

Université de Gand, Belgique

Université El Hadj Lakhder, Batna

Année universitaire 2011/2012

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biologie animale appliquée de l'université d'Annaba sous la direction de M. Noureddine SOLTANI (professeur au département de Biologie, Université d'Annaba). Qu'il me permette de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire, m'encourager durant toutes mes études, m'avoir appris la méthodologie de recherche, le savoir et d'accepter de me faire un grand honneur en président de jury.

Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à mon directeur de thèse M^{me} Nadia SOLTANI-MAZOUNI (Professeur au département de Biologie Animale d'Annaba) pour avoir accepté de diriger mes recherches. Je ne serai la remercier pour sa disponibilité permanente, pour ses conseils qui m'ont été très précieux et pour son infinie gentillesse. Je la prie d'accepter l'expression de mon respect et de ma profonde considération.

Je ne saurai trop remercier M^{me} Laïla ALLAL-BENFEKIH (professeur, Université de Blida) qui a bien voulu accepter d'être membre du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Mes plus vifs remerciements et toute ma considération à M^{lle} Nadia ARIBI (professeur au département de Biologie, Université d'Annaba) qui a bien voulu accepter d'être membre de ce même jury et de me faire l'honneur de juger ce travail. Je lui témoigne mes sentiments de considération et de respect.

Toute ma considération à l'égard de M. Guy SMAGGHE (professor, of Crop protection Laboratory of agrozoology, Ghent University, Belgium) qui ma fait l'honneur de juger le présent travail.

Mes plus vifs remerciements vont à M. Malik LAAMARI (Professeur au département d'Agronomie, Université de Batna) qui a accepter de juger ce travail.

J'aimerais également remercier des membres du Laboratoire de Biologie Animale appliquée, Université d'Annaba qui ont contribué à rendre ces années de thèse des plus agréables. En particulier : Ouided DAAS (professeur au département de Biologie, université d'Annaba), Dahbia HABES et Leila AMRANI (Maître de conférences au département de Biologie, université d'Annaba. Je remercie tous mes amies : Aycha beya, Nedjwa, Faiza, Amel, Safia

et Mounia ainsi que les personnes que je ne citerai pas de peur d'en oublier. Je remercie également tout spécialement mon amie Samira YAZLI qui a toujours veillé à ce que je dispose de bonne condition de travail et d'avoir des heures interminables au labo aussi agréable que possible.

A mes collègues du département de Biologie, Université de Batna, en particulier: M^{lle} Lylia NOURI, M^{me} Alima BENTELIS, M^{me} Maliha LAMBARAKIA et enfin à M. Abdelmadjid MJADBA (Chef du département de Biologie, Université de Batna) pour son aide et leur compréhension.

Une pensée toute particulière de notre collègue et amie M^{me} AIDA DJEBAR-ABBAS, son souvenir restera à jamais gravé dans nos mémoires. Que dieu l'accueille dans son vaste paradis.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes chers parents, pour leur aide morale et affective toutes les années de mes études. Que dieu les préserve et leur accord santé et bonheur.

A mon mari Fethi et mes enfants Hamza et Ritej, en témoignage de leur affection.

A mes sœurs Houda et Amina

A mon frère Marwane

A mes beaux parents

Avec toute mon affection

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES	11
1.1. Présentation du matériel biologique.....	11
1.2. Cycle biologique.....	12
1.3. Présentation des insecticides et traitement.....	12
1.4. Etude toxicologique.....	15
1.5. Etude morphométrique.....	18
1.6. Microscopie électronique à transmission.....	19
1.7. Potentiel reproducteur.....	20
1.8. Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes.....	21
1.9. Analyse statistique des données.....	25
CHAPITRE 2 : RESULTAT	26
2.1. Efficacité du méthoxyfénoside et du pyriproxifène sur l'inhibition de l'exuviation adulte	26
2.1.1. Efficacité du méthoxyfénoside sur l'inhibition de l'exuviation adulte...	26
2.1.2. Efficacité du pyriproxifène sur l'inhibition de l'exuviation adulte.....	29
2.2. Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside et du pyriproxifène appliqués seuls surmorphométrie de l'ovaire	33
2.3. Effet <i>in vivo</i> d'un traitement seul ou combinant le méthoxyfénoside et le pyriproxifène sur l'épaisseur du chorion	38
2.3.1. Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside et du pyriproxifène appliqués seuls sur l'épaisseur du chorion.....	38
2.3.2. Effet du traitement combiné sur l'épaisseur du chorion.....	39
2.4. Effet <i>in vivo</i> d'un traitement combinant le méthoxyfénoside et le pyriproxifène sur le potentiel reproducteur	42
2.4.1. Effet méthoxyfénoside seul sur les évènements de la reproduction.....	42
2.4.2. Effet du pyriproxifène seul sur les évènements de la reproduction....	45
2.4.3. Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside et du pyriproxifène en traitement combiné sur les évènements de la reproduction.....	47
2.5. Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside et du pyriproxifène sur les ecdystéroïdes corporels	
2.5.1. Effet <i>vivo</i> du méthoxyfénoside et du pyriproxifène sur les	50

ecdystéroïdes dans le corps entier	
2.5.2. Effet du méthoxyfénozide et du pyriproxifène sur la production <i>in vivo</i> d'ecdystéroïdes ovariens.....	50
2.5.3. Effet du traitement combiné sur la production <i>in vivo</i> d'ecdystéroïdes ovariens.....	54
CHAPITRE 3 : DISCUSSION	56
3.1. Etude toxicologique.....	57
3.2. Effet sur la morphométrie de l'ovaire.....	62
3.3. Effet sur l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux.....	62
3.4. Effet <i>in vivo</i> sur le potentiel reproducteur.....	65
3.5. Effet sur les ecdystéroïdes.....	67
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	72
RESUMES	82
Français.....	
Anglais.....	86
Arabe.....	87
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	88
ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE	89
	116

Liste des figures

Figures	Titre	page
Figure 1	Structure de la cuticule (A) et processus de mue (B) ; a: cuticule avant la mue, b: mitose des cellules épithéliales, c: apolyse, d: digestion de l'endocuticule, e: exuviation	3
Figure 2	Cycle de développement de <i>E. kuehniella</i> à 27°C.	14
Figure 3	Structure chimique de la 20E (1), RH-5849 (2), RH-5992 (tebufénozide) (3), RH-2485 (méthoxyfénozides) (4), RH-0345 (hahofénozide) (5).	16
Figure 4	Structure chimique des différentes hormones juvéniles (1), et de quelques analogues: méthoprène (2), kinoprène (3), fénoxycarbe (4), pyriproxifène (5).	17
Figure 5	Principe du dosage EIA.	24
Figure 6	Efficacité du RH-2485, administré par application topique à des chrysalides nouvellement exuviées d' <i>E. kuehniella</i> : analyse des probits	29
Figure 7	Efficacité du pyriproxifène, administré par application topique à des chrysalides nouvellement exuviées d' <i>E. kuehniella</i> : analyse des probits.	32
Figure 8	Effet du RH-2485 (μg / insecte) et du pyriproxifène (ng /insecte) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> , sur le poids frais (mg) des ovaires ($m \pm s$; n= 6).	34
Figure 9	Effet du RH-2485 (μg / insecte) et du pyriproxifène (ng /insecte) administrés par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>Ephestia kuehniella</i> , sur le nombre des ovocytes par paire d'ovaires ($m \pm s$; n= 6).	35
Figure 10	Effet du RH-2485 (μg / insecte) et du pyriproxifène (ng /insecte) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> , sur la longueur (μm) et la largeur (μm) de l'ovocyte basal ($m \pm s$; n= 6). L'astérisque indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux témoins.	36

Figure 11	du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> , sur le volume de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.	37
Figure 12	Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> , sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 4$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.	39
Figure 13	Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxifène, sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal chez <i>Ephestia kuehniella</i> ($m \pm s$; $n= 4$).	40
Figure 14	Structure semi fine de l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux d' <i>E. kuehniella</i> . Témoin (A) et les séries traitées avec le methoxyfénoside (B), pyriproxifène (C), pyriproxifène /RH-2485 (D) et RH-2485/pyriproxifène (E) (Ch : Chorion, Cf : Cellule foliculaire, Ov : Ovocyte).	41
Figure 15	Effet du RH-2485 sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.	43
Figure 16	Effet du RH-2485 sur la fécondité (œufs/femelles)(A) et la viabilité des œufs (%) (B) chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.	44
Figure 17	Effet du pyriproxifène sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.	45
Figure 18	Effet du pyriproxifène sur la fécondité (œufs/femelles)(C) et la viabilité des œufs (%) (D) chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ($m \pm s$; $n= 6$).	47

Figure 19	Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxifène, sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez <i>E. kuehniella</i> , ($m \pm s$; $n=6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.	48
Figure 20	Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxifène sur la fécondité des femelles (nombre d'œufs / femelle)(C) et la viabilité (%) des œufs (D) ($m \pm s$; $n=6$).	50
Figure 21	Analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les chrysalides d' <i>E. kuehniella</i> traitées avec le RH-2485 (0,01 μg) et le pyriproxifène (2,53 ng). Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20-hydroxyecdysone.	51
Figure 22	Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/2\mu\text{l}$), sur le taux d'ecdystéroïdes exprimés en pg équivalents 20E/ mg du poids corporel au stade nymphal chez les chrysalides femelle d' <i>Ephestia kuehniella</i> ($m \pm s$; $n=4$).	53
Figure 23	Analyse quantitative des ecdystéroïdes ovariens d' <i>E. kuehniella</i> . Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) d'ecdysone.	54
Figure 24	Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/2\mu\text{l}$), sur le taux d'ecdystéroïdes ovariens exprimés en pg équivalents E/mg de tissu, mesuré à l'émergence des femelles après traitement des chrysalides d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm s$; $n=4$).	55
Figure 25	Effet du traitement combiné par application topique à l'exuviation nymphale, sur le taux d'ecdystéroïdes ovariens exprimés en pg équivalents E/mg de tissu, mesuré à l'émergence des femelles après traitement des chrysalides d' <i>Ephestia kuehniella</i> ($m \pm s$; $n=4$).	56
Figure 26	Contrôle de la métamorphose et la synthèse des hormones de développement chez les insectes.	58
Figure 27	Contrôle endocrinien de la reproduction	68

Figure 28	Mode d'action des ecdystéroïdes.	74
Figure 29	Modèle simple du rôle de BR-C (Broad complexe), A : chez la larve et B : chez la chrysalide.	74
Figure 30	La biosynthèse de l'ecdysone.	75

INTRODUCTION

Les causes de nos différents problèmes d'environnement et santé sont nombreuses et incluent la pollution, les activités agricoles et aussi la résistance que développent plusieurs ordres d'insectes vis à vis de différents types d'insecticides (Brévault *et al.*, 2009).

Malgré les initiatives prises de part et d'autre pour accroître la production, le contexte d'insécurité alimentaire est toujours marqué par des pertes post-récolte non négligeables. Chaque année, près de 20000 espèces d'insectes menacent la production agricole mondiale (McEwin, 1978) et détruisent une bonne partie des céréales et des légumineuses vivrières cultivés dans les pays en développement d'Afrique et d'Asie (Cilss, 2009). La valeur réelle des déperditions notées lors du stockage est depuis fort longtemps sujette à polémique. Devant la gravité des pertes de récolte du fait des insectes, Labeyrie (1992) disait qu'en Afrique, le paysan travaille pour les insectes. Grâce aux progrès technologique, l'agriculture se dote aujourd'hui de produits chimiques plus performants afin de contrôler les pertes de récolte qui sont associées à la présence de plantes ou d'insectes nuisibles (Nauen & Bretschneider, 2002).

En raison de la présence d'un exosquelette rigide, le développement des arthropodes est caractérisé par des mues pour permettre la croissance. Chez les insectes holométaboles, tels les lépidoptères, la croissance se fait graduellement par une succession de stades larvaires séparés les uns des autres par des mues (Smith, 1985; Lafont *et al.*, 2005). A la fin de la période larvaire, toutefois, un changement radical survient et le corps de l'insecte se transforme complètement en une chrysalide: c'est la métamorphose.

La mue est un processus complexe qui implique des changements hormonaux et comportementaux ainsi que des changements aux niveaux de l'épiderme et de la cuticule (Gullan & Cranston, 2000). La mue se produit en deux étapes principales : l'apolyse et l'ecdysis. A l'apolyse, l'épiderme se sépare de la cuticule du stade précédent. Entre l'apolyse et l'ecdysis, l'insecte « nouveau » est à l'état pharate, caché sous sa vieille cuticule. C'est cette étape, parfois difficile à observer, qui sert à identifier le début et la fin de chaque stade. L'ecdysis est l'étape où l'insecte se débarrasse de son ancienne cuticule, ou exuvie (Fig. 1). La métamorphose des Lépidoptères implique un stade nymphal, pendant lequel les structures adultes sont élaborées à partir des structures larvaires. Les organes qui fonctionneront chez l'adulte mais qui étaient sous-développés chez les larves croissent à un rythme plus rapide que le reste du corps. Souvent, la nymphe est entourée d'une enveloppe protectrice ou d'un cocon. A l'émergence les adultes sont capables de se reproduire (Evans, 1984; Gullan & Cranston, 2005). Les changements morphologiques, physiologiques et comportementaux de l'organisme durant la métamorphose des insectes résultent de la régulation de l'expression des gènes par les taux de la 20-hydroxyecdysone (20E) en absence ou en présence de l'hormone juvénile (HJ) (Riddiford, 1996 ; Gilbert *et al.*, 2002 ; Lafont *et al.*, 2005).

Les ecdystéroïdes sont des stéroïdes polyhydroxylés qui contrôlent des processus vitaux chez les insectes ; la reproduction, le développement ovarien (Swevers & Latrou, 1999), l'embryogenèse et le développement post embryonnaire (Koslova & Thummel, 2000). Les cellules neurosécrétrices du cerveau secrètent les hormones prothoracicotrope (PTTH) qui sont ensuite stockées dans le complexe corps

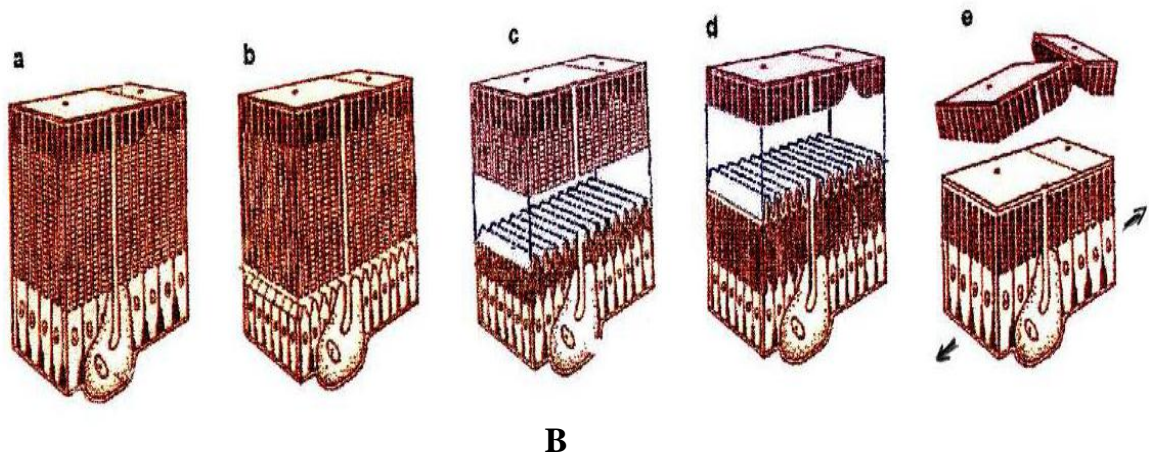
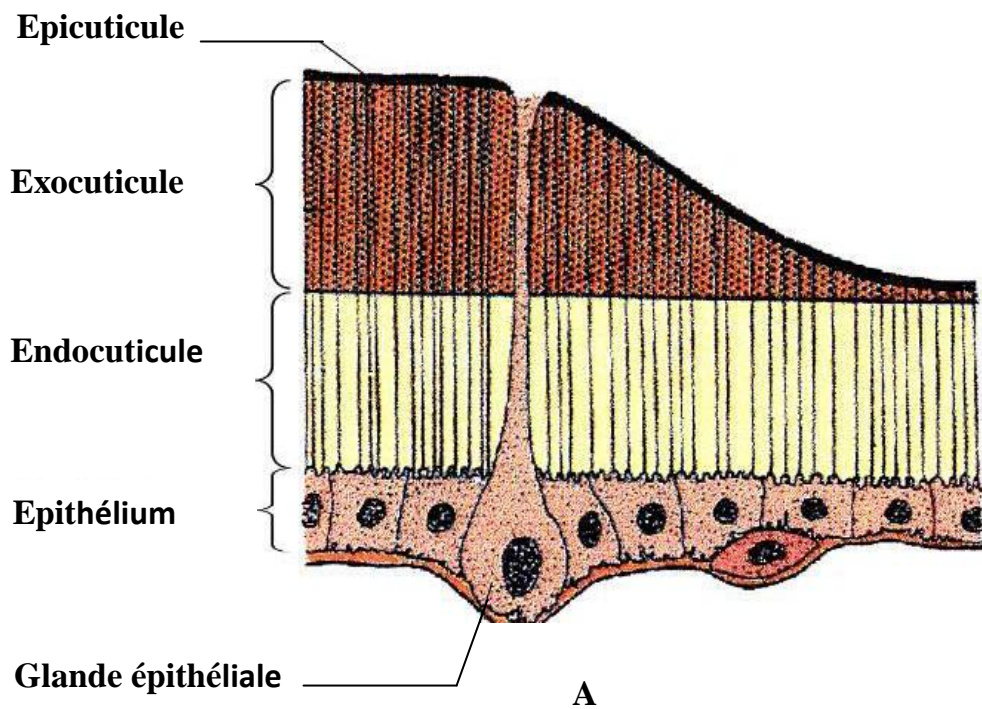


Figure 1. Structure de la cuticule (A) et processus de mue (B) ; a: cuticule avant la mue, b: mitose des cellules épithéliales, c: apolyse, d: digestion de l'endocuticule, e: exuviation (Jurenka, 2011).

cardiaques-corps allates (CC-CA), qu'on appelle l'organe neurohémal de la PTTH (Marchal *et al.*, 2010). La sécrétion de la PTTH, en réponse à des facteurs physiologiques (l'état nutritionnel de l'insecte) et environnementaux (la photopériode) vont stimuler la synthèse de l'ecdysone (E) par la glande prothoracique (Nijhout, 1994; Gilbert *et al.*, 2002; Lafont *et al.*, 2005; Gilbert, 2008). L'ecdysone est une prohormone libérée dans l'hémolymphe puis convertie en une hormone active, la 20E grâce à une enzyme, l'ecdysone 20-monooxygénase qui est le cytochrome P450 (CYP) dépendant des hydroxylases des stéroïdes (Smith, 1985; Gilbert *et al.*, 2002; Rewitz *et al.*, 2006 a et b; Gilbert & Rewitz, 2009) dans différents organes périphériques tels que le corps gras, le tube digestif et les tubes de malpighi (Gilbert *et al.*, 1997, 2002 ; Rybczynski, 2005 ; Huang *et al.*, 2008).

L'hormone juvénile est un sesquiterpène ayant pour principale fonction de réguler plusieurs processus physiologiques (Koolman, 1990 ; Rees, 1995 ; Gäde *et al.*, 1997 ; Palli & Retnakaran, 2001 ; Riddiford *et al.*, 2003) comme la reproduction (Nijhout, 1994 ; Mc Neils *et al.*, 1996), la vitellogénèse (Martin *et al.*, 1995 ; Bellés *et al.*, 2000), la diapause (Grenier et Grenier, 1993 ; Oberlander *et al.*, 1995 ; Tahar *et al.*, 2001), le polymorphisme et la production de la phéromone sexuelle chez les lépidoptères qui se fait généralement via la libération du PBAN (phéromone biosynthesis activating neuropeptide), une neurohormone qui peut agir sur la glande à phéromone (Rafaeli, 2002). A ce jour, six formes chimiques d'hormone juvénile ont été identifiées et toutes correspondent à des dérivés méthyl esters de l'acide époxy-farnésioïque (Cusson *et al.*, 2000). Chez la plupart des insectes, l'hormone juvénile III est la seule forme à avoir été identifiée (Hardie *et al.*, 1985 ; Westerlund *et al.*, 2004). Toutefois, chez les lépidoptères, cinq formes d'hormone juvénile ont été mises en évidence (JH 0, JH I, JH II, JH III, 4-méthyl JH I). De même, chez les diptères supérieurs, un bis-époxyde de la forme III de l'hormone juvénile (JH B3) coexiste avec cette dernière (Nijhout, 1994 ; Lafont, 2000). La synthèse des HJs par les corps allates est sous la dépendance de deux neurohormones céphaliques stimulatrices, les allatotropines et inhibitrices, les allatostatines (Stay & Woodhead, 1993 ; Stay *et al.*, 1994 ; Gäde & Hoffman, 2005), mais aussi des neurotransmetteurs tels que la dopamine (Granger *et al.*, 2000) et l'octapamine (Schulz *et al.*, 2002). L'HJ est libérée

dans l'hémolymphe puis transportée vers les tissus grâce à des protéines vectrices spécifiques appelées « juvénile hormone binding proteins » (Goodman & Chang, 1985 ; Kort & Granger, 1996). La régulation des taux de l'HJ met en jeu l'activité des estérases (Browder *et al.*, 2001) et de l'époxyde hydrolase (Kort & Granger, 1996). Le métabolisme de l'HJ s'effectue non seulement au niveau de hémolymphe mais également au niveau des tissus tels que le tégument, le corps gras, le cerveau, l'intestin et les glandes séricigènes (Kort & Granger, 1996 ; Kallapur *et al.*, 1996).

La reproduction représente pour l'individu un acte important mettant en jeu des comportements complexes, alors que pour l'espèce, elle est fondamentale en assurant la pérennité. Le potentiel reproducteur dépend de la fécondité des femelles et de la rapidité du développement, il est généralement important chez les insectes, mais variable selon les espèces et les facteurs de l'environnement que subissent les individus (Lamy, 2001). Il est clair que le potentiel reproducteur des insectes est un facteur important de leur indéniable pullulation. Le contrôle de la reproduction est donc un élément fondamental auquel le physiologiste peut apporter une contribution significative (Berry, 1985). L'étude des ovaires chez les insectes a été beaucoup plus abordée au niveau des étapes terminales du développement qu'au niveau des premières phases. Ainsi, les phénomènes de croissance ovocytaire ou de la vitellogénèse ont été décrits depuis bien longtemps (Sato, 1932) et sont encore à l'heure actuelle les sujets de nombreuses études tant histochimiques qu'ultrastructurales (Gerber, 1967 ; Laverdure, 1972 ; Soltani, 1987 ; Soltani-Mazouni, 1994 ; Soltani-Mazouni & Soltani, 1994, 1995 ; Soltani *et al.*, 1996 ; Soltani *et al.*, 1998 ; Taibi *et al.*, 2003 ; Amrani *et al.*, 2004 ; Hami *et al.*, 2005 ; khebbeb *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

La régulation hormonale du développement ovarien chez les lépidoptères varie selon certaines caractéristiques reproductives telles que le stade de développement de la femelle lors de l'initiation de la vitellogénèse, la polyandrie (accouplement multiple des femelles) et l'ingestion de nourriture au stade adulte. Ces aspects de la biologie reproductive des lépidoptères sont intrinsèquement liés aux stratégies de la reproduction utilisées par les femelles, lesquelles influencent directement la maturation ovarienne (Ramaswamy *et al.*, 1997 ; Cole *et al.*, 2002). Chez les adultes femelles, les

ecdystéroïdes sont synthétisés par les cellules folliculaires et jouent un rôle important dans le contrôle de la reproduction (Chen & Gu, 2006). Ils sont impliqués dans le contrôle de la réinitiation méiotique dans l'ovocyte (Yamashita & Suzuki, 1991), la synthèse de la vitellogénine, l'augmentation de la compétence des cellules folliculaires à incorporer cette protéine dans les ovocytes en développement (Ramaswamy *et al.*, 1997), l'ovulation (Ruegg *et al.*, 1992), la spermatogenèse (Alrubeai & Gorell, 1982), l'induction de la sclérotisation des œufs par la stimulation de la formation du chorion et l'inhibition de la production de l'HJ (Sahlen, 1994 ; Lafont *et al.*, 1989, 2005). Lanot *et al.* (1989) ont montré également l'implication des ecdystéroïdes maternels dans le processus de segmentation et d'élongation des cellules germinales de *Manduca sexta*. Chez *Bombyx mori*, le développement des œufs se fait de concert avec le processus de la mue larvaire sous l'action de l'E (Onishi, 1987). Récemment, Telfer (2009) a détaillé la formation des œufs chez les lépidoptères et plusieurs processus ont été examinés allant du développement des follicules ovarien jusqu'à la maturation ovocytaire. Chez les espèces où la maturation ovarienne est complètement dissociée du processus métamorphique tels que *Helicoverpa zea* (Satynarayana *et al.*, 1992) et certaines espèces migratrices comme *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera ; Noctuidae), le développement des œufs est sous la dépendance de l'HJ, et ce en l'absence complète de l'E. Bien que les rôles de l'E et l'HJ aient été élucidés dans certaines étapes du développement des ovocytes chez les insectes, la maturation ovarienne dans son ensemble est très complexe, puisque de nombreuses interactions synergiques et inhibitrices ont cours entre ces deux hormones et d'autres neurohormones (Bellés, 2005).

Malgré les progrès réalisés, les insecticides restent responsables de nombreux problèmes tant pour l'environnement avec leur persistance à tous les échelons édaphiques que pour la santé humaine par la présence de résidus dans les eaux de distribution ainsi que dans les aliments. De plus, l'utilisation massive d'insecticides depuis plus d'une trentaine d'années est à la base de l'apparition de populations d'insectes résistants (Nauen & Elbert, 2003). Ce constat conduit les scientifiques à rechercher de nouvelles molécules originales et spécifiques de lutte qui, utilisées

seules ou en combinaison avec les molécules existantes, permettraient de contrôler efficacement ces ravageurs tout en limitant les impacts négatifs des pesticides classiques antiparasitaires sur l'environnement et la santé humaine. C'est ainsi que l'industrie phytosanitaire a développé, ces dernières années des molécules non polluantes qui interfèrent avec la régulation endocrine, la croissance, la reproduction et la métamorphose des insectes (Retnakaran *et al.*, 2005). Contrairement aux insecticides classiques, ces produits s'avèrent plus sélectifs et sécuritaires, permettant ainsi d'épargner les organismes non visés tels que les prédateurs et les parasitoïdes (Medina *et al.*, 2001, Schneider *et al.*, 2008). Ces composés sont appelés les régulateurs de croissance des insectes (Insect Growth regulators= IGRs), qui se subdivisent en trois catégories selon leur mode d'action.

La première catégorie comporte les agonistes et les antagonistes de l'hormone juvénile : les analogues de l'HJ sont essentiellement représentés par le méthoprène, l'hydroprène, le kinoprène, le fénoxycarbe et le pyriproxifène, ils agissent comme des ovicides, larvicides et arrêtent le développement embryonnaire (Riddiford & Williams, 1967 ; Retnakaran, 1970 ; Liu & Chen, 2001 ; Charmillot *et al.*, 2001 ; Ding *et al.*, 2002), provoquent une stérilité chez l'adulte (Retnakaran *et al.*, 2005) et induisent des mues larvaires surnuméraires (Gadenne *et al.*, 1990 ; Elbert & Nauen, 2000 ; Gorman *et al.*, 2002) et prolongent la durée des stades larvaires et nymphaux (Quenedey *et al.*, 1995 ; Dhadialla *et al.*, 1998 ; Aribi *et al.*, 2001, 2007). Ces mimétiques de l'hormone juvénile présentent une efficacité contre plusieurs espèces de coléoptères, lépidoptères et d'autres ordres d'insectes (Oberlander *et al.*, 1997 ; Liu & Chen, 2000 ; Aribi *et al.*, 2006). Les antagonistes de l'HJ empêchent la production de l'hormone juvénile ou facilitent sa dégradation en détruisant les corps allates (Retnakaran *et al.*, 2005). Le précocène I et II sont des anti-HJ puissants qui provoquent une réduction de la croissance ovarienne chez *Nipaparvala lugens* (Ayoade *et al.*, 1995) et une métamorphose précoce chez *Zophobas atratus* (Davas *et al.*, 1990, Aribi *et al.*, 1999).

La deuxième catégorie comporte les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, essentiellement représentés par le diflubenzuron (DFB) qui agit 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-Mazouni & Soltani, 1995 ; Soltani *et al.*, 1996 ; Chebira *et al.*, 2006). Plus tard, d'autres inhibiteurs de la synthèse de la chitine ont été développés, tels que le chlorfluazuron, le flucycloxuron (FCX) et hexaflumuron (Sheets *et al.*, 2000 ; Kellouche & Soltani, 2006) ou encore le lufenuron, le teflubenzuron et le triflumuron (TFM) (Sheets *et al.*, 2000 ; Tomlin, 2000 ; Karr *et al.*, 2004). Le novaluron affecte la mue par le dépôt d'une endocuticule anormale ; il agit contre plusieurs espèce de lépidoptère par ingestion ou par contact (Kim *et al.*, 2000 ; Dhadialla *et al.*, 2005). Le buprofezin et la cycromazine interfèrent avec la croissance et la biosynthèse de la chitine (Tomlin *et al.*, 2000 ; Ishaaya, 2001).

Une autre catégorie de régulateurs de croissance a été développée (Wing, 1988). Il s'agit des composés de la bisacylhydrazine à structure non stéroïdale, comme le RH-5849 (prototype), le tébufénozide (RH-5992), le halofénozide (RH-0345), et le méthoxyfénozide (RH-2485). Ces composés sont des agonistes de la 20E (Dhadialla *et al.* 1998, Palli & Retnakaran 2001, Yanagi *et al.*, 2006), qui miment l'action de l'hormone de mue en induisant des mues précoces et létales (Oberlander *et al.*, 1998). De ce fait, ils sont considérés comme des accélérateurs de mue ou MACs (molting acclerating compounds) qui se fixent aux récepteurs (EcR) spécifiques des ecdystéroïdes (Dhadialla *et al.*, 1998, 2005) par compétition avec les ecdystéroïdes naturels (Dhadialla & Ross, 2007). Ils stimulent les cellules épidermiques pour la synthèse de nouvelles cuticules (Smagghe & Degheele, 1994 a b, 1997 ; Trisyono & Chippendale, 1997). De plus, le RH-2485 perturbe la reproduction et affecte certains comportements sexuels chez plusieurs espèces de Lépidoptères (Hoelscher *et al.*, 2003 ; Reinke *et al.*, 2007 ; Bruce & Barrett, 2008). Un autre bisacylhydrazine, le chromofénozide est commercialisé pour le contrôle des larves de Lépidoptères (Yanagi *et al.*, 2000 ; Reiji *et al.*, 2000 ; Toya *et al.*, 2002).

Les effets sublétaux des agonistes des ecdystéroïdes ont été largement étudiés chez les larves et les adultes. Ces effets incluent, la diminution ou l'allongement de la durée du développement nymphale (Adel & Sehnal 2000, Biddinger *et al.*, 2006), la perte du poids des larves et des nymphes (Pineda *et al.*, 2007, Zamora *et al.*, 2008), les

malformations et la mortalité des nymphes et des adultes (Gobbi *et al.*, 2000, Pineda *et al.*, 2004 ; Hami *et al.*, 2005), la perturbation de la diapause (Eizaguirre *et al.*, 2007) et une altération des paramètres de la reproduction (Seth *et al.*, 2004, Smaghe *et al.*, 2004).

Les antagonistes, le KK-22 et le KK-42 sont des dérivés de l'imidazole. Le KK-42 est le dérivé imidasole le plus actif, considéré comme un anti-ecdystéroïdes (Tunas & Uygun, 2004). Il affecte le développement et la croissance des ovocytes et la production d'ecdystéroïdes *in vitro* chez *Tenebrio molitor* (Soltani *et al.*, 1997 ; Amrani *et al.*, 2004) et le taux d'ecdystéroïdes *in vivo* chez *Zophobas atratus* (Aribi, 1997). De plus, il a été suggéré que le KK-42 peut affecter le développement des ovaires en agissant au niveau de l'épithélium folliculaires, site de synthèse de l'ADN et source d'ecdystéroïdes ovariens (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001).

D'autres produits phytosanitaires existent tels les insecticides néonicotinoïdes (ex : l'imidaclopride, le thiametoxam et l'aclothianidine) qui imitent l'action de la nicotine en agissant *via* les récepteurs de l'acétylcholine de type nicotiques post-synaptique présent dans le système nerveux central des insectes (Tomisawa & Casida, 2008). Ces récepteurs, comme celui des vertébrés, sont impliqué dans la neurotransmission rapide, notamment lors des processus de mémoire et d'apprentissage (Gauthier *et al.*, 2006). Malheureusement, nous avons peu de connaissances sur la structure, la composition en sous-unités et la pharmacologie des récepteurs natifs exprimés dans le système nerveux des insectes (Thany *et al.*, 2007). Récemment, de nouveaux composés ont été introduits dans le but d'approfondir le mécanisme d'action au niveau cellulaire. Ces composés sont des médicaments connus tels que le captopril, prescrit dans le traitement de l'hypertension. Il est considéré comme un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) qui provoque une réduction de l'oviposition et des taux d'edystéroïdes chez les lépidoptères (Vercrysse, 2004).

L'impact de ces insecticides a été largement étudié dans notre laboratoire sur plusieurs organismes visés, spécialement sur des insectes à intérêt agronomique tels

que *T. molitor* et *Ephestia kuehniella* (Soltani *et al.*, 2002 ; Taibi *et al.*, 2003 ; Amrani *et al.*, 2004 ; Hami *et al.*, 2005, ; Aribi *et al.*, 2006 ; Berghiche *et al.*, 2008 ; khebbeb *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2010, 2012) auxquels s'ajoute notre étude réalisée *in vivo* et portant sur les effets de deux régulateurs de croissances le méthoxyfénozide et le pyriproxifène, sur un modèle de laboratoire, *E. kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae). Elle comporte quatre parties :

- La première partie traite l'efficacité du RH-2485 et du pyriproxifène sur des chrysalides d'*E. kuehniella* traitées par application topique dès leur exuviation nymphale.
- La seconde partie aborde l'effet de ces deux régulateurs de croissances sur la morphométrie de l'ovaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux.
- La troisième partie a permis de révéler l'effet du RH-2485 et du pyriproxifène administrés séparément ou de manière combinée sur les évènements de la reproduction et de déterminer les durées des périodes de préoviposition et d'oviposition et la fécondité des femelles et la viabilité des œufs.
- Et enfin, une dernière partie examine l'impact de ces insecticides sur la production hormonale par les ovaires et le profil de l'hormone de mue a été déterminé dans le corps entier des chrysalides durant le développement nymphal en traitement simple et combiné.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Présentation du matériel biologique :

Ephestia kuehniella (Zeller), communément appelée pyrale de la farine, est une espèce cosmopolite originaire de l'Inde. Elle provoque des dégâts principalement sur la farine (Doumandji–Mitiche, 1977), les grains de céréales (blé, maïs, riz), la semoule, les flocons d'avoine, les biscuits, les pâtes alimentaires et exceptionnellement les fruits desséchés (raisins, figues, abricots). *E. kuehniella* provoque de l'asthme et des rhinites (Bataille *et al.*, 1995 ; Cipolla *et al.*, 1996). Sa position systématique est la suivante :

Règne	: Animalia
Sous-règne	: Metazoa
Embranchement	: Hexapoda
Classe	: Insecta
Sous classe	: Pterygota
Super ordre	: Endopterygota
Ordre	: Lepidoptera
Famille	: Pyralidae
Genre	: <i>Ephestia</i>
Espèce	: <i>kuehniella</i> Zeller

1.2. Cycle biologique :

La durée totale du cycle de développement varie de 25 à 200 jours en fonction des conditions d'alimentation et de température. Il est de type holométabole à mœurs nocturne. Durant le jour, l'insecte se tient au repos contre les murs ou caché dans la farine (Balachowsky, 1972). L'insecte adulte a une petite tête globulaire et fait 20 à 25 mm d'envergure, Les ailes antérieures sont grisâtres et satinées, les ailes postérieures, finement frangées. Les femelles pondent juste après l'accouplement qui a lieu quelques heures après l'émergence et la fécondité est de 200 à 300 œufs blancs et de

forme elliptique. A son premier stade, la larve blanche tirant vers le rose, mesure de 1 à 1,5 mm de long. Elle peut atteindre jusqu'à 15 à 20 mm au stade final (après six mues) et s'entoure d'un cocon blanc soyeux et devient chrysalide qui donne des adultes après 8 à 12 jours (Fig. 2).

1.3. Présentation des insecticides et traitement :

Les molécules utilisées dans le traitement sont : un agoniste des ecdystéroïdes, le méthoxyfénozide (RH-2485) et un analogue de l'hormone juvénile, le pyriproxifène.

1.3.1. Le méthoxyfénozide :

Le méthoxyfénozide est le nom commun de N-tert-Bentyl-N-(3-methoxy-*o*-tolwoyl)-3,5-xylohydrazide. Sa formule empirique est C₂₂H₂₈N₂O₃ et son poids moléculaire est de 368, 47g. Il appartient à la catégorie des insecticides de groupe des bisacylhydrazines qui sont des agonistes de la troisième génération de l'ecdysone. Il agit principalement par ingestion chez les Lépidoptères (Fig. 3). Il a été administré par application topique sur des chrysalides nouvellement exuviées aux doses : 0,004-0,008- 0,02 et 0,04 µg/insecte.

1.3.2. Le pyriproxifène :

2-[1- methyl-2-(4-phenoxy-fenoxy) ethoxy] pyridine, (Admiral 10EC CNCCC.JS). Sa formule empirique est : C₂₀H₂₉NO₃, son poids moléculaire est de 321,5g et sa solubilité dans l'eau de 0,367 ppm. Le pyriproxifène est un composé aromatique, volatile, relativement stable (Sullivan, 2000) (Fig. 4). Le pyriproxifène a été utilisé *in vivo* par application topique sur des chrysalides nouvellement exuviées à quatre doses : 1,25- 2,50- 5 et 10 ng/ insecte.

1.3.3. Traitement combiné :

L'efficacité de cette combinaison a été envisagée en traitement par application topique et deux séries ont été réalisées :

Les chrysalides de la première série ont été traitées à l'exuviation (< 4 à 8 heures) avec le RH- 2485 à la dose 0,01µg (DI50) puis 24 heures après avec le pyriproxyfène à la dose 2,53 ng (DI50).

Les chrysalides de la deuxième série ont été traitées à l'exuviation avec le pyriproxyfène (2,53 ng), puis 24 heures après avec le RH-2485 (0,01 µg). Une quantité de 2µl a été déposée sur la face latéro-ventrale des chrysalides nouvellement exuviées. Les témoins ne reçoivent aucun traitement.

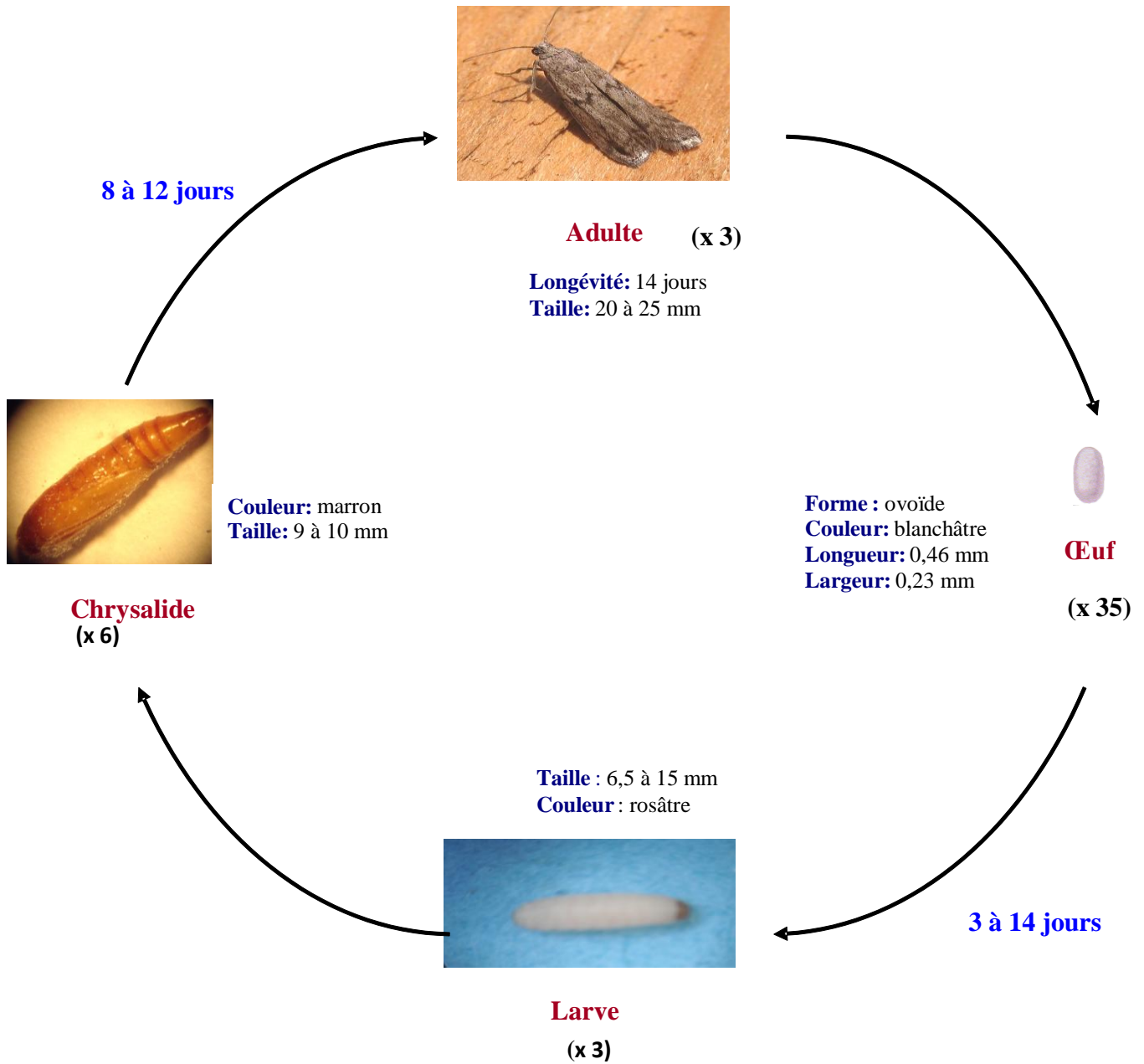


Figure 2. Cycle de développement de *E. kuehniella* à 27°C.

1.4. Etude toxicologique :

Afin de caractériser l'efficacité des deux régulateurs de croissance, le RH-2485 et le pyriproxyfène, à l'égard des chrysalides nouvellement exuviées, il est nécessaire d'estimer des doses d'inhibition de l'exuviation adulte (DI_{50}). Les pourcentages d'inhibition observés sont corrigés par la formule d'Abott (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle et de connaître la toxicité réelle du pesticide par l'analyse des probits (Finney, 1971).

$$\text{Mortalité corrigé} = \frac{\text{Mortalité observée chez les traitées} - \text{Mortalité observée chez les témoins}}{100 - \text{Mortalité observée chez les témoins}} \times 100$$

Les pourcentages de mortalités corrigés subissent une transformation angulaire selon Bliss, cité par Fisher & Yates (1957). Les données normalisées font l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification, suivie par le classement des doses par le test de Tukey. Les mortalités corrigées obtenues permettent d'établir une courbe des probits en fonction des logarithmes décimaux des doses. Les pourcentages se convertissent en leurs probits (Fisher & Yates, 1957). Le logarithme décimal des doses d'inhibition de l'exuviation adulte (DI_{50} et DI_{90}) sont déterminés à partir des droites de régression selon le procédé mathématique de Finney (1975).

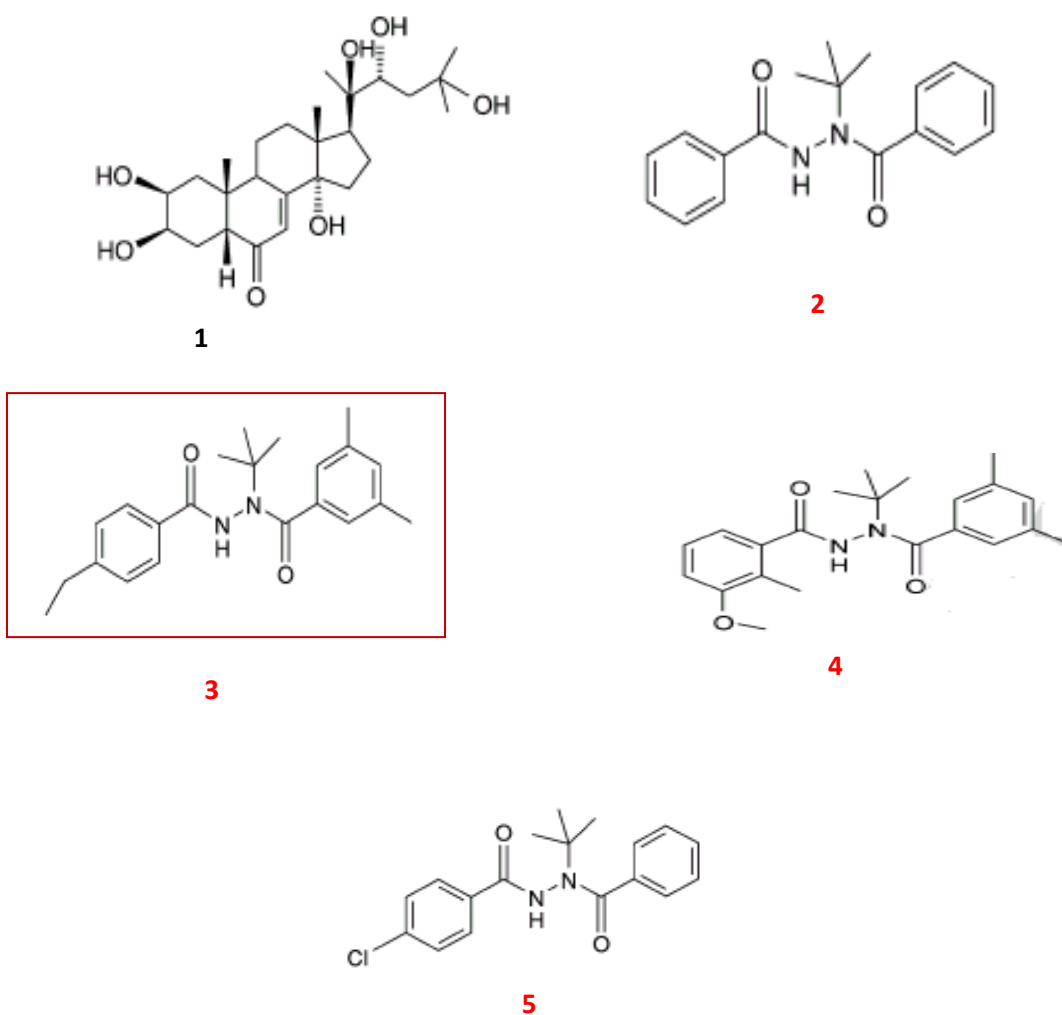


Figure 3. Structure chimique de la 20E (1), RH-5849 (2), RH-5992 (tebufénoside) (3), RH-2485 (méthoxyfénosides) (4), RH-0345 (hahofénoside) (5) (d'après Dhadialla *et al.*, 2005).

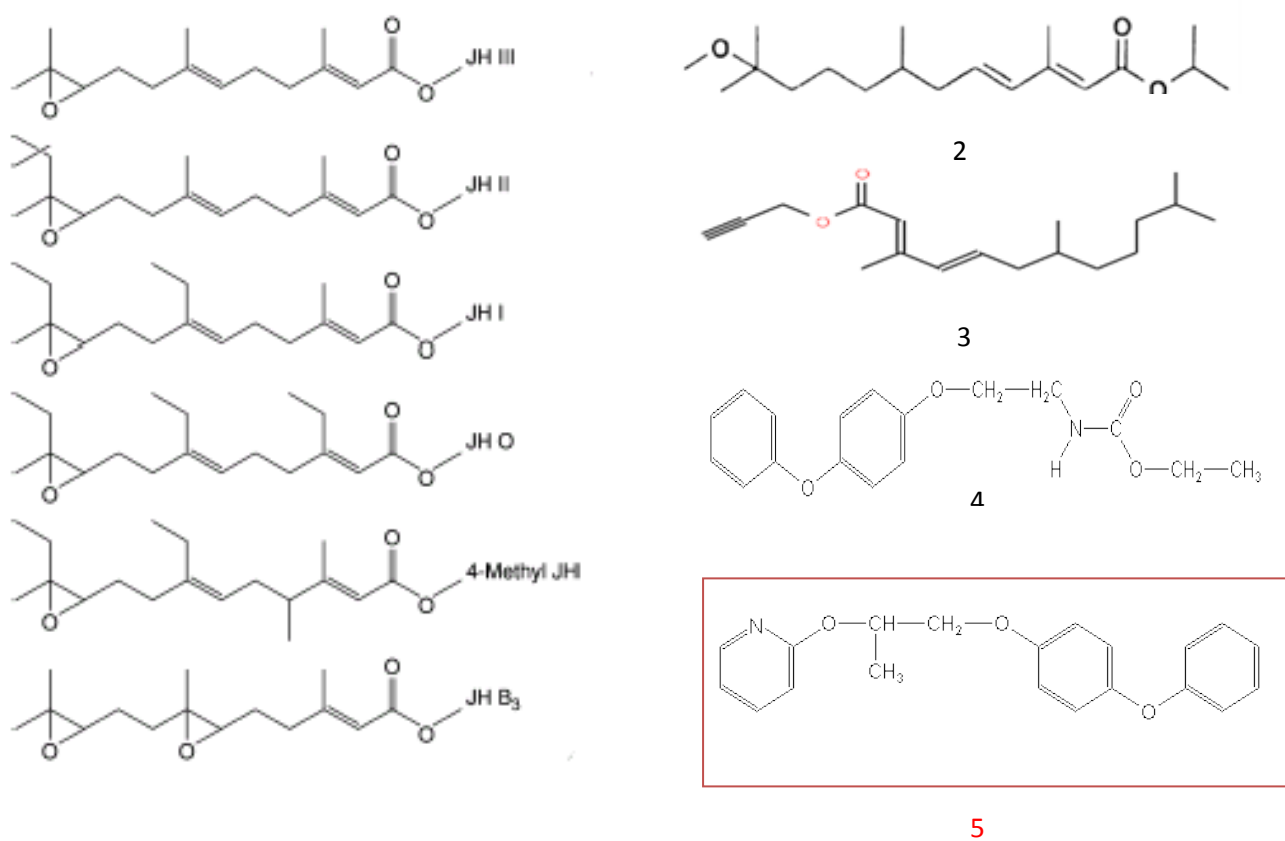


Figure 3. Structure chimique de la 20E (1), RH-5849 (2), RH-5992 (tebufénoside) (3), RH-2485 (méthoxyfénosides) (4), RH-0345 (hahofénoside) (5) (d'après Dhadialla *et al.*, 2005).

Les intervalles de confiances de la DI50 sont ensuite calculés selon la méthode de Swaroop (1966) avec une probabilité de 95%.

✓ Limite supérieure = $DI_{50} \times FDL_{50}$

✓ Limite inférieure = DI_{50} / FDL_{50}

Aussi, deux paramètres sont nécessaires :

✓ Le 1^{er} paramètre est le S (Slope) donné par la formule :

$$S = \frac{DI_{84} / DI_{50} + DI_{50} / DI_{16}}{2}$$

✓ Le 2^{ème} paramètre est le FDL 50 donnée par la formule suivante :

$FDL_{50} = \text{Anti Log } C$

$C = 2,77 / \sqrt{N} \times \log S$

N = Nombre total des chrysalides testées entre DI_{16} et DI_{84} .

1.6. Etude morphométrique :

Les ovaires sont prélevés des séries témoins et traitées avec le RH-2485 (0,01µg) et le pyriproxifène (2,53 ng), à l'émergence des femelles. Les paramètres morphométriques de l'ovaire ont été mesurés :

- Le nombre d'ovocytes par paire d'ovaire, la longueur (L) et la largeur (l) de l'ovocyte basal sont mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire monté sur un microscope préalablement étalonné.
- Le poids frais des ovaires sera également déterminé à l'aide d'une balance Sartorius Handy, avec une précision de $\pm 0,1$ mg.

- Le volume (V) exprimé en mm³ est obtenu grâce à la formule suivante (Lambreas *et al.*, 1991).

$$V = \frac{4\pi}{3} (L/2) (l/2)^2$$

1.7. Microscopie électronique à transmission

L'épaisseur du chorion a été déterminée sur des coupes semi-fines préparées selon la technique de microscopie électronique à transmission, réalisée selon Karnovsky (1965) modifiée par Friend & Farquhar (1967). Les échantillons doivent passer par plusieurs étapes afin d'éviter toute altération des tissus et assurer la stabilité de leurs structures macromoléculaires. Ces étapes sont : la fixation, le rinçage, la post-fixation, la déshydratation et l'inclusion.

a. Fixation, rinçage et post-fixation :

Les ovocytes basaux prélevés des séries témoins et traitées sont immédiatement déposés dans des tubes eppendorf contenant du fixateur (paraformaldéhyde 5%, glutaraldéhyde 25%, sucrose et de tampon cacodylate 0,4 M ; pH 7,4). La fixation rend les cellules inaltérables, perméables aux colorants et permet de préserver leur structure macromoléculaire. Si la fixation est prolongée (plusieurs semaines à 4°C), le rinçage sera également prolongé. Il se fait dans le mélange : cacodylate 0,4 M (10 ml), sucrose (12ml) et eau distillée (8 ml) avec deux bains de 20 minutes chacun et un troisième jusqu'au lendemain. Une post fixation est réalisée pendant une heure à température ambiante dans le mélange : tétroxyde d'osmium à 4% (2,5 ml), cacodylate 0,4 M (2,5 ml), sucrose et eau distillée (2 ml), pendant une heure. Le tétroxyde d'osmium fixe et stabilise les doubles couches lipidiques ainsi que les protéines tissulaires.

b. Déshydratation et l'inclusion :

La déshydratation se fait dans des bains d'alcool éthylique à degrés croissants (30°, 70°, 95°, 100°) et se complète par un bain d'oxyde de propylène qui permet l'éclaircissement des pièces. A ce stade les échantillons sont encore mous pour être coupés et doivent être inclus dans un produit rigide qui est la résine dont la composition est la suivante : 60 ml de DDSA (dodecyl sulfate aldéhyde), 25 ml d'épikote et 20 ml d'araldite. Ce mélange est utilisé avec un accélérateur le DMP 30 [(2,4, 6-tris (diméthylamino -méthyl phénol)] à 4% pour polymériser la résine. Les échantillons doivent d'abord subir une imprégnation à la résine (trois bains sont réalisés à cet effet). Au terme de l'imprégnation, les échantillons sont inclus dans des moules munis de la référence remplis préalablement avec le mélange de résine additionné d'accélérateur. Enfin, les moules sont mis dans une étuve à 37°C pendant trois heures. Les pièces déplacées sont réorientées, et tous les moules sont remis dans une étuve à 60° pendant trois jours pour assurer la polymérisation de la résine.

c. Confection des coupes et coloration :

Des coupes semi-fines sont réalisées au moyen d'un ultra microtome LKB 2088, en utilisant des couteaux on verre fabriqués à l'aide d'un Knife Maker LKB 7800. Elles seront montées sur des lames et colorées au bleu de toluidine (Borax de Na à 1% et bleu de toluidine à 1% dans l'eau distillée) pendant 3 à 5 min, puis examinées au microscope photonique pourvu d'un micromètre oculaire préalablement étalonné. L'estimation de l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux se fait au microscope photonique à l'aide d'un micromètre oculaire préalablement étalonné.

1.8. Potentiel reproducteur :

Plusieurs paramètres du potentiel reproducteur ont été déterminés suite à l'application de différents traitements, à savoir :

- La durée de la période de pré-oviposition : déterminée par le nombre de jours séparant l'émergence et le début de la ponte.
- La durée de la période de l'oviposition : déterminée par la durée (en jours) de la ponte.

- La fécondité des femelles : c'est le nombre total d'œufs pondus par femelle durant toute la période d'oviposition.
- La viabilité des œufs : c'est le nombre œufs éclos parmi la totalité des œufs pondus par femelle.

1.9. Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes :

1.8.1. Principe du dosage :

Le dosage enzymo-immunologique (EIA) est une technique qui a été adaptée aux ecdystéroïdes par Porcheron *et al.* (1989) puis modifiées par De Reggi *et al.* (1992). Cette technique utilise comme traceur enzymatique la peroxydase couplée à la 2-succinyle 20- hydroxyecdysone. Le traceur enzymatique est mis en compétition avec les ecdystéroïdes des extraits biologiques pour les sites d'un anticorps anti-ecdystéroïdes de lapin (anticorps primaire). Les complexes sont fixés par un second anticorps polyclonal anti-immunoglobuline de lapin (Jackson Immunoresearch) retenu sur une microplaque à 96 puits (NUCN Immunoplate Maxisorp F96, Danemark). Au bout de trois heures d'incubation, les éléments non retenus seront éliminés au cours d'un rinçage des plaques (Fig.). Un réactif de révélation de la peroxydase, la tétraméthyl benzidine au TMB (Sigma, France) est utilisé. Celle-ci se fait sous agitation pendant 15 à 20 minutes et les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (Labsystem, Finlande) à 630 nm sans ou avec addition d'H₂SO₄ (6 N), respectivement. La mesure de la quantité de la peroxydase fixé permet de déterminer la quantité d'ecdystéroïdes contenue dans les échantillons biologiques par comparaison avec une courbe de référence obtenue avec des solutions standard d'ecdysone (E).

1.8.2. Prélèvement des échantillons et extraction des hormones :

Les chrysalides et les ovaires des séries témoins et traitées *in vivo* préalablement pesés, sont conservés dans des tubes eppendorf contenant 500 µl de méthanol. Après broyage aux ultrasons et centrifugation à 2700 tours pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré et évaporé dans un bain-marie) sec réglé 60°C. Les extraits secs obtenus sont dissous dans 500 µl de tampon EIA (0,1 M ; pH= 7,4) et conservés au congélateur jusqu'au dosage.

1.8.3. Présentation des différentes étapes du dosage EIA :

- **Coating et saturation des plaques :** Le coating est un traitement qui permet de fixer les immunoglobulines anti-IgG de lapin (pour le dosage avec un anticorps polyclonal de lapin) sur la phase solide des microplaques, en distribuant 200 µl d'une solution purifiée d'immunoglobuline anti-IgG (Sigma, Angleterre) dans chaque puits. Cette solution est préparée en rajoutant une quantité (200 µl) de solution mère de tampon phosphate (0,05 N pH= 7,4) et 400 ml d'eau distillée à 2 mg d'anti-immunoglobuline. Ce traitement est suivi d'une saturation pendant 1 heure dans un tampon EIA à 0,3 % d'albumine bovine (Sigma, France) distribuée à raison de 100 µl dans chaque puits. Les plaques seront conservées à 4°C et peuvent être utilisées 12 heures après la saturation.

-**Préparation de la courbe standard :** Des solutions diluées (10^{-14} à 10^{-7} M) sont obtenus à partir de deux hormones ecdystéroïdes standard utilisées dans ce dosage, à savoir l'ecdysone (E) de poids moléculaire de 464,6 g et la 20-hydroxyecdysone (20E) de poids moléculaire 480,6 g.

-**Distribution des différents échantillons :** Après lavage de la microplaque, la répartition des échantillons dans les différents puits se fait comme suit :

- Le premier puits de la première colonne est réservé au témoin dans lequel on distribue 100 µl du tampon EIA et 50 µl du traceur enzymatique.

- Les puits restant de la première colonne sont réservés aux blancs (B_0), en absence d'hormone, dans lesquels on distribue 50 µl du tampon EIA, 50 µl du traceur enzymatique et 50 µl d'anticorps.

- Dans la deuxième et la troisième colonne, on distribue en double respectivement 50 µl des différentes concentrations des solutions standards (la gamme), 50 µl du traceur enzymatique et 50 µl d'anticorps.

- Tous les puits restants sont réservés aux échantillons à doser dans lesquels on distribue respectivement 50 µl d'échantillon, 50 µl du traceur et 50 µl d'anticorps.

Le volume final dans chaque puits doit être de 150 µl. Enfin la microplaque est mise sous agitation pendant trois heures à l'obscurité.

-Lavage et révélation : Au terme de l'incubation, la microplaque est lavée afin d'éliminer tout élément non fixé sur l'anticorps utilisé. La tétraméthyl benzidine est utilisée pour la coloration. Celle-ci se fait sous agitation pendant 15 à 30 minutes.

-Lecture des densités optiques : Les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque à 630 nm, puis à 450 nm après addition d'acide sulfurique (6 N) qui permet d'amplifier et de stabiliser la coloration. Elles sont exprimées sous forme d'un rapport :

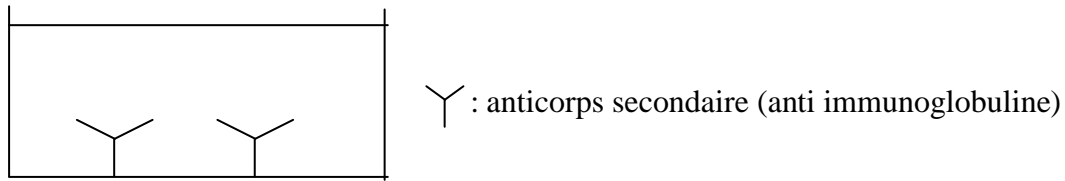
$$\mathbf{B/B_0 (\%) = (B-T) / (B_0-T) \times 100}$$

B : absorbances de l'échantillon ou du standard.

B₀ : absorbances en absence d'hormone.

T : absorbances en absence d'hormone et d'anticorps (T : négligeable).

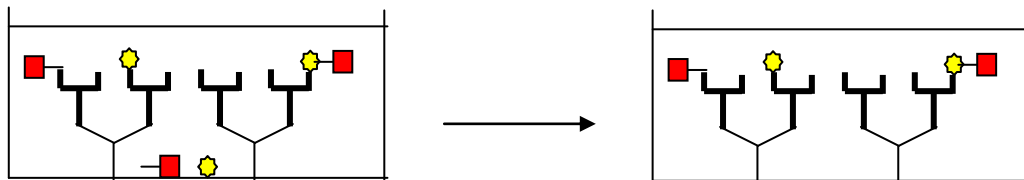
Etape 1: Coating (24 heures à température ambiante) et saturation (12 heures à 4°C)



Etape 2: Répartition des différents éléments :

—■ le traceur enzymatique (☀), l'échantillon et l'anticorps primaire (T)

Etape 3: Réaction immunologique puis lavage



Etape 4: Révélation de la peroxydase avec le TMB (une heure à température ambiante)

Etape 5: Lecture des densités optiques à 630 nm :

coloration faible \Rightarrow forte dose d'ecdystéroïde

coloration forte \Rightarrow faible dose d'ecdystéroïde

Figure 5. Principe du dosage EIA (d'après Porcheron *et al.*, 1989).

1.9. Analyse statistique des données :

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Minitab 14 (2003). Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm s$). Différent test tels que l'analyse de la variance à un et à deux critères de classifications, suivi par le test de Tukey, le test «t» de Student, ainsi que la régression linéaire, ont été utilisés.

2. Résultats

2.1 Efficacité du méthoxyfénazole et du pyriproxifène sur l'inhibition de l'exuviation adulte :

L'efficacité d'un analogue de l'hormone de mue (méthoxyfénazole) et d'un analogue de l'hormone juvénile (pyriproxifène) a été testé en application topique sur des chrysalides nouvellement exuviées d'*E. kuehniella*. La mortalité a été relevée au terme du développement nymphal. Les doses d'inhibition de l'exuviation adulte (DI50) qui caractérisent la toxicité d'un insecticide ont été déterminées. Ces valeurs représentent la quantité de matière active pour détruire 50% de la population traitée après correction de la mortalité.

2.1.1. Efficacité du méthoxyfénazole sur l'inhibition de l'exuviation adulte:

Après traitement avec le RH-2485, en application topique à différentes doses (0,004- 0,008- 0,02 et 0,04 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) sur des chrysalides nouvellement exuviée d'*E. kuehniella*, nous avons mentionnée dans le tableau 1 le taux observé d'inhibition de l'exuviation. Elle est de l'ordre de $7,77 \pm 1,57$ chez les séries témoins et augmente chez les séries traitées avec une relation dose- réponse, elle atteint $88,89 \pm 4,16$ avec la dose la plus élevée (0,04 μg).

Tableau 1: Effet du **RH-2485** ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephesia kuehniella*, sur le taux observé d'inhibition de l'exuviation adulte ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 10 individus).

Répétitions	Témoins	0,004 μg	0,008 μg	0,02 μg	0,04 μg
1	6,66	36,66	46,66	60,00	83,33
2	6,66	40,00	43,33	66,66	90,00
3	10,00	33,33	50,00	63,33	93,33
m \pm s	$7,77 \pm 1,57$	$36,66 \pm 2,72$	$46,66 \pm 2,72$	$63,33 \pm 2,72$	$88,89 \pm 4,16$

Les mortalités observées sont corrigées par la formule d'Abott (1925) qui montre l'effet réel des différentes doses (Tableau 2).

Tableau 2: Effet du **RH-2485** ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 10 individus).

Répétitions	0,004 μg	0,008 μg	0,02 μg	0,04 μg
1	32,14	42,85	57,71	82,14
2	35,71	39,28	64,28	89,28
3	25,92	44,44	59,25	92,58
m \pm s	31,26 \pm 4,05	42,19 \pm 2,16	60,41 \pm 2,81	88,00 \pm 4,36

Les taux corrigés d'inhibition de l'exuviation adulte subissent une transformation angulaire (Tableau 3) et font l'objet d'une analyse de la variance à un seul critère de classification (Tableau 4). Les résultats indiquent qu'il existe un effet dose très hautement significatif ($P < 0,001$). Le classement des doses par le test de Tukey révèle trois groupes de doses. Le premier A renferme les doses 0,004 – 0,008, le second B la dose 0,02 μg et le troisième C la dose 0,04 μg (Tableau 5).

Tableau 3 : Effet du **RH-2485** ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : transformation angulaire ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 10 individus).

Répétitions	0,004 μg	0,008 μg	0,02 μg	0,04 μg
1	34,45	40,08	49,60	64,90
2	36,87	38,65	53,13	70,63
3	30,66	41,55	50,18	74,66
m \pm s	33,99 \pm 2,56	40,09 \pm 1,18	50,97 \pm 1,55	70,06 \pm 4,00

Tableau 4: Effet du **RH-2485** ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : analyse de la variance ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 10 individus).

Source de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Factorielle	3	5535,8	1845,3	102,78	0,0001***
Résiduelle	8	143,8	18,0		
Totale	11	5679,5			

*** : Différence hautement significative

Tableau 5: Effet du **RH-2485** ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : classement des doses ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 10 individus).

Doses (μg)	Mortalité corrigées	Mortalité transformées	Classement
0,004	$31,26 \pm 4,05$	$33,99 \pm 2,56$	A
0,008	$42,19 \pm 2,16$	$40,09 \pm 1,18$	A
0,02	$60,41 \pm 2,81$	$50,97 \pm 1,55$	B
0,04	$88,00 \pm 4,36$	$70,06 \pm 4,00$	C

L'équation de la droite de régression expriment le probit des pourcentages de mortalité corrigée en fonction du logarithme décimal des doses a été établie avec un coefficient de détermination ($R^2= 92,9 \%$) elle révèle une liaison positive très forte entre le probit et le logarithme décimal des doses (Tableau 6, Fig. 6). Les doses d'inhibition 50 (DI_{50}) et 90 (DI_{90}), déterminées à partir de la droite de régression sont respectivement de $0,01 \mu\text{g}/\text{insecte}$ (intervalle de confiance : $0,009 - 0,04$ à (95%) et $0,37 \mu\text{g}/\text{insecte}$ (intervalle de confiance : $0,12 - 0,51$ à (95%) avec un slope de 3,80 (Tableau 13).

Tableau 6: Effet du **RH-2485** ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : transformation en probits des mortalités corrigées ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 10 individus).

Doses ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$)	0,004	0,008	0,02	0,04
Mortalités corrigées (%)	31,26	42,19	60,41	88,00
Probits	4,5875	4,7467	5,0020	5,5244

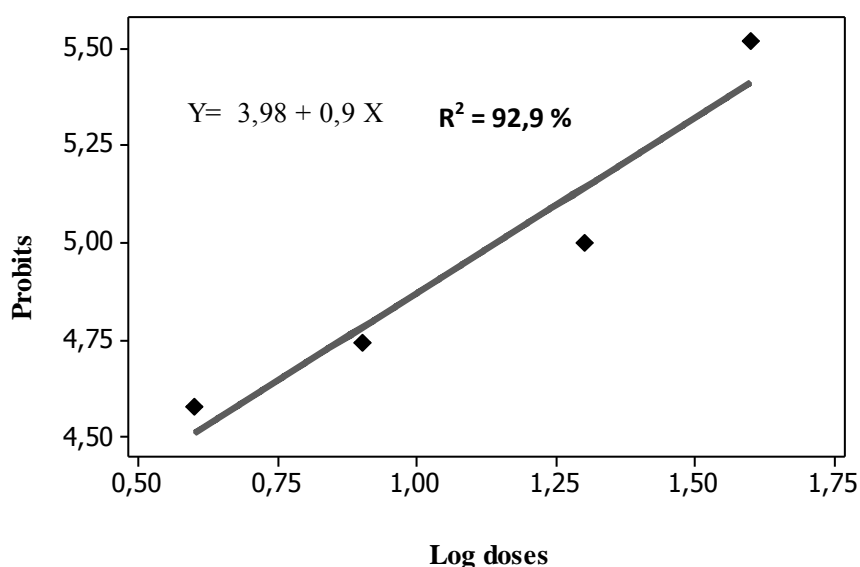


Figure 6. Efficacité du RH-2485, administré par application topique à des chrysalides nouvellement exuviées d'*E. kuehniella* : analyse des probits.

2.1.2. Efficacité du pyriproxifène sur l'inhibition de l'exuviation adulte :

L'inhibition de l'exuviation adulte est le critère qui nous a permis d'estimer la toxicité d'un régulateur de croissance le pyriproxifène testé à quatre doses (1,25-2,50-5 et 10 ng/insecte) en application topique. Le pourcentage de l'inhibition de l'exuviation observé à été relevé chez les séries témoins $7,07 \pm 1,7 \%$ passe à $85,94 \pm 4,52$ chez les séries traitées avec la dose 10 ng/insecte (Tableau 7).

Tableau 7 : Effet du pyriproxyfène (ng /insecte) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux observé d'inhibition de l'exuviation adulte ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 10 individus).

Répétitions	Témoins	1,25 ng	2,50 ng	5,00 ng	10,00 ng
1	6,06	41,66	58,33	75,00	83,33
2	9,09	33,33	50,00	66,66	83,33
3	6,06	33,33	50,00	66,66	91,16
m ± s	7,07 ± 1,75	44,44 ± 4,82	52,78 ± 4,81	69,44 ± 4,81	85,94 ± 4,52

Tableau 8 : Effet du pyriproxyfène (ng /insecte) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 10 individus).

Répétitions	1,25 ng	2,50 ng	5,00 ng	10,00 ng
1	37,89	55,64	73,38	82,25
2	26,66	45,00	63,32	81,66
3	29,02	46,77	64,50	90,58
m ± s	31,19 ± 5,92	49,14 ± 5,70	67,07 ± 5,50	84,83 ± 4,99

Après transformation angulaire des taux corrigée de l'inhibition de l'exuviation adulte présenté dans le tableau 9 les donné transformé subissent une analyse de la variance à un critère de classification (Tableau 10). L'analyse statistique des données révèle des effets doses très hautement significative ($p < 0,0001$). Le classement des doses par le test de Tukey révèle quatre groupes de doses. Le premier A renferme la dose 1,25 ng , le second B la dose 2,50 ng, le troisième C la dose 5,00 ng et le quatrième D la dose 10, 00 ng (Tableau 11).

Tableau 9: Effet du pyriproxifène (ng /insecte) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : transformation angulaire ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 10 individus).

Répétitions	1,25	2,50	5,00	10,00
1	38,06	48,45	58,69	64,90
2	31,31	42,13	52,54	64,90
3	32,58	43,28	54,63	72,54
m ± s	33,98 ± 3,58	44,62 ± 3,37	55,29 ± 3,13	67,45 ± 4,41

Tableau 10 : Effet du pyriproxifène (ng /insecte) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : analyse de la variance ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 10 individus).

Source de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Factorielle	3	1852,1	617,4	46,21	0,0001***
Résiduelle	8	106,9	13,4		
Totale	11	1959,0			

*** : Différence hautement significative

Tableau 11: Effet du pyriproxifène (ng/2 μ l) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : classement des doses ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 10 individus).

Doses (ng)	Mortalité corrigées	Mortalité transformées	Classement
1,25	31,19 ± 5,92	33,98 ± 3,58	A
2,50	49,14 ± 5,70	44,62 ± 3,37	B
5,00	67,07 ± 5,50	55,29 ± 3,13	C
10,0	84,83 ± 4,99	67,45 ± 4,41	D

L'équation de la droite de régression du probit du pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme décimal des doses, avec un coefficient de détermination $R^2 = 99,7\%$, révèle une liaison forte entre les probits et les logarithmes décimaux des doses testées (Tableau 12, Fig. 7). Les doses d'inhibition 50 (DI_{50}) et 90 (DI_{90}), déterminées à partir de la droite de régression sont respectivement de 2,53 ng/insecte (intervalle de confiance : 1,69- 3,77 à (95%)) et 14,86 ng/insecte (intervalle de confiance : 9,97– 22,14 à (95%)) avec un slope de 3,97 (Tableau 13).

Tableau 12: Effet du pyriproxifène (ng /insecte) ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) administré *in vivo* par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le taux corrigé d'inhibition de l'exuviation adulte : transformation en probits des mortalités corrigées ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 10 individus).

Doses (ng)	1,25 ng	2,50 ng	5,00 ng	10,00 ng
Mortalités corrigées (%)	31,19	49,14	67,07	84,83
Probits	4,509	4,977	5,442	6,027

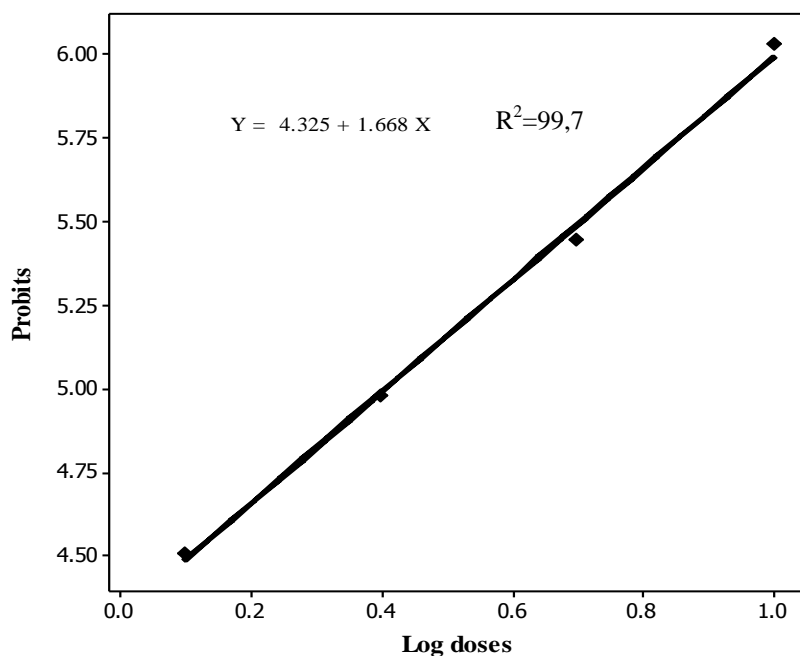


Figure 7. Efficacité du pyriproxifène, administré par application topique à des chrysalides nouvellement exuviées d'*E. kuehniella* : analyse des probits.

Tableau 13: Efficacité du RH- 2485($\mu\text{g/insectel}$) et du pyriproxifène (ng/insecte), administré par application topique à des chrysalides nouvellement exuviées d'*E. kuehniella* : Analyse des probits de la DL50 et DL90 (IC : intervalle de confiance).

Traitement	Droite de régression	Slope	CL50 (IC)	CL90 (IC)
Méthoxyfénoside	$Y = 3,98 + 0,9 X$	3,80	0,01 (0,009-0,04)	0,37 (0,12 – 0,51)
pyriproxifène	$Y = 4,32 + 1,66 X$	3,97	2,53(1,69 - 3,77)	14,86 (9,97- 22,14)

2.2. Effet du méthoxyfénoside et du pyriproxifène administré séparément sur la morphométrie de l'ovaire :

L'effet *in vivo* du méthoxyfénoside et du pyriproxifène a été réalisé par application topique respectivement aux doses d'inhibition 50 (DI_{50}) 0,01(μg) et 2,53ng/ 2 μl d'acétone en traitement séparé sur des chrysalides nouvellement exuviées d'*E. kuehniella*. Le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires, la taille et le volume de l'ovocyte basal, ont été déterminés sur des femelles témoin et traitées. Les dissections des femelles dès leur émergence adulte permettent de prélever les ovaires qui seront dégagés du corps gras et immédiatement pesés.

Les résultats obtenus montrent que le méthoxyfénoside et le pyriproxifène entraînent une réduction très hautement significative ($p < 0,001$) du poids frais des ovaires par rapport aux témoins puisqu' il passe de $6,09 \pm 0,57$ chez les témoins à $4,65 \pm 0,50$ chez les traités avec le méthoxyfénoside et à $4,11 \pm 0,69$ chez les traités avec le pyriproxifène (Tableau 14, Fig. 8).

Tableau 14: Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le poids frais (mg) des ovaires ($m \pm s$; $n= 6$).

Témoin	RH-2485 ($\text{DI}_{50}=0,01 \mu\text{g}$)	Pyriproxifène ($\text{DI}_{50}=2,53 \text{ ng}$)
$6,09 \pm 0,57 \text{ a}$	$4,65 \pm 0,50 \text{ b}$	$4,11 \pm 0,69 \text{ b}$

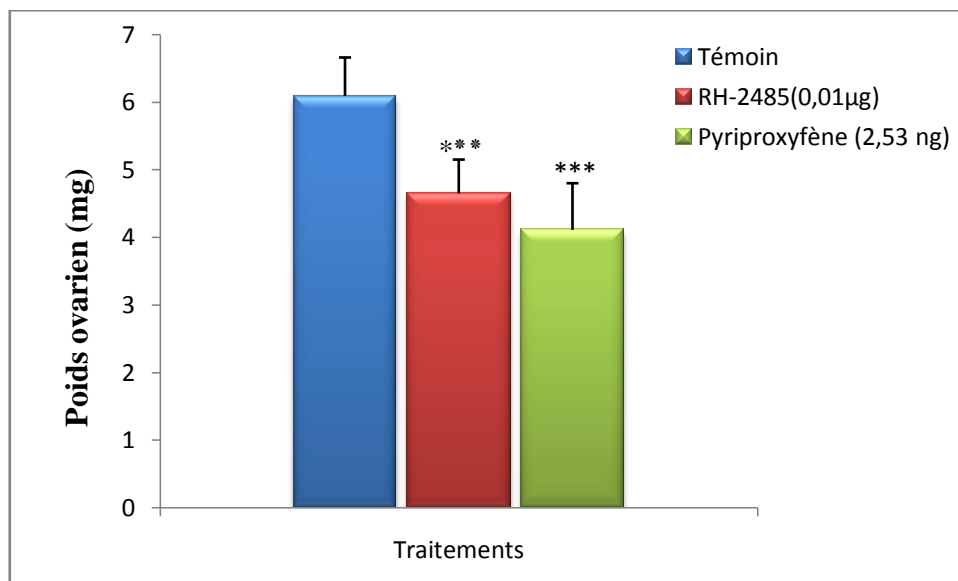


Figure 8. Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le poids frais (mg) des ovaires ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux témoins.

Concernant le nombre d'ovocytes par paire d'ovaire, le tableau 15 et la figure 9 montrent que le traitement avec le méthoxyfénoside et le pyriproxifène entraînent une réduction hautement significative ($p= 0,02$) du nombre d'ovocyte par paire d'ovaire par rapport aux témoins et la comparaison des séries traitées entre elles ne présentent pas une différence significative.

Tableau 15 : Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/$ insecte) et du pyriproxifène ($\text{ng}/$ insecte) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le nombre des ovocytes par paire d'ovaires ($m \pm s$; $n= 6$).

Témoin	RH-2485 (0,01 μg)	Pyriproxifène (2,53 ng)
103,00 \pm 8,27 a	82,00 \pm 9,06 b	76,17 \pm 9,11 b

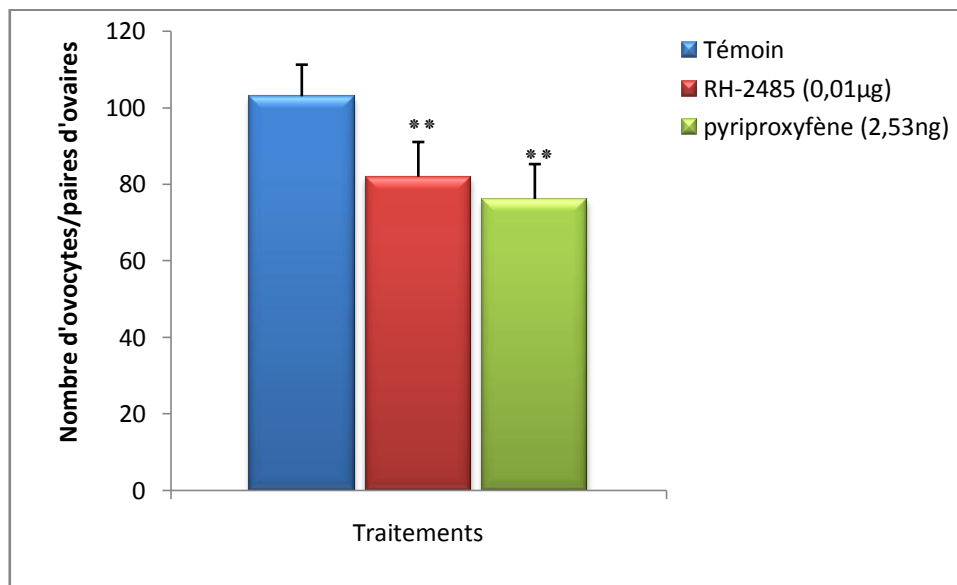


Figure 9. Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/$ insecte) et du pyriproxifène ($\text{ng}/$ insecte) administrés par application topique à l'exuviation nymphal d'*Ephestia kuehniella*, sur le nombre des ovocytes par paire d'ovaires ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

La comparaison des valeurs moyennes obtenues dans les séries traitées révèle que le pyriproxifène provoque une réduction très hautement significative ($p=0,001$) de la longueur de l'ovocyte basal (Tableau 16, Fig. 10) et une différence significative ($p=0,05$) sur la largeur de l'ovocyte basale. Cependant, l'analyse statistique ne révèle aucun effet significatif ($p> 0,05$) sur la longueur de l'ovocyte basal chez les séries traitées avec le méthoxyfénozide par rapport aux témoins. La comparaison des séries traitées entre elles présente une différence significative par rapport à la longueur de l'ovocyte basale.

Tableau 16: Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/$ insecte) et du pyriproxifène ($\text{ng}/$ insecte) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 6$).

Traitements	Témoin	RH-2485 (0,01 μg)	Pyriproxifène (2,53 ng)
Longueur (μm)	454,4 \pm 43,2 a	430 \pm 36,2 a	412,6 \pm 22,70 b
Largeur (μm)	308,17 \pm 28,2 a	293,1 \pm 22,3 a	291,75 \pm 8,55 b

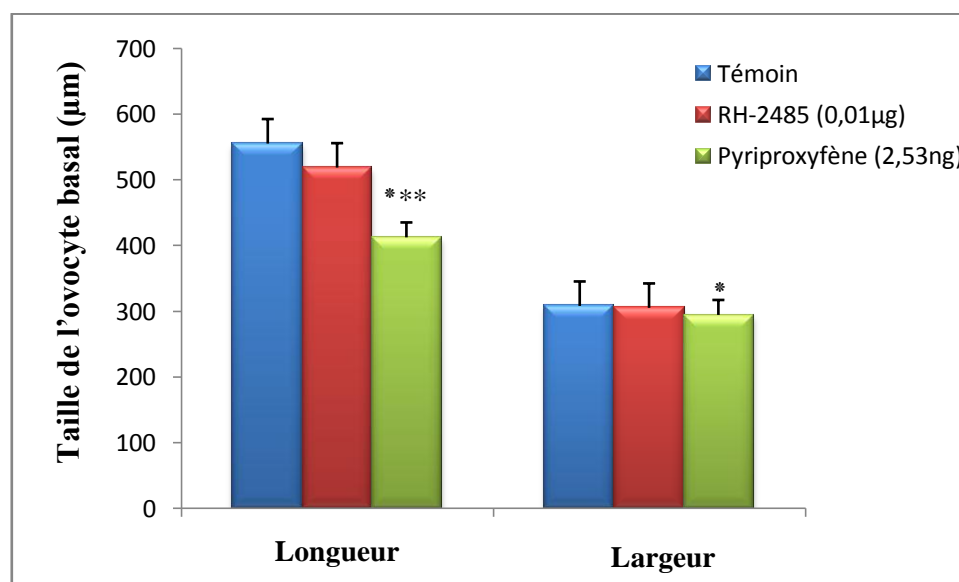


Figure 10. Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/$ insecte) et du pyriproxifène ($\text{ng}/$ insecte) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur la longueur (μm) et la largeur (μm) de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative ($p< 0,05$) par rapport aux témoins.

Le pyriproxifène entraîne une réduction hautement significative du volume de l'ovocyte basal ($p < 0,01$) alors que le RH-2485 réduit le volume de l'ovocyte basal d'une manière significative ($p < 0,05$) (Tableau 17, Fig. 11).

Tableau 17: Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le volume (mm^3) de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 6$).

Traitements	Témoin	RH-2485 (0,01 μg)	Pyriproxifène (2,53ng)
Volume (mm^3)	0,026 \pm 0,003 a	0,021 \pm 0,001 b	0,018 \pm 0,001 c

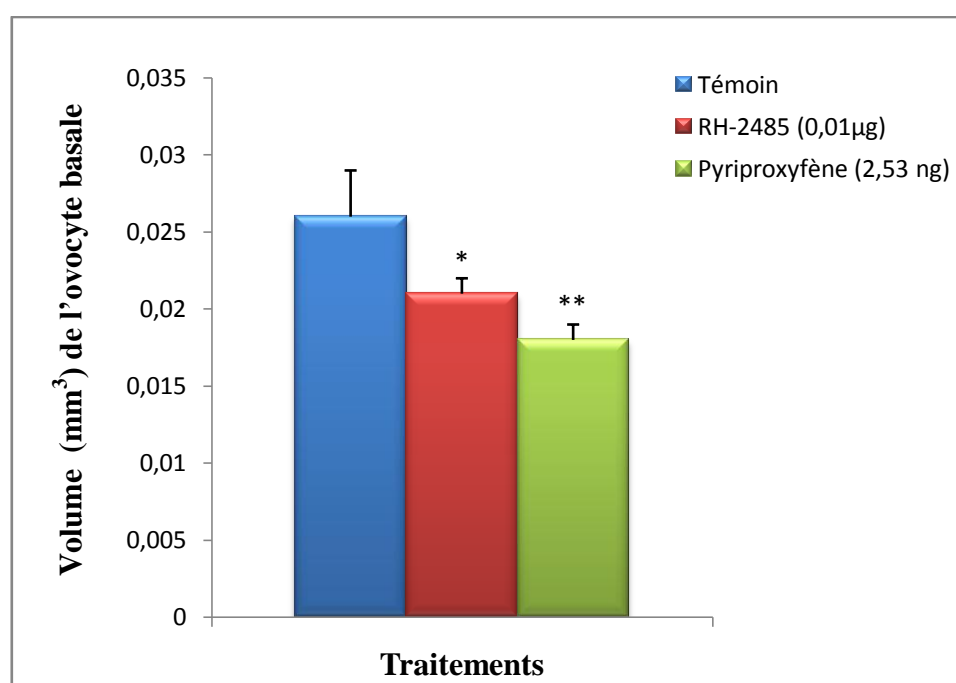


Figure 11. Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur le volume de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

2. 3. Effet *in vivo* d'un traitement seul ou combinant le méthoxyfénazole et le pyriproxifène sur l'épaisseur du chorion :

La fin de la vitellogénèse est caractérisée par la formation des enveloppes de l'œuf (membrane vitelline et chorion) sécrétées par les cellules folliculaires (Lafont & Toullec, 1997). Ces dernières présentent de très nombreux granules denses d'origine golgienne. Elles s'accumulent en plage dans le cytoplasme, sécrétant des granules de taille croissante. La sécrétion de ce matériel entraîne la formation du chorion (Carcupino & Lucchi, 1995).

2.3.1. Effet du méthoxyfénozide et du pyriproxifène seuls sur l'épaisseur du chorion :

L'épaisseur du chorion a été estimée sur des coupes semi-fine de l'ovocyte basal. Les observations au microscope photonique des ovocytes femelles traitées par le RH-2485 montrent une réduction très hautement significative ($p=0,0001$), par rapport au témoin. L'épaisseur du chorion passe de $3,68 \pm 0,12$ chez les témoins à $2,77 \pm 0,17 \mu\text{m}$ chez les traités. En effet l'analogue de l'hormone juvénile est sans effet significatif ($p=0,12$) sur l'épaisseur du chorion (Tableau 18, Fig. 12).

Tableau 18: Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 4$).

Traitements	Témoin	RH-2485 (0,01 μg)	Pyriproxifène (2,53 ng)
Epaisseur (μm)	$3,68 \pm 0,12$ a	$2,77 \pm 0,17$ b	$3,57 \pm 0,12$ a

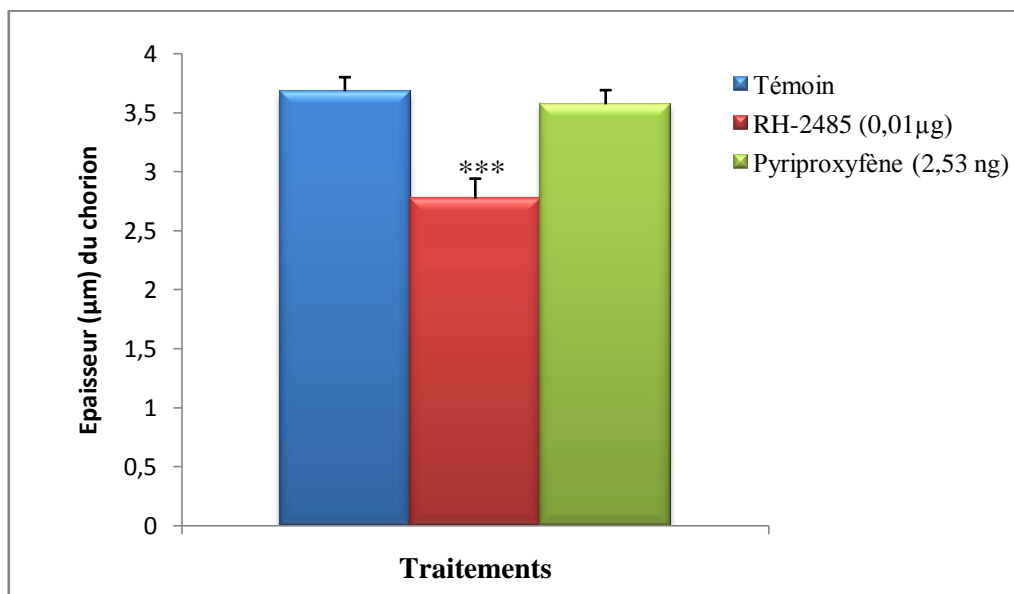


Figure 12. Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) et du pyriproxifène ($\text{ng}/\text{insecte}$) administrés par application topique à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella*, sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal ($m \pm s$; $n= 4$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

2.3.2. Effet du traitement combiné sur l'épaisseur du chorion :

La combinaison pyriproxifène/ RH- 2485 entraîne une réduction très hautement significative ($p= 0,001$) de l'épaisseur du chorion de $3,68 \pm 0,12$ à $2,72 \pm 0,20$ μm par rapport aux témoins. En comparaison avec les femelles traitées avec le RH-2485 puis le pyriproxifène, nos résultats ne révèlent aucune différence significative ($p= 0,25$) (Tableau 19, Fig. 13).

Tableau 19: Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxifène, sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal chez *Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$).

Traitements	Témoin	RH-2485 à 0j Pyriproxifène à 1j	Pyriproxifène à 0j RH-2485 à 1j
Epaisseur (μm)	$3,68 \pm 0,12$ a	$3,53 \pm 0,18$ a	$2,72 \pm 0,20$ b

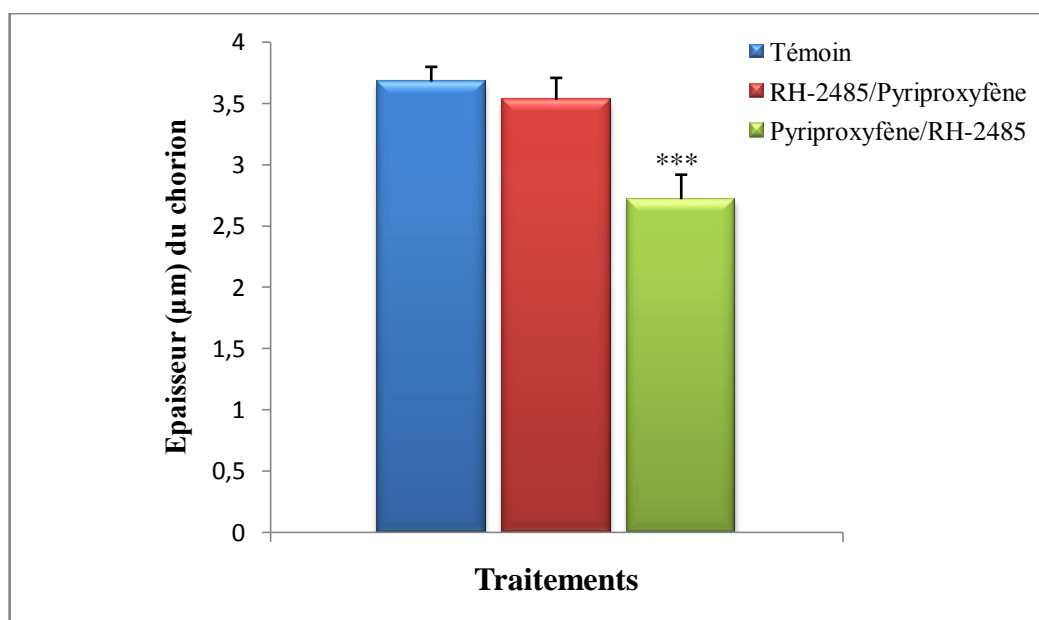


Figure 13. Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxifène, sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal chez *Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$).

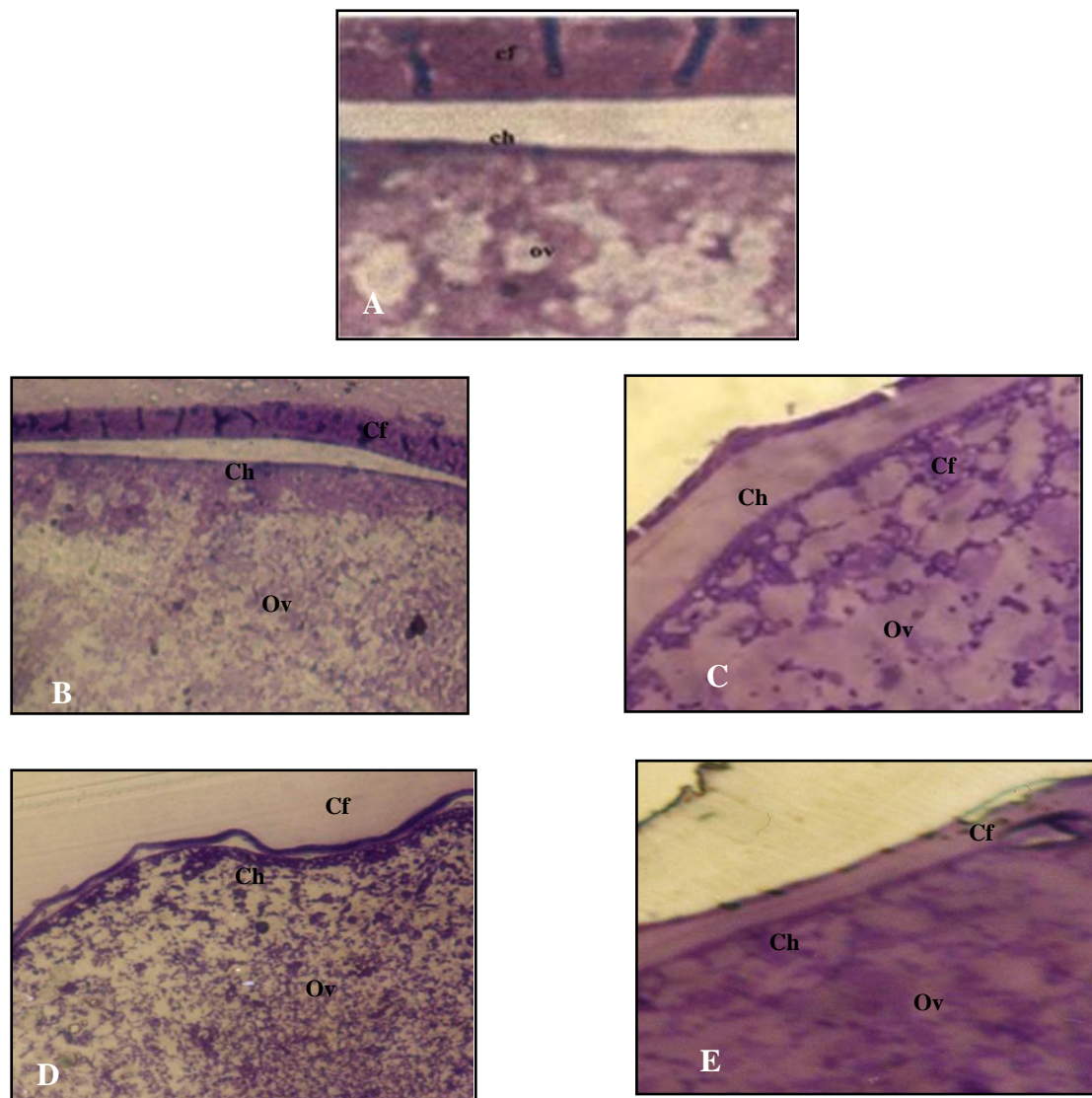


Figure 14. Structure semi fine de l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux d'*E. kuehniella*. Témoin (A) (x491) et les séries traitées avec le RH-2485(B)(x267), pyriproxyfène (C) (x649), pyriproxyfène /RH-2485 (D)(x367) et RH-2485/pyriproxyfène (E)(x538) (Ch : Chorion, Cf : Cellule foliculaire, Ov : Ovocyte).

2.4. Effet *in vivo* d'un traitement combinant le méthoxyfénoside et le pyriproxifène sur le potentiel reproducteur :

Le potentiel reproducteur chez les insectes notamment chez les Lépidoptères, est déterminé par le temps de la vie nutritionnelle au stade adulte, la qualité environnemental ainsi que par l'accouplement (Ramswamy *et al.*, Cole *et al.*, 2002). Un suivi régulier des couples permet de déterminer les périodes de préoviposition et d'oviposition, le nombre d'œufs pondus et éventuellement le pourcentage d'éclosions des œufs.

2.4.1. Effet du RH- 2485 seul sur les évènements de la reproduction :

Dans nos condition expérimentales (Température 27°C, humidité relative à 80%), la ponte chez *E. kuehniella*, débute à $1,16 \pm 0,25$ jour après l'émergence des adultes et se poursuit jusqu'à $3,50 \pm 0,44$ jours chez les femelles témoins. Le RH-2485 administré par application topique à des chrysalides nouvellement écloses n'affecte pas la période de préoviposition mais réduit significativement ($p= 0,05$) la période d'oviposition (Tableau 20, Fig. 15).

Tableau 20 : Effet du RH-2485 sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez les femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ($(m \pm s ; n= 6)$).

Traitements	Témoin	RH-2485 (0,01µg)
Période de préoviposition	$1,16 \pm 0,25$ a	$1,16 \pm 0,25$ a
Période d'oviposition	$3,50 \pm 0,44$ a	$2,33 \pm 0,40$ b

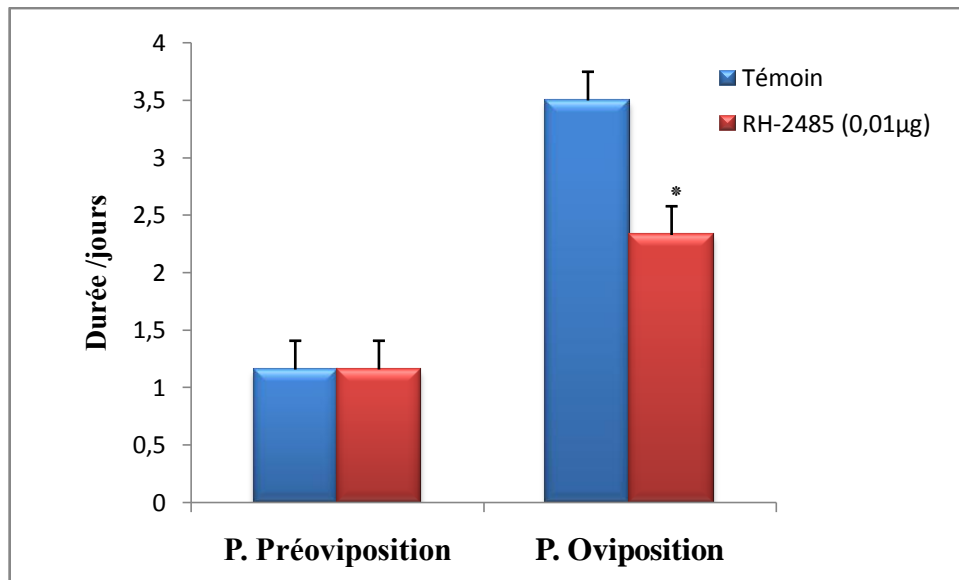


Figure 15. Effet du RH-2485 sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez les femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides (($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

La fécondité des femelles traitées avec le RH-2485 a été réduite d'une manière très hautement significative ($p= 0,001$) par rapport aux témoins et on remarque le même effet sur la viabilité des œufs (Tableau 21, Fig. 16).

Tableau 21: Effet du RH-2485 sur la fécondité (œufs/femelles) et la viabilité des œufs (%) chez les femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides (($m \pm s$; $n= 6$).

Traitements	Témoin	RH-2485 (0,01µg)
Fécondité (œufs/femelles)	204,0 \pm 3,00 a	124,33 \pm 4,25 b
Viabilité des œufs (%)	95,00 \pm 4,00 a	68, 83 \pm 2,99 b

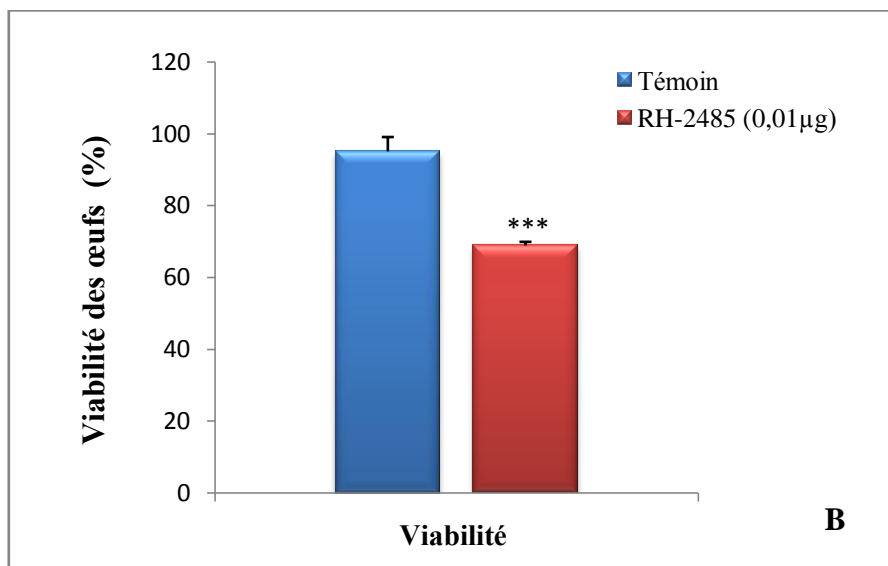
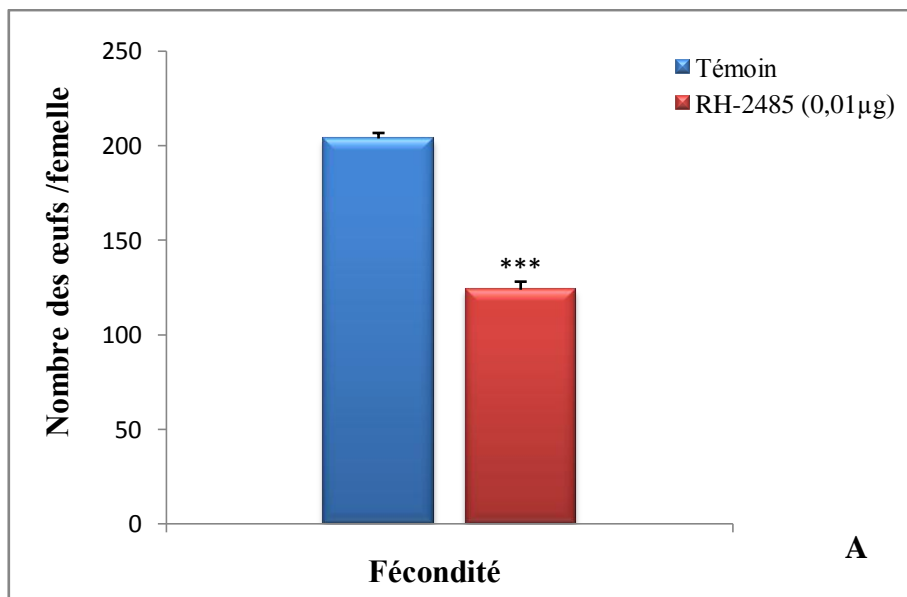


Figure 16. Effet du RH-2485 sur la fécondité (œufs/femelles) **A** et la viabilité des œufs (%) **B** chez les femelles *d'E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ((m ± s ; n= 6). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

2.4.2. Effet du pyriproxifène seul sur les évènements de la reproduction :

Le pyriproxifène a été évalué en application topique sur des chrysalides nouvellement exuvies à la dose d'inhibition 50 (2,53 ng/ insecte) sur les paramètres suivants : la durées des périodes de préoviposition et d'oviposition, la fécondité et le pourcentage d'éclosion des œufs. Le traitement avec le pyriproxifène provoque un allongement de la période de préoviposition d'une manière très hautement significative ($p=0,0001$). Cependant, ce composé réduit significativement la période d'oviposition (Tableau 22, Fig. 17).

Tableau 22: Effet du pyriproxifène sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez les femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ($(m \pm s ; n= 6)$).

Traitements	Témoin	Pyriproxifène (2,53 ng)
Période de préoviposition	$1,16 \pm 0,25$ a	$3,00 \pm 0,44$ b
Période d'oviposition	$3,50 \pm 0,44$ a	$2,16 \pm 0,25$ b

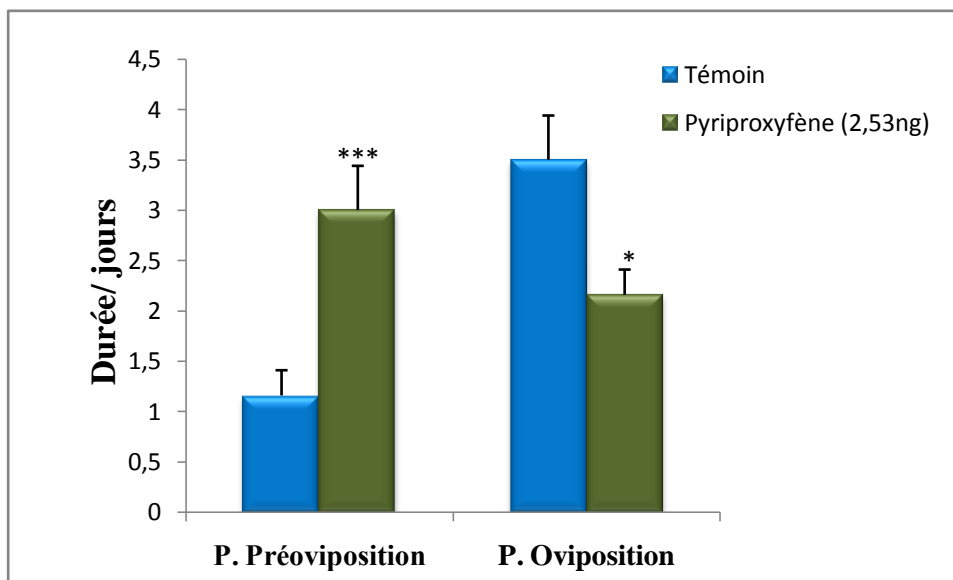
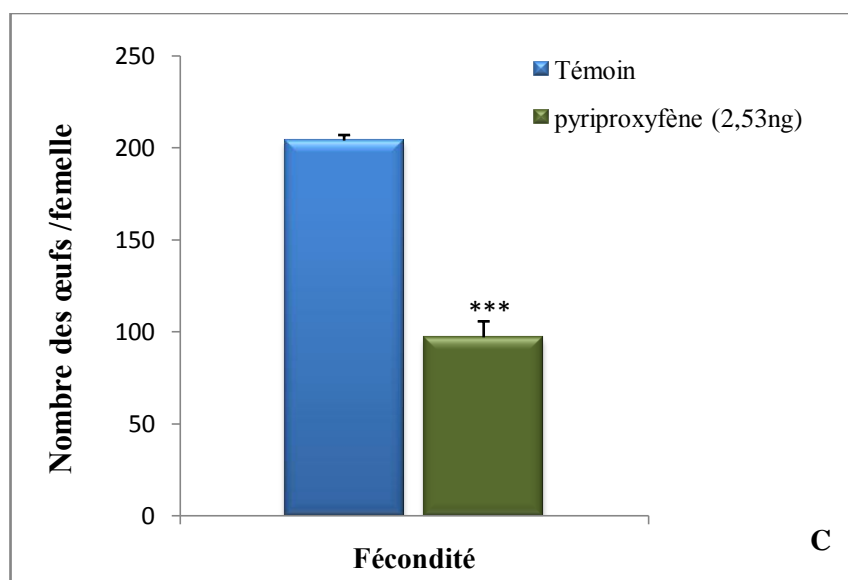


Figure 17. Effet du pyriproxifène sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez les femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides ($(m \pm s ; n= 6)$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

Le nombre d'œufs pondus par une femelle témoin est de $204,0 \pm 3,00$ pendant toute la période d'oviposition. Ce nombre est significativement affecté par l'analogue de l'hormone juvénile puisqu'il atteint seulement $97,17 \pm 8,70$ œufs /femelle, ainsi que le pourcentage d'éclosion ($p= 0,0001$) comparativement aux témoins (Tableau 23, Fig. 18).

Tableau 23 : Effet du pyriproxifène sur la fécondité (œufs/femelles) et la viabilité des œufs (%) chez les femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides (($m \pm s$; $n= 6$)).

Traitements	Témoin	Pyriproxifène (2,53 ng)
Fécondité (œufs/femelles)	$204,0 \pm 3,00$ a	$97,17 \pm 8,70$ b
Viabilité des œufs (%)	$95,00 \pm 4,00$ a	$59,67 \pm 4,64$ b



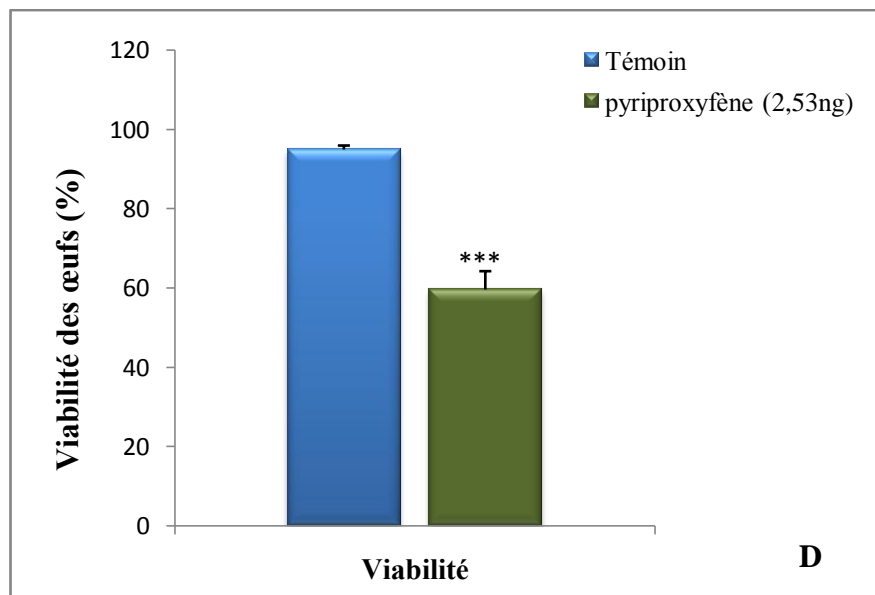


Figure 18. Effet du pyriproxyfène sur la fécondité (œufs/femelles) **C** et la viabilité des œufs (%) **D** chez les femelles *d'E. kuehniella* témoins et traitées par application topique à l'émergence des chrysalides (($m \pm s$; $n= 6$)).

2.4.3. Effet du traitement combiné sur le potentiel reproducteur :

Le traitement combiné avec le RH-2485 suivi du pyriproxyfène, n'a pas d'effet significatif sur la durée de la période de préoviposition, mais réduit significativement ($p= 0,05$) la période d'oviposition par rapport aux témoins et aux femelles traitées avec le RH-2485 seul (Tableau 24, Fig. 19). Cependant, nos résultats montrent une réduction très hautement significative de la fécondité ($p=0,0001$) et la viabilité des œufs ($p=0,0001$) par rapport aux témoins (Tableau 25, Fig. 20). Le traitement combinant respectivement le pyriproxyfène suivi du méthoxyfénoside allonge la période de pré-oviposition d'une manière très hautement significatif et réduit la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs d'une manière très hautement significatif ($p=0,0001$).

Tableau 24 : Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxifène, sur la durée des périodes (jours) de préoviposition et d'oviposition chez *E. kuehniella*, ($m \pm s$; $n= 6$).

Traitements	Témoin	RH-2485 (0,01 μ g)	Pyriproxifène (2,53 ng)	RH-2485/Pyriproxifène	Pyriproxifène /RH-2485
Période de Préoviposition	1,16 \pm 0,25 a	1,16 \pm 0,25 a	3,15 \pm 0,5 b	1,40 \pm 0,30 a	2,41 \pm 0,86 c
Période d'oviposition	3,50 \pm 0,44 a	2,33 \pm 0,40 b	2,16 \pm 0,25 b	2,75 \pm 0,68 c	2,00 \pm 0,54 b

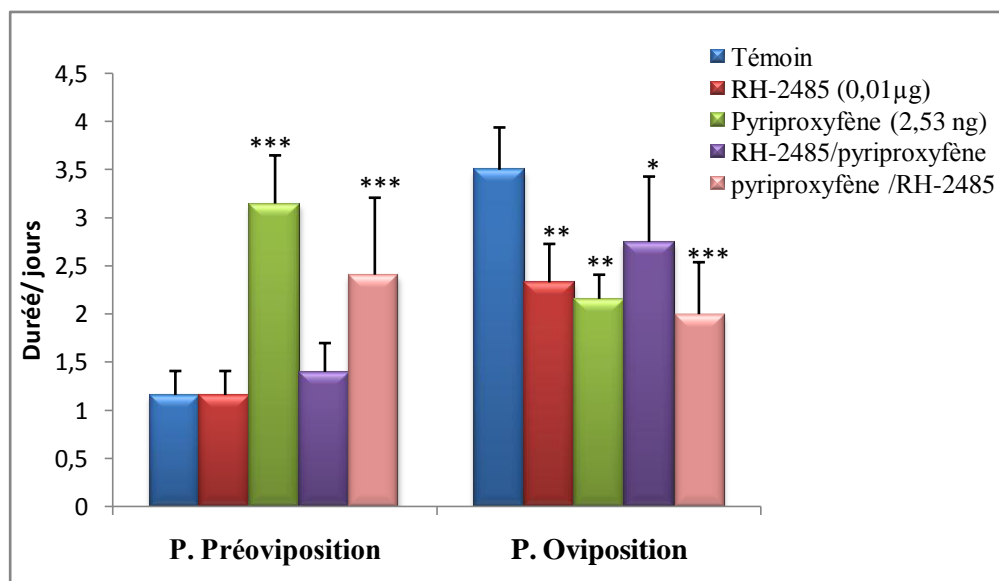
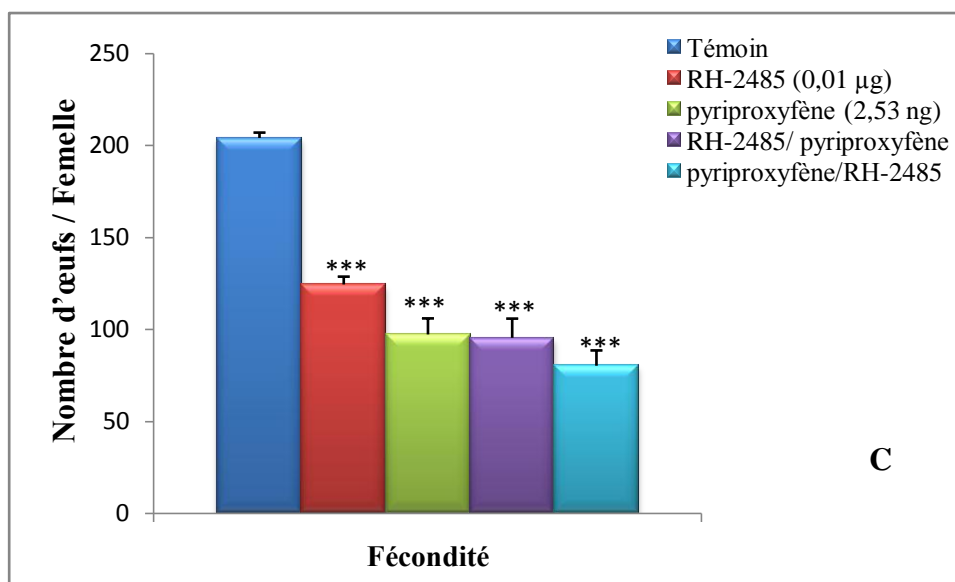


Figure 19. Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxifène, sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition chez *E. kuehniella*, ($m \pm s$; $n= 6$). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

Tableau 25 : Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxyfène sur la fécondité des femelles (nombre d'œufs/ femelle) et la viabilité (%) des œufs (m ± s ; n= 6). Moyennes d'un même paramètre suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différent (p> 0.05).

Traitements	Témoin	RH-2485 (0,01µg)	Pyriproxyfène (2,53 ng)	RH-2485 / Pyriproxyfène	Pyriproxyfène /RH-2485
Fécondité (œufs/femelle)	204,0 ± 2,90 a	124,33 ± 4,25 b	97,17± 8,70 b	95,33 ± 10,43 b	80,16 ± 8,30 b
Viabilité des œufs (%)	95,00 ± 4,00 a	68, 83± 2,99 b	59,67 ± 4,64 b	57,10 ± 8,57 b	50,12 ± 6,76 b



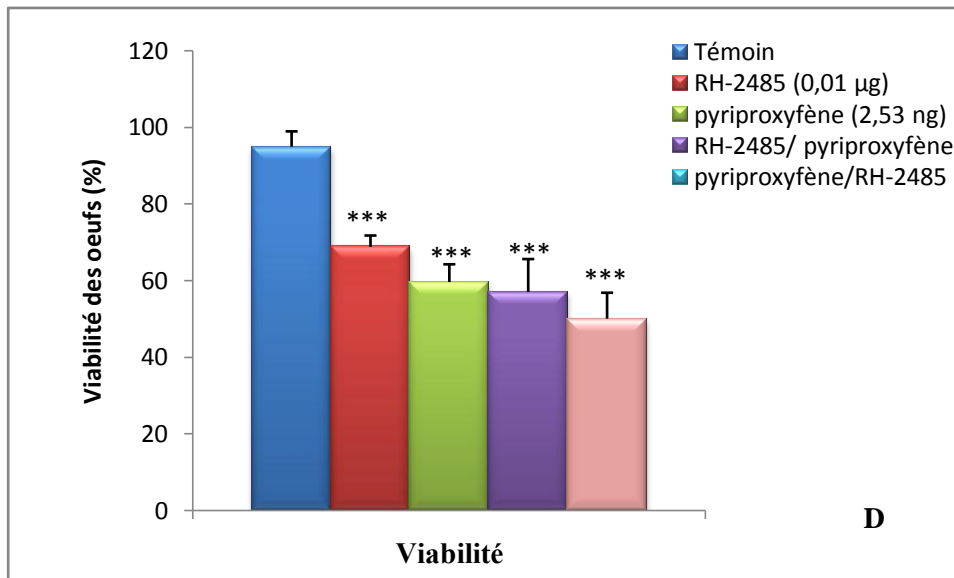


Figure 20. Effet d'un traitement par application topique combinant le RH-2485 et le pyriproxyfène sur la fécondité des femelles (nombre d'œufs / femelle) **C** et la viabilité (%) des œufs **D** ($m \pm s$; $n= 6$).

2.5. Effet *in vivo* du méthoxyfénozide et du pyriproxyfène sur les ecdystéroïdes corporels :

2.5.1. Effet *vivo* du méthoxyfénozide et du pyriproxyfène sur les ecdystéroïdes dans le corps entier :

Les ecdystéroïdes libres ont été quantifiés dans le corps entier des chrysalides âgées de 1, 3, 5 et 7 jours. Cette quantification a été réalisée par un anticorps polyclonal dirigé contre la 20-hydroxyecdysone. Les résultats sont exprimés en pg. d'équivalent 20E/mg de poids frais corporel (Tableau 26, Fig. 21).

Tableau 26 : Analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les chrysalides d'*E. kuehniella* traitées avec le RH-2485 (0,01 µg) et le pyriproxyfène (2,53 ng). Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20-hydroxyecdysone.

Solution standard	Concentration (M)	B/B ₀
1	10 ⁻¹⁴	100,0
2	10 ⁻¹³	98,8
3	10 ⁻¹²	84,9
4	10 ⁻¹¹	60,1
5	10 ⁻¹⁰	37,0
6	10 ⁻⁹	10,2
7	10 ⁻⁸	1,5
8	10 ⁻⁷	0,9

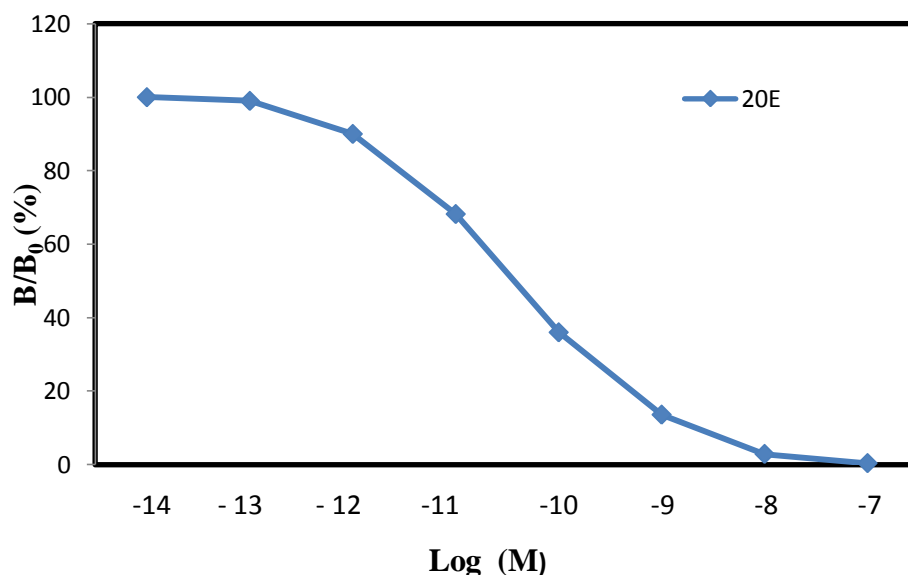


Figure 21. Analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les chrysalides d'*E. kuehniella* traitées avec le RH-2485 (0,01 µg) et le pyriproxyfène (2,53 ng). Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20-hydroxyecdysone.

Le méthoxyfénozide et le pyriproxifène testés sur les chrysalides d'*E. kuehniella* entraînent une modification du profil hormonal comparé aux témoins. En effet, les contenus hormonaux augmentent au cours des cinq premiers jours de vie nymphal en marquant deux pics localisés à 3 et à 5 jours après l'exuviation nymphale, une diminution est ensuite observée à 7 jours.

Le méthoxyfénozide entraîne une augmentation significative des taux à 1 et à 5 jours ($p=0,03$). Chez les chrysalides, traitées au pyriproxifène, les concentrations des ecdystéroïdes augmentent d'une manière très hautement significative à 1 ($p= 0,003$) et à 7 jours ($p=0,009$). La comparaison entre les chrysalides témoins et traitées au méthoxyfénozide et au pyriproxifène montre une diminution hautement significative ($P=0,01$) et donc une suppression du pic du troisième jour ($P=0,01$). (Tableau 27, Fig. 22). L'analyse de la variance à deux critères de classification indique qu'il ya un effet traitement hautement significatif ($p=0,01$), un effet âges et une interaction traitement/âges très hautement significatif ($p< 0,001$) (Tableau 28).

Tableau 27 : Effet du méthoxyfénozide ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) et du pyriproxifène, sur le taux d'ecdystéroïdes exprimés en pg équivalents 20E/ mg du poids corporel au stade nymphal chez les chrysalides femelle d'*Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$). Les moyennes d'un même âge suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différents ($p> 0,05$), tandis que celles d'un même traitement suivies, d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différents ($p>0,05$).

Age (jours)	Témoin	Méthoxyfénozide(0,01 μg)	Pyriproxifène (2,53 ng)
1	145,75 \pm 6,50 a A	160,75 \pm 7,63 b A	173,00 \pm 7,39 b A
3	239,18 \pm 4,75 a B	206,25 \pm 4,79 b B	217,00 \pm 9,02 b B
5	300,50 \pm 14,6 a C	326,8 \pm 10,4 b C	302,20 \pm 18,4 ab C
7	178,3 \pm 12,6 a D	175,50 \pm 10,5 a A	209,50 \pm 8,23 b D

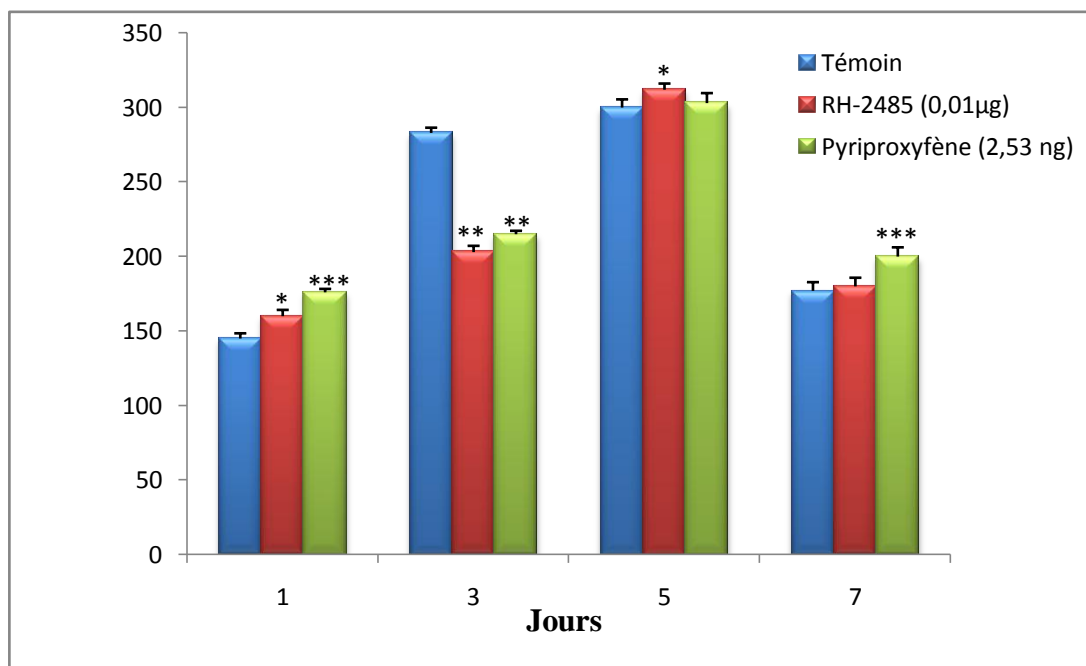


Figure 22. Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) et du pyriproxyfène, sur le taux d'ecdystéroïdes exprimés en pg équivalents 20E/ mg du poids corporel au stade nymphal chez les chrysalides femelle *d'Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$).

Tableau 28: Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) et du pyriproxyfène, sur le taux d'ecdystéroïdes exprimés en pg équivalents 20E/ mg du poids corporel au stade nymphal chez les chrysalides femelle *d'Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$). Analyse de la variance à deux critères de classification (Traitement, âges).

Source de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitements	2	2436	1218,2	6,76	0,003**
Âges	3	171440	57146,6	316,90	0,000***
Interaction	6	6043	1007,2	5,59	0,000***
Erreur résiduelle	36	6492	180,2		
Totale	47	186411			

2.5.2. Effet du méthoxyfénozide et du pyriproxifène sur la production *in vivo* d'ecdystéroïdes ovariens :

La quantification a été réalisée à partir d'une courbe de référence exprimant le rapport B/B₀ en fonction des logarithmes décimal des concentrations molaires (M) de l'hormone standard l'ecdysone. Les résultats sont exprimés en pg. d'équivalent E/mg de tissu ovarien (Tableau 29 Fig. 23).

Tableau 29 : Analyse quantitative des ecdystéroïdes ovariens d'*E. kuehniella*. Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) d'ecdysone.

Solution standard	Concentration (M)	B/B ₀
1	10 ⁻¹⁴	100,0
2	10 ⁻¹³	99,0
3	10 ⁻¹²	90,0
4	10 ⁻¹¹	68,2
5	10 ⁻¹⁰	36,0
6	10 ⁻⁹	13,6
7	10 ⁻⁸	2,9
8	10 ⁻⁷	0,4

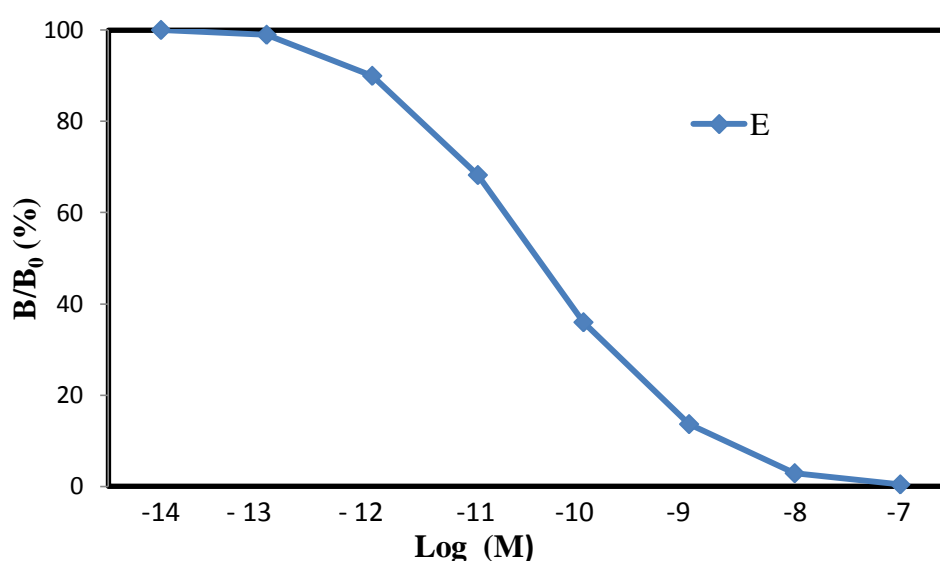


Figure 23. Analyse quantitative des ecdystéroïdes ovariens d'*E. kuehniella*. Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) d'ecdysone.

Chez les témoins, le taux d'ecdystéroïdes ovariens est de $13,15 \pm 0,23$ pg equiv. 20E/mg de tissu ovarien, il est significativement augmenté après traitement des chrysalides femelles avec les doses d'inhibition 50, où il passe respectivement à $16,74 \pm 0,61$ chez les séries traitées avec le méthoxyfénozide ($0,01 \mu\text{g}$) et à $19,48 \pm 1,60$ pg equiv E/ mg de tissu ovarien chez les traitées avec le pyriproxifènes ($2,53 \text{ ng}$) (Tableau 30, Fig. 24).

Tableau 30: Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) et du pyriproxifène, sur les taux d'ecdystéroïdes ovariens exprimés en pg équivalents E/mg de tissu, mesuré à l'émergence des femelles après traitement des chrysalides *d'Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$).

Traitements	Témoin	RH-2485 ($0,01\mu\text{g}$)	Pyriproxifène ($2,53 \text{ ng}$)
Taux d'ecdystéroïdes	$13,15 \pm 0,23 \text{ a}$	$16,74 \pm 0,61 \text{ b}$	$19,48 \pm 1,60 \text{ b}$

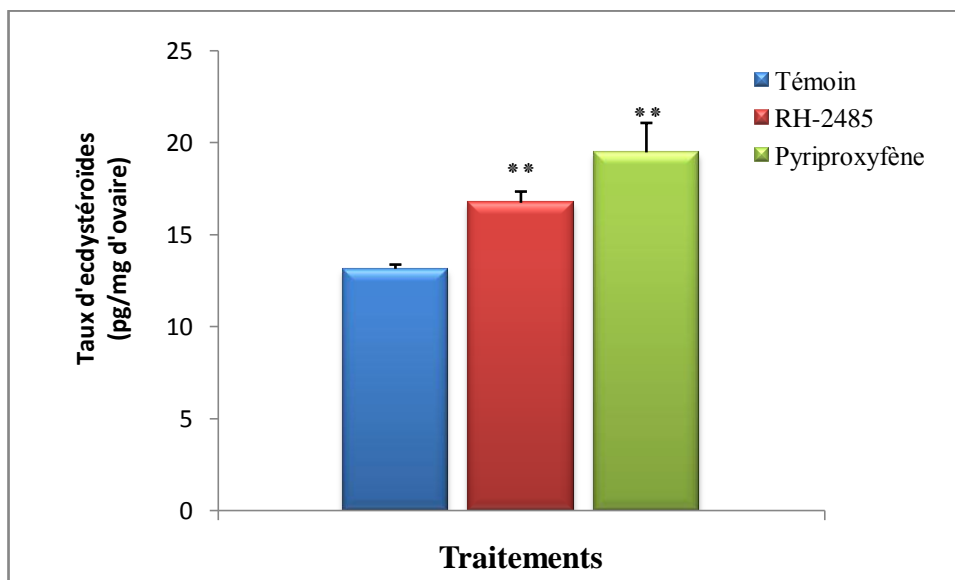


Figure 24: Effet du RH-2485 ($\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) et du pyriproxifène, sur le taux d'ecdystéroïdes ovariens exprimés en pg équivalents E/mg de tissu, mesuré à l'émergence des femelles après traitement des chrysalides *d'E. kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$).

2.5.3. Effet du traitement combiné sur la production *in vivo* d'ecdystéroïdes ovariens :

Les résultats mentionnés dans le tableau 31 et la figure 25, montrent que les deux combinaisons RH-2485 suivi du pyriproxifène et pyriproxifène suivi du RH-2485 entraînent une augmentation très hautement significative ($P=0,001$) de la production des ecdystéroïdes ovariens. Le taux passe de $13,15 \pm 0,23$ chez les témoins à $18,91 \pm 0,83$ pg/mg chez les traitées avec la combinaison pyriproxifène suivi du RH-2485.

Tableau 31 : Effet du traitement combiné par application topique à l'exuviation nymphale, sur le taux d'ecdystéroïdes ovariens exprimés en pg équivalents E/mg de tissu, mesuré à l'émergence des femelles après traitement des chrysalides d'*Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$).

Traitements	Témoin	RH-2485 à 0j Pyriproxifène à 1j	Pyriproxifène à 0j RH-2485 à 1j
Taux d'ecdystéroïdes	$13,15 \pm 0,23$ a	$18,06 \pm 0,72$ b	$18,91 \pm 0,83$ b

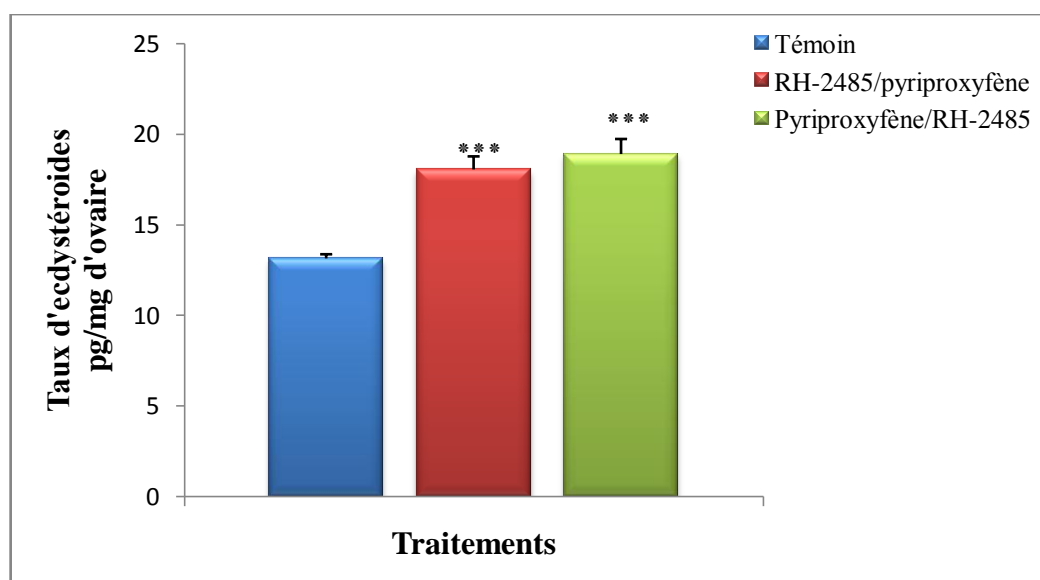


Figure 25. Effet du traitement combiné par application topique à l'exuviation nymphale, sur le taux d'ecdystéroïdes ovariens exprimés en pg équivalents E/mg de tissu, mesuré à l'émergence des femelles après traitement des chrysalides d'*Ephestia kuehniella* ($m \pm s$; $n= 4$).

4.1. Etude toxicologique

Les processus de mue et de la métamorphose sont contrôlé par des hormones et neurohormones (Gilbert *et al.*, 1980, 2002; Lafont *et al.*, 2005; Gilbert and Rewitz, 2009). Les neurohormones qui incluent l'hormone prothoracicotropic (PTTH), le bursicon, et l'hormone de l'éclosion (EH) (Truman, 1985, 2005; Watson *et al.*, 1989) ; les hormones de mue (ecdystéroïdes) (Smith, 1985; Gilbert & Rewitz, 2009) et les hormones juvéniles (HJs) (Meyer *et al.*, 1968; Judy *et al.*, 1973; Truman, 2005). Les ecdystéroïdes sont des activateurs primaires du développement des insectes et leurs rôles dans la régulation de la mue et la métamorphose sont bien caractérisés (Spindler *et al.*, 2009). En effet la 20E initie le processus de mue, tandis que l'HJ détermine la nature du phénotype (Truman & Riddiford, 2007). L'apolyse larvo-nymphale se produit et se termine avant le pic larvaire de la 20E, par contre, l'apolyse nympho-adulte commence au début de l'augmentation du taux de la 20E nymphale (Fig. 26). Toute interférence dans l'homostasie de ces hormones avec des sources exogènes d'hormone ou encore avec leurs analogues de synthèse peut conduire à une perturbation dans le développement des insectes cibles (Jenkins *et al.*, 1992). Ceci explique les résultats obtenus dans notre étude, sur l'inhibition de l'exuviation adulte après traitement *in vivo* par application topique du RH-2485 et du pyriproxifène sur les chrysalides d'*E. kuehniella* nouvellement exuviées.

Durant ces trois dernières décennies, les agonistes des ecdystéroïdes ont fait l'objet de recherches intensives pour évaluer leur toxicité à l'égard de divers ravageurs et préciser leur mécanisme d'action (Dhadialla *et al.* 2005; Hami *et al.* 2005; Dhadialla & Ross 2007). L'étude du RH-2485 confère plusieurs avantages tant au niveau de la recherche appliquée que de la recherche fondamentale. En effet cet analogue présente une activité insecticide très élevée envers plusieurs espèces de lépidoptères ravageurs appartenant à différentes familles (Pyralidae, Pieridae, Tortricidae et Noctuida) (Carlson *et al.*, 2000, Moulton *et al.* 2002, Smaghe *et al.* 2003, Pineda *et al.* 2004).

Facteurs extrinsèques et intrinsèques

Alimentation, Température, hygrométrie, photopériode, densité, phéromones, Proprioception

Récepteurs sensoriels (Flux sensoriel)

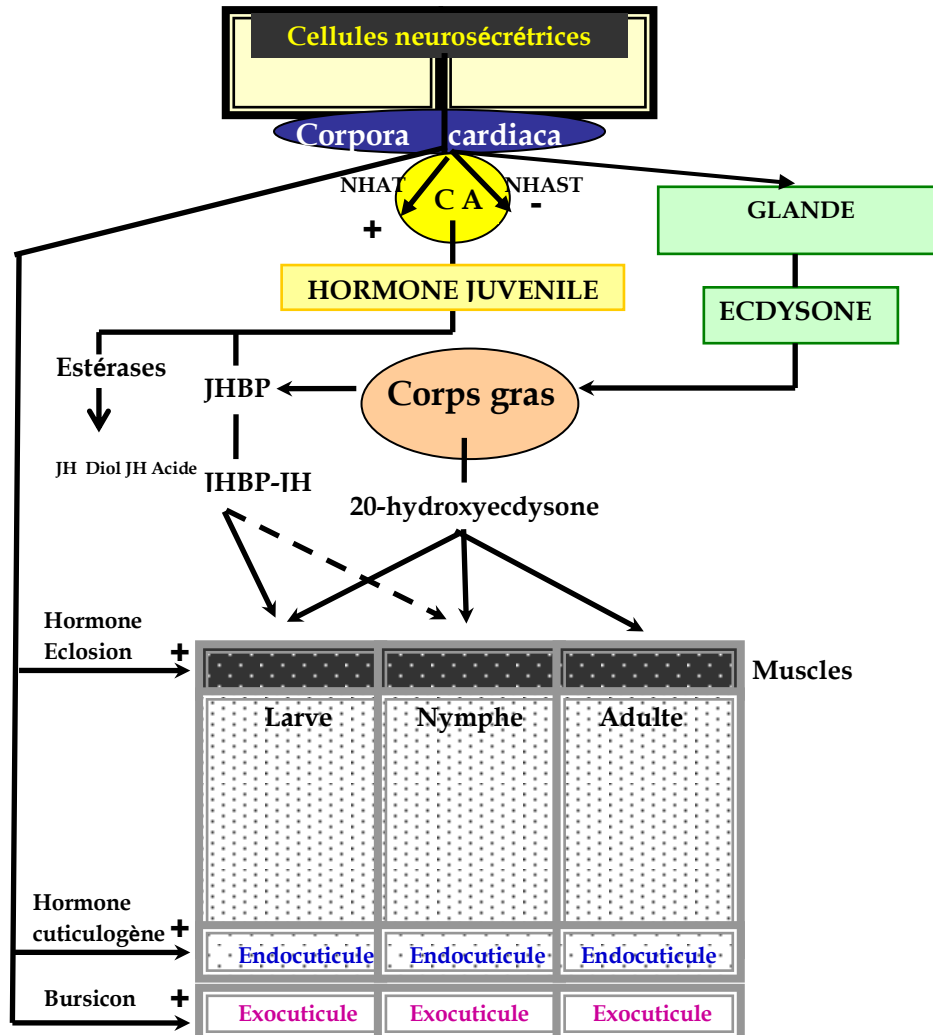


Figure 26. Contrôle de la métamorphose et la synthèse des hormones de développement chez les insectes (Cassier *et al.*, 1997).

Chez *E. kuehniella*, le RH-2485 appliqué *in vivo*, présente une dose d'inhibition 50 (DI 50) de 0,01 µg/insectes. Il présente par ingestion chez les larves de troisième stade de *Spodoptera exigua* une DI50 de 0,23 mg/Kg de nourriture (Rodríguez Enríquez *et al.*, 2010), alors que chez *Spodoptera littoralis* la DI 50 est de l'ordre de 3,98 mg/Kg de nourriture (Pineda *et al.*, 2004). De plus, le traitement des chrysalides de *S. exigua* par le RH-2485 induit l'inhibition de la mue imaginale et l'apparition des malformations chez l'adulte (Pineda *et al.*, 2004). D'autre part, Charmillot *et al.*, (2004) ont comparé la DI 50 du méthoxyfénoside chez deux ravageurs des vignes *Eupoecilia ambiguella* et *Lobesia botrana*, les DI 50 sont de l'ordre de 0,03 et 0,05 ppm respectivement. Ceci est en accord avec les résultats obtenus chez d'autres espèces de lépidoptère, en effet les DI50 du RH-2485 sont 7,68, 15,95, 92,93 et 142.16 ppm respectivement pour le I, II, III et IV stade larvaire de *Hilicoverpa armigera* (Kumar & Santharam, 2008). Récemment, l'activité comparée de trois agonistes des ecdystéroïdes (RH-0345, RH-5992 et RH-5849) a été examinée par application topique chez *E. kuehniella*. Les DL 50 ont été estimés, à 5,10 µg pour le RH-0345; 0,05 µg pour le RH-5849 et 0,005 µg/insecte pour le RH-5992 (Hami *et al.*, 2005). Sur la base des valeurs de la DL50, le tébufénoside semblait être l'agoniste des ecdystéroïdes le plus efficace contre les chrysalides d'*E. kuehniella* suivi par le méthoxyfénoside, confirmant les travaux qui ont été faits sur plusieurs ordres d'insectes, lépidoptères, coléoptères et diptères (Lawrence 1992; Smagghe & Degheele 1992; Farinos *et al.* 1999; Soltani *et al.* 2002). Les travaux menés par Sundaram *et al.* (1998) montrent que le RH- 2485 est plus toxique (DL50 = 1,05 ng/larve) que le RH- 5992 (DL50 = 8,8 ng/larve) chez les larves du 5^{ème} stade de *Choristoneura fumiferana*, suivie par le RH-0345 (DL50 = 41,0 ng/larve) et le RH-5849 (DL50 = 236,9 ng/larve). Ceci est en accord avec les résultats obtenus chez un autre lépidoptère *S. littoralis*, en effet, la CL50 du RH-2485 est de l'ordre de 1,15 mg/l suivie par le RH-5992 avec une CL50 de 7,47 mg/l et le RH-0345 avec une CL50 de 44,87 mg/l (Smagghe *et al.*, 2000). Enfin, les effets létaux et sublétaux du méthoxyfénoside sur *Spodoptera frugiperda*, ont été étudiés par le traitement des larves du cinquième stade jusqu'à la nymphose avec le méthoxyfénoside incorporé à la nourriture à des doses correspondant à la CL10 et la CL25. La mortalité larvaire atteint 8% et 26%, respectivement. Au cours du

septième jour de l'expérience, une mortalité progressive des larves de 12% pour la CL10 et 60% pour la CL25 a été observée avant la nymphose (Zarate *et al.*, 2011).

Quoique cet agoniste de l'ecdysone ne possède pas de stérol (non-stéroïdal) dans sa structure moléculaire, il en conserve toutefois son action. Cette capacité s'explique par la reconnaissance et l'attachement du méthoxyfénoside aux récepteurs de l'ecdysone des cellules épidermales à la manière d'un système clé-cadenas. La présence de cet insecticide dans l'organisme de l'insecte perturbe le système hormonal en initiant une mue prématurée, incomplète et létale. Quoique toujours spéculatif, cette différence pourrait avoir pour origine la variabilité interspécifique dans la structure du récepteur de l'ecdysone des différents ordres d'insectes (Smaghe *et al.*, 1996 a). Selon Soin *et al.* (2010) la différence de toxicité *in vivo* et *in vitro* des agonistes de l'hormone de mue (RH-2485, RH-5992 et le RH-0345) et la spécificité de ces molécules chez deux espèces de lépidoptères *B. mori* et *S. littoralis*, n'est pas basées sur l'activation différente des récepteurs (EcR/USP) dans les deux espèces mais cela peut être du aux paramètres *in vivo* dont l'importance relative reste à déterminer par exemple, la perméabilité de la cuticule, l'absorption/l'excrétion par l'intestin et la détoxification métabolique.

La métamorphose des insectes est régie par un équilibre hormonal complexe dans lequel l'hormone juvénile (HJ) joue un rôle important dans le maintien des caractères larvaires. Au dernier stade larvaire, la teneur en HJ est particulièrement faible dans le corps de l'insecte. Si un mimétique de l'HJ est appliqué à ce moment-là, la mue nymphale est perturbée provoquant des déformations morphogénétiques caractéristiques et, selon les doses utilisées et le moment d'application, des larves permanentes, des larves-nymphes ou encore des intermédiaires larves-adultes, incapable de donner l'adulte normale (Dhadialla *et al.*, 1998 ; Aribi *et al.*, 1999 ; Gilbert *et al.*, 2000). Les premiers mimétiques de l'HJ ont pour la plupart, une structure terpénoïde comme le métoprène ou, l'hydroprène (Staal, 1982) mais sans la fonction epoxide présente dans l'HJ (Retnakaran *et al.*, 1985). Ces dernière années, plusieurs composés très actif mais de structure différente de l'HJ ont été synthétisés : le fénoxycarbe (Dorn *et al.*, 1981), le pyriproxifène (Hatakoshi *et al.*, 1986) et le diofenolan (Sechser *et al.*, 1994). Le pyriproxifène est un insecticide aromatique non

terpénoïde dérivé du fénoxycarbe. C'est un analogue des hormones juvéniles d'insectes, qui mime l'action de l'HJ en se fixant aux récepteurs nucléaires spécifique à cette hormone de manière compétitive avec l'hormone naturelle (Sullivan & Goh, 2008).

L'hormone juvénile synthétique et les analogues de l'hormone juvénile, ont été largement étudiés. Ainsi, la stérilisation et les activités toxiques contre de nombreux insectes, y compris des Coléoptères (Abo-Elghar *et al.*, 2004), Dictyoptères (Lim & Yap, 1996), Diptères (Darriet & Corbel, 2006), les Hyménoptères (Lim & Lee, 2005; Mommaerts *et al* 2006), Lépidoptères (Oouchi, 2005), Orthoptères (Parkman & Frank, 1998), Siphonaptères (Rajapakse *et al.*, 2002) et Homoptère (Richardson & Lagos 2007) et les pucerons *Lipaphis erysimi* (White & Lamb 1968, Liu & Chen, 2001).

Dans cette étude les résultats obtenus sur les chrysalides d'*E. kuehniella* révèlent que l'application du pyriproxifène à la DI50 (2,53 ng/insecte) entraîne l'apparition des différents types morphogénétiques, un allongement de la durée du stade nymphal et une inhibition de l'exuviation adulte. Une perturbation de la mue et la métamorphose sont aussi observée chez les nymphes de *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera) après traitement par le pyriproxifène à une concentration létale CL 50 de 9,3 µg/ml de liquide nutritif (Sadeghi *et al.*, 2009). De plus, l'application du pyriproxifène à une concentration de 50 mg/l provoque une inhibition de l'exuviation adulte chez 50% de la population des pucerons *Aphis glycines* (Richardson & Lagos, 2007). Chez un autre lépidoptère *Choristoneura rosaceana*, les DL 50 après traitement des larves du cinquième stade mâles et femelles au pyriproxifène on été estimé à 0,24 µg/insecte et 0,48 µg/insecte respectivement (Sial & Brunner, 2010). En outre, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Arthur *et al.* (2009) qui ont conclu que le pyriproxifène a une efficacité résiduelle pour le contrôle des insectes des denrées stockées par inhibition de l'émergence des adultes après l'exposition des larves. Kidokoro *et al.* (2006) ont démontré que l'application topique des analogues de l'HJ, comme le méthoprène et l'hydroprène sur *L. migratoria* et *Oxya yezoensis* facilite significativement la fin de la diapause et donne naissance à des embryons qui ont subi une métamorphose anormale, une pigmentation et une sclérotisation sans fermeture dorsale. De plus, le méthoprène, affecte la croissance et le développement des stades

immatures des insectes des denrées stockées et empêche la maturation au stade adultes (Oberlander *et al.*, 1997, Henrick, 2007). L'inhibition de l'exuviation adulte est également observée lors de l'application d'autres régulateurs de croissance le FCX (flucycloxyuron), inhibiteur de la synthèse de la chitine, utilisé par application topique sur des chrysalides d'*E. kuehniella*, présente une DI50 de 1,33 µg/insecte (Bendjeddou *et al.*, 1998). Les résultats obtenus par Ghasemi *et al.* (2010) montrent que l'administration de pyriproxifène à la nourriture des larves de *P. interpunctella* provoque un allongement de la durée de la période larvaire jusqu'à l'émergence des adultes. Ce pendant, l'allongement de la durée du développement larvaire ou nymphale peut être due, à la persistance de l'hormone juvénile dans l'hémolymphe qui inhibe la sécrétion de la 20 E se qui entraîne des mues bloqués et l'incapacité de passer au stade suivant (Kuwano *et al.*, 2008).

4. 2. Effet sur la morphométrie de l'ovaire:

Chez les Lépidoptères comme *E. kuehniella*, l'ovaire est méroïstique polytrophique ; Il comprend 8 à 10 ovarioles et constituée par un tube épithélial mésodermique dans lequel les ovocytes sont en succession linéaire reflétant leur développement (William, 1971). On distingue dans chaque ovariole deux régions : le germarium et le vitellarium. Le germarium se différencie le premier, il contient des cellules germinales primordiales qui engendrent par division deux catégories de cellules sœurs, des ovocytes et des cellules nourricières ou trophocytes et des cellules somatiques (Cassier *et al.*, 1997). Le vitellarium contient des ovocytes entourés par des cellules folliculaires, dont l'ensemble forme un follicule. Dans le vitellarium, les ovocytes accumulent des réserves nutritives (vitellus) et acquièrent des enveloppes protectrices appelées membrane vitelline et chorion (Rakhel & Dhadialla, 1992).

D'après les données acquises pendant notre expérimentation menée *in vivo* sur les femelles adultes d'*E. kuehniella*, nous avons constaté que le RH- 2485 et le pyriproxifène administrés par application topique (DI 50) à l'émergence des chrysalides réduisent significativement le poids frais des ovaires et le nombre le nombre d'ovocytes. Ils réduisent également la taille et le volume de l'ovocyte basal. Des perturbations de la morphométrie de l'ovaire avec le RH- 5849 et le RH-5992 sont également observées chez *plodia interpunctella* (Silhacek *et al.*, 1990), *S.*

littoralis (Smagghe et Degheele, 1992), *Spodoptera exempta* (Smagghe & Degheele, 1994c) et chez *Choristoneura fumifirana* (Retnakaran & Oberlander, 1993). Parmi les perturbations les plus importantes occasionnées par le tébufénozide, on note un retard dans la maturation ovarienne chez *C. rosaceana* et une dégénérescence des ovarioles (Renée *et al.*, 2004). L'application du RH-5992 affecte le développement ovarien de *S. exigua* et *L. decemlineata* et augmentent le pourcentage de résorption des ovocytes affectant ainsi la fécondation et l'éclosion des œufs (Smagghe & Degheele, 1994a). Des résultats similaires ont été rapportés par l'utilisation du RH-0345 et du RH-5992 qui réduisent le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocyte par paire d'ovaire et la longueur de l'ovocyte basale chez les femelles d'*E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005 ; Khebeb *et al.*, 2008). Ces mêmes effets morphométriques ont été observés chez *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001, Taïbi, 2007) et chez *L. decemlineata* après application topique du RH-0345 (Farinos *et al.*, 1999).

Plusieurs régulateurs de croissance ont été testés sur deux espèces de myriapodes Chilopodes (*Eupolybothrus nudicornis* et *Lithobitus forficatus*) tels que la 20-hydroxyecdysone, le RH-2485, le RH-0345, la JH III et le pyriproxifène ; ils entraînent une perturbation de la reproduction en affectant des paramètres morphométrique ainsi que la structure fine de l'ovocyte (Daas *et al.*, 2005 ; 2007). Le méthoprène, un autre régulateur de croissance réduit le nombre d'ovocytes dans les ovaires, mais augmente le volume des ovocytes basaux (Maiza *et al.*, 2004). D'autres expérimentations ont été menées en administrant le halofénozide en traitement combiné avec le KK-42 qui est un dérivé de l'imidazole, considéré comme un anti-ecdystéroïdes (Tunaz et Uygun, 2004). L'administration du halofénozide seul ou avant le KK-42 affecte significativement la taille et le volume des œufs pondus. Ces effets sont plus marqués quand le KK-42 est administré seul ou avant le halofénozide (Taïbi, 2000). De plus les résultats de Berghiche *et al.*, 2005 montrent que l'administration du KK-42 suivi par la 20 hydroxyecdysone entraîne une augmentation du poids et du volume des œufs pondus des femelles de *T. molitor*.

Ces anomalies morphométriques ont été observées après utilisation d'une autre catégorie de régulateurs de croissance. Ce sont les inhibiteurs de la synthèse de la

chitine qui altèrent la structure cuticulaire en inhibant la synthèse de la chitine entraînant un dépôt anormal de l'endocuticule (Retnakarane *et al.*, 2005). Ainsi l'administration du FCX perturbe la morphométrie des ovaires dès le troisième jour de la vie adulte coïncidant avec le début de la sécrétion du chorion au niveau des œufs pondus par les femelles traitées chez *T. molitor* (Taibi, 2000 ; Hami *et al.*, 2004). De même, des effets sur la morphométrie des ovaires ont été observés après traitement des femelles de *Cydia pomonella* (Soltani & Soltani-Mazouni, 1992) et *Phylloneryctre blancardella* (Marshal *et al.*, 1988) avec le DFB. Il a été administré à plusieurs insectes causant ainsi des anomalies morphométriques des ovaires par exemple chez *Cydia pomonella* (Soltani & Soltani-Mazouni, 1992). Aussi, Tail *et al.* (2010) montrent que le traitement des femelles de *Schistocerca gregaria* à l'émergence par ingestion du DFB, entraîne une réduction du poids des ovaires et des œufs pondus.

Des résultats similaires ont été rapportés en utilisant d'autres insecticides. En effet, l'acide borique (insecticide organique), l'acétamipride qui exercent un effet neurotoxique chez *B. germanica* (Habes *et al.*, 2006 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a), réduisent significativement le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires au cours de la maturité sexuelle des femelles de *B. germanica*, ils réduisent également la taille de l'ovocyte basal (Morakchi, 2000). Ces mêmes effets morphométriques ont été observés chez *Blatella Orientalis* (Dictyoptera, Blattellidae) après application topique de l'azadirachtine (Tine *et al.*, 2011). Un blocage de l'ovogénèse et une dégénérescence des cellules folliculaires ont été rapportés chez le diptère *Anopheles stephensi* traité au neem azal une formulation commerciale d'extrait de neem (Lucantoni *et al.*, 2006).

Cette perturbation de la morphométrie des ovaires, des différents ordres d'insecte par différents groupes de régulateurs de croissance, notamment, les agonistes et antagonistes de la 20E et de la JH, provient que l'activité ovarienne est contrôlée conjointement par ces deux principales hormones (Rakhel & Dhadialla, 1992). En effet les ecdystéroïdes permettent la réinitiation méiotique des ovocytes (Lanot *et al.*, 1987) et l'ovulation (Ruegg *et al.*, 1992) alors que l'HJ contrôle principalement la vitellogénèse mais également la transcription des gènes nécessaires à ce processus (Hoffman & Sorge, 1996 ; Hoffman *et al.*, 1999). Les résultats obtenus par Ghasemi *et al.* (2010) laissent supposer que la faible croissance ovarienne observée chez *P.*

Interpunctella est due à une perturbation des taux des ecdystéroïdes en présence d'excès du pyriproxyfène après traitement des larves.

4.4. Effet sur l'épaisseur du chorion :

Chez les insectes les enveloppes de l'ovocyte jouent un rôle important dans le maintien de l'espèce. En effet, elles assurent la protection mécanique de l'œuf, et les échanges respiratoires de l'organisme en voie de développement avec le milieu et elles empêchent également la déshydratation de l'œuf (Wigglesworth, 1965 ; Lafont, 1994).

La vitellogénèse débute chez les femelles adultes de *P. interpunctella* et chez l'espèce étudiée *E. kuehniella* à 4 jours après la mue nymphale et la choriogénèse commence deux à six heures après l'exuviation adulte (Zimowska *et al.*, 1995 ; Beckemeyer & Shirk, 2004). La morphogénèse et la structure des enveloppes de l'œuf ont été bien étudiées chez *Drosophila melanogaster* (Margaritis, 1985a ; Margaritis & Mazzini, 1989 ; Trougakos & Margaritis, 2002) et chez *Hygus lineolaris* (Peter *et al.*, 2002). La composition et la structure fine des enveloppes de l'œuf et les différents aspects du développement de la couche cristalline chez *L. decemlineata* ont été largement étudiées par Issidora *et al.* (2003). Au cours de la choriogénèse le dépôt successif de l'enveloppe vitelline, de l'endochorion et de l'exochorion par les cellules folliculaires nécessite la présence de l'hormone de mue, ce qui a été clairement établie, *in vitro* chez *Blatella germanica* (Bellés *et al.*, 1993). Dans certains cas, comme chez les lépidoptères, la sécrétion des enveloppes de l'œuf nécessite l'action conjointe de deux hormones, l'hormone juvénile et l'hormone de mue (Cassier *et al.*, 1997 ; Kidokora *et al.*, 2006). Les ecdystéroïdes interviennent directement ou indirectement dans le contrôle des différents aspects de développement des ovaires tels que, la différenciation des octets dans les ovocytes et les cellules nourricières, expulsion de calices des capsules de l'ovaire et la synthèse de la vitellogénine. Au cours du stade nymphal des lépidoptères, les ovocytes accumulent et organisent le vitellus à partir d'un précurseur hémolympatique et le corps gras, tandis que les cellules de l'épithélium folliculaire synthétisent des composants supplémentaires du vitellus ainsi que la membrane vitelline et le chorion (Telfer, 2009).

D'après les données acquises pendant notre expérimentation menée *in vivo* sur les femelles adultes d'*E. kuehniella*, nous avons constaté que le RH-2485, administré par application topique (DI50) à l'émergence des chrysalides réduit significativement l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux, tandis que l'application du pyriproxifène à la DI50 n'a aucun effet sur l'épaisseur du chorion. Ceci est en accord avec les résultats obtenus *in vivo* par Hami *et al.* (2005) montrant que le RH-5992 et le RH-0345 réduisent significativement l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux chez *E. kuehniella*. La combinaison pyriproxifène/RH-2485 entraîne une réduction hautement significative de l'épaisseur du chorion par rapport aux témoins. En comparaison avec les femelles traitées avec le RH-2485 puis le pyriproxifène, nos résultats ne révèlent aucune différence significative.

L'effet du RH-2485, RH-5992 et le RH-0345 sur l'épaisseur du chorion n'a pas été étudié chez les lépidoptères. Cependant, le RH-5992 perturbe la maturation ovarienne et le développement des œufs chez *S. exigua* et *Plodia interpunctella* en provoquant une résorption des ovarioles et une malformation du chorion (Smagghe & Degheele, 1994a ; Salem *et al.*, 1997). De même le RH-0345 réduit la croissance et le développement *in vivo* des ovocytes de *T. molitor* avec une réduction synthétique des follicules par les altération structurales et des modifications biochimiques (Soltani *et al.*, 1998). Taïbi, 2007 montre que le RH-0345 réduit l'épaisseur du chorion chez les femelles adultes de *T. molitor*. Un antagoniste des ecdystéroïdes le KK-42 a été testé *in vivo* sur des ovocytes de *T. molitor*, il entraîne une réduction de l'épaisseur du chorion sans affecter sa structure fine (Taïbi, 2000 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2000 a et b ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2001). Le DFB, paraît agir sur l'incorporation de précurseurs vitellogénique dans les ovocytes au cours de leur maturation et également sur la synthèse et l'épaisseur du chorion (Soltani & Soltani- Mazouni, 1997). En peut donc penser que la diminution de l'épaisseur du chorion observée sur des ovocytes basaux des femelles traitées probablement liée à des interactions endocrines du méthoxyfénozide avec les ecdystéroïdes ovarien au cours de la choriogénèse.

4.5. Effet sur le potentiel reproducteur :

De nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré que le processus de la reproduction chez les insectes est sous le contrôle de la 20E et l'hormone juvénile (Engelmann, 1979 ; Davis *et al.*, 1990 ; Cusson *et al.* 1994 ; Gäde & Hoffman, 2005)(Fig. 27). Toute interférence dans l'homéostasie de ces hormones avec des sources exogènes (agonistes ou antagonistes) peuvent entraîner des anomalies dans la croissance des ovocytes, la formation des œufs, et l'embryogenèse (Smagghe *et al.*, 2003b). Chudakova *et al.* (1982) ont démontré l'effet variable de l'ecdysone sur le développement des ovocytes selon la dose administrée. L'injection de petites doses de la 20-hydroxyecdysone chez *Acheta domesticus* stimule l'ovogénèse et la fécondité, mais celle-ci a un effet inhibiteur à de plus fortes doses. En outre, Cole *et al.* (2002) ont démontré que la HJ exocrine affecte l'oviposition chez *C. pomonella* .

Chez *E. kuehniella*, les étapes de la vitellogénèse s'effectuent pendant la vie nymphale, l'accouplement et la fécondation ont lieu pendant les 12 premières heures après l'exuviation adulte (période de préoviposition) et la période d'oviposition dure 3 à 4 jours (Taïbi, 2007 ; Khebeb *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2011). L'objectif de cette partie expérimentale est de tester le RH-2485 et le pyriproxifène sur la reproduction d'*E. kuehniella*, en examinant plus particulièrement leur impact sur le potentiel reproducteur (durée des périodes de pré-oviposition et d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs. Nos résultats montrent que l'agoniste de l'hormone de mue, le RH-2485, affecte significativement le potentiel reproducteur des femelles d'*E. kuehniella*. En effet, le traitement des chrysalides femelles dès leur exuviation nymphale réduit la durée de la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des

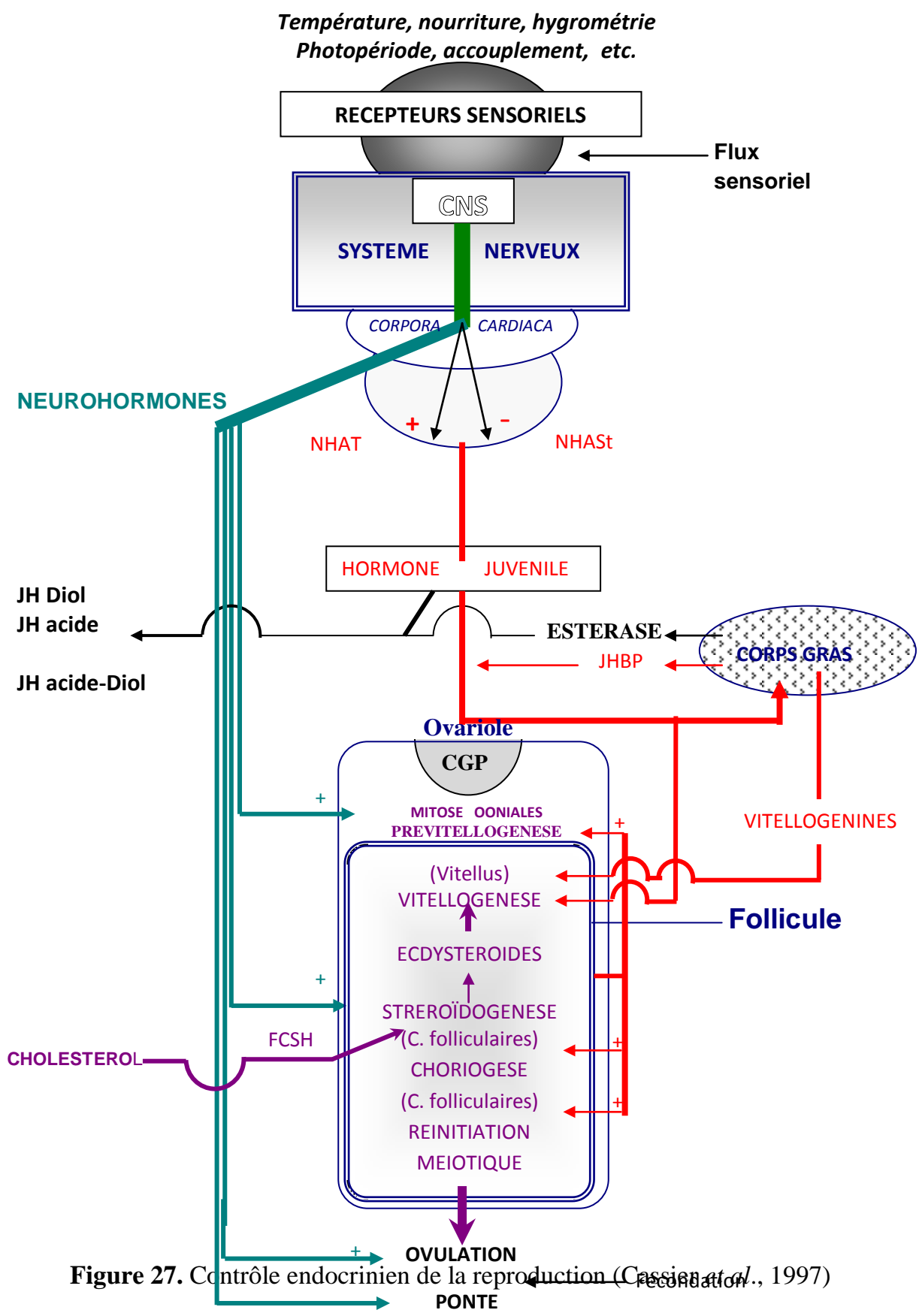


Figure 27. Contrôle endocrinien de la reproduction (Cassier *et al.*, 1997)

œufs, bien que la période de préoviposition ne semble pas être affectée. De plus, l'administration du pyriproxifène (analogue de l'hormone juvénile) par application topique sur des chrysalides nouvellement exuviées à la dose d'inhibition 50 (3,53ng) allonge la période de préoviposition et réduit la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs. Les données concernant le traitement combiné, montrent que l'utilisation du pyriproxifène seul manifeste des effets plus marqués que lorsqu'on utilise le RH-2485 seul sur le potentiel reproducteur. L'administration du pyriproxifène avant le RH-2485, en traitement combiné provoque une prolongation de la période de préoviposition et réduit la période d'oviposition, De plus ce traitement combiné affecte la fécondité et la viabilité des œufs, comparativement aux témoins. Les résultats obtenus en administrant le RH-2485 avant le pyriproxifène, montre une réduction de la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs sans affecté la période de préoviposition.

Des résultats similaires ont montré une réduction de la fécondité des femelles de *S. littoralis* après traitement des mâles ou des femelles avec le RH-2485 (Pineda *et al.*, 2009). Par ailleurs, la fécondité a été plus affectée lorsqu'on traite les larves par ingestion que par application topique. En effet les travaux menés par Rodríguez Enríquez *et al.*(2010) sur *S. littoralis* montrent que l'administration du RH-2485 par ingestion aux larves du troisième stade à une concentration sub létale (CL25), provoque une réduction importante des taux d'éclosion des œufs. Des résultats comparables ont été retrouvés après administration du méthoxyfénoside par ingestion chez *S. exigua* (Luna *et al.*, 2011). Pineda *et al.*, 2007 a rapporté que le spinosade et le méthoxyfénoside, réduisent d'une manière dose-dépendante, la fécondité et la fertilité des femelles de *S. littoralis*. La grande efficacité des agonistes des ecdystéroïdes, contre plusieurs espèces ravageurs a été largement documenté auparavant (Biddinger *et al.* 2006, Yanagi *et al.* 2006, Berghiche *et al.* 2008, Osorio *et al.*2008). En outre, des études antérieures ont démontré que l'administration des agonistes des ecdystéroïdes que ce soit par voie orale ou par application topique peut produire à long terme des effets toxiques chez les adultes des espèces cibles. En effet, le tébufénoside, le méthoxyfénoside et le halofénoside affectent négativement la fécondité et la fertilité chez plusieurs lépidoptères et coléoptères comme *C. rosaceana*, *C. pomonella*, *S.*

exigua, *S. littoralis* *L. decemlineata*, et *T. molitor* (Farinos *et al.*, 1999, Knight, 2000, Sun *et al.*, 2000, Taïbi *et al.*, 2003, Osorio *et al.*, 2008, Pineda *et al.*, 2009). Dhadialla *et al.* (1998) expliquent l'inhibition de l'oviposition par l'absence de sécrétion des facteurs stimulants l'oviposition qui sont normalement présent dans l'hémolymphe des femelles fécondées non traitées chez *S. exempta*, *S. exigua* et *L. decemlineata*. De plus, le RH- 5849 interfère dans l'ovulation et l'oviposition, puisque les ecdystéroïdes stimulent les cellules neurosécrétrices pour la synthèse de l'hormone myotropique d'ovulation (Smaghe & Degheele, 1994a). La sécrétion de l'hormone de l'ovulation se fait après la libération d'un pic d'ecdystéroïdes (Hagedorn, 1985). Le tébufénozide provoque une mortalité des œufs chez *Diatraea saccharalis* (Rodríguez *et al.*, 2001). La même molécule (tébufénozide) bloque l'induction de la biosynthèse des ecdystéroïdes et par conséquent l'arrêt de l'ovogenèse et de la vitéllogénèse chez les lépidoptères (Swecers & Iatrou, 1999). Farinos *et al.* (1999) ont confirmé l'existence d'effets négatifs du halofénozide sur l'accumulation des protéines et la formation des œufs chez les adultes de *L. decemlineata*. D'après les résultats obtenus, le méthoxyfénozide affecte significativement les événements de la reproduction chez les adultes femelles d'*E. kuehniella*. De ce fait, il semblerait que cet effet peut être expliqué par l'accumulation de cet insecticide dans les œufs en développement.

L'impact sur le potentiel reproducteur a été mis en évidence aussi avec les analogues de l'hormone juvéniles chez de nombreuses espèces. En effet le pyriproxifène utilisé *in vivo* par application topique chez les femelles adultes de *T. molitor* affecte significativement leur potentiel reproducteur. Il augmente la durée de la période de préoviposition et diminue la fécondité et la durée du développement embryonnaire (Lakbar, 1999). Aussi le traitement des œufs par le pyriproxifène et le buprofézine (inhibiteur de la synthèse de la chitine) réduisent la viabilité des œufs, la période d'oviposition et la production d'œufs chez un Coléoptère prédateur d'Homoptères *Delphatus catalinae* (Tong-Xian *et al.*, 2004). Des résultats similaires ont été trouvés après l'administration du pyriproxifène sur des nymphes de *Aphis glycines* où le traitement provoque une réduction de la fécondité des adultes femelles à 79% par rapport aux témoins (Richardson & Lagos, 2007). Le fénoxycarbe, agoniste de l'hormone juvénile, prolonge la période de préoviposition, réduit la période

d'oviposition, la fécondité des femelles et supprime à 100% l'éclosion des œufs (Taïbi, 2000). L'effet du fénoxycarbe, à été envisagé sur le développement des œufs de *C. fumiferana* (Haller & Walker, 1996) et de *Solenoptis invicta* (Glancy & Banks, 1988). Il peut perturbé le blastoderme des cellules, avec une désorganisation des organites cellulaires (Dhadialla *et al.*, 1998). L'application du fénoxycarbe induit la stérilité des adultes chez *C. fumiferana* (Dhadialla *et al.*, 1998). Chanbang *et al.*, (2008), Athanassiou *et al.* (2011) ont montré que l'application du méthoprène, un autre analogue de l'hormone juvénile sur les surfaces de riz entraîne une réduction de la fécondité des femelles de *Rhyzopertha dominica* et réduit à 26% l'éclosion des œufs par rapport au témoin qui est à 85%. Ghasemi *et al.* (2010) ont montré que le pyriproxifène réduit significativement le contenu ovarien en métabolites (Lipides, protéines) capté pendant le développement ovarien chez *P. intepunctella*. La même raison pourrait être la cause de la réduction de la fécondité et la viabilité des œufs chez *E. kuehniella*.

D'autre expérimentation ont été faite avec les insecticides inhibiteurs de la synthèse de la chitine. Le traitement *in vivo* combinant respectivement le DFB et le Ketocomazole administré à des femelles de *Gryllus bimaculatus*, réduit le nombre d'œufs déposés par les femelles (Hoffmann *et al.*, 1996). L'administration du FCX par ingestion présentée aux femelles adultes de *T. molitor*, perturbe la reproduction et le développement embryonnaire des œufs. En effet le FCX prolonge la période de préoviposition et réduit la période d'oviposition, la fécondité et supprime à 100% l'éclosion des œufs. (Hami *et al.*, 2004). L'administration du KK-42 (antagoniste de la 20 E), en traitement combiné avant le halofénozide, allonge la période de préoviposition et réduit la période d'oviposition. Ce traitement combiné affecte également la fécondité des femelles et la durée du développement des œufs. Cependant, il est sans effet sur le pourcentage d'éclosion des œufs, contrairement aux résultats obtenus en administrant le halofénozide avant le KK-42 (Taïbi, 2000 ; Amrani, 2007).

4. 6. Effet sur les ecdystéroïdes :

Les ecdystéroïdes, sont des stéroïdes polyhydroxylés présents, chez tous les insectes, chez certains nématodes, et chez de nombreuses plantes (Li *et al.*, 2006). Ils sont essentiels à chaque mue et à chaque changement morphologique qu'un insecte subit (Svoboda & Feldlaufer, 1991). En effet, ils régulent la mue, la métamorphose, l'ovogenèse et la reproduction (Bloch *et al.*, 2000). Les deux ecdystéroïdes les plus communs chez les insectes sont l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone. La voie biosynthétique de l'ecdysone est complexe. Le précurseur synthétique est le cholestérol, substance que les insectes ne peuvent pas le synthétiser, il dépend d'un apport exogène (Lafont *et al.*, 2002 ; Neubueser *et al.*, 2005). La plupart des intermédiaires impliqués dans cette synthèse ont été identifiés et les réactions enzymatiques correspondantes sont maintenant bien connues (Gilbert *et al.*, 2002 ; Gilbert and Rewitz, 2009).

Les ecdystéroïdes agissent en modifiant la transcription de gènes spécifiques. La 20E entre dans les cellules cibles et migre jusqu'au noyau où elle se lie à une molécule réceptrice, le récepteur d'ecdysone (EcR). Pour agir, le récepteur a besoin de former un hétérodimère avec la protéine ultraspiracle (USP) (Yao *et al.*, 1992 ; Bonneton *et al.*, 2003 ; Henrich *et al.*, 2005). Le complexe EcR-USP et 20E interagit soit avec une séquence palindromique (Cherbas *et al.*, 1991) ou une répétition directe (Antoniewski *et al.*, 1996) dans la région du promoteur d'un gène pour induire de nouveaux transcrits d'ARN (Koolman, 1990). Durant la phase ascendante du pic, la fixation de la molécule 20E sur le complexe EcR-USP entraîne l'expression d'une cascade de gènes appelés « up regulated genes » il s'agit de BR-C (Broad complexe), E74, E75 (Kokoza *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007)(Fig. 28) qui code pour la division des cellules épidermiques, la sécrétion du fluide exuvial, la digestion cuticulaire, la synthèse de la cuticuline et l'épicuticule. Au cours de la phase descendante du pic de la 20 E, est en conséquence de la faible concentration ou l'absence de l'hormone, une autre série de gènes «down regulated genes » s'expriment, permettant la mélanisation, la libération de l'hormone d'éclosion et la sclérotisation (Retnakaran *et al.*, 2003)(Fig. 27). La régulation de l'action des ecdystéroïdes se ferait principalement par les niveaux de l'hormone elle même. En

effet, les fluctuations dans les niveaux de récepteur correspondent aux fluctuations des titres d'ecdystéroïdes. Le nombre de récepteurs à tout moment durant le développement serait donc régulé par les titres de l'hormone (Deak et Lauter, 1995). Les ecdystéroïdes de l'hémolymph peuvent aussi jouer un rôle de régulation de la biosynthèse d'ecdysone à certaines périodes de développement, via la régulation par rétroaction de l'axe de PTTH et via l'action directe sur les glandes productrices d'ecdystéroïdes (Beydon et Lafont, 1983). L'HJ est aussi reconnue pour moduler les niveaux d'ecdystéroïdes (Riddiford, 2008).

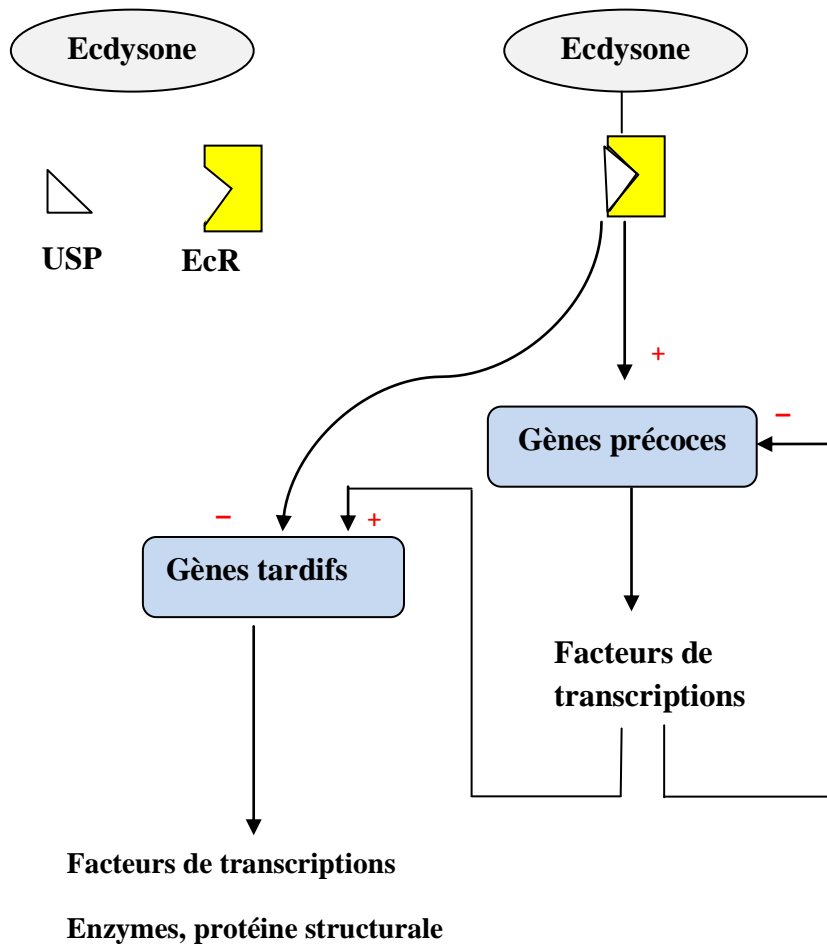


Figure 28 : Mode d'action des ecdystéroïdes (Asbburner, 1974 In Klowden, 2010).

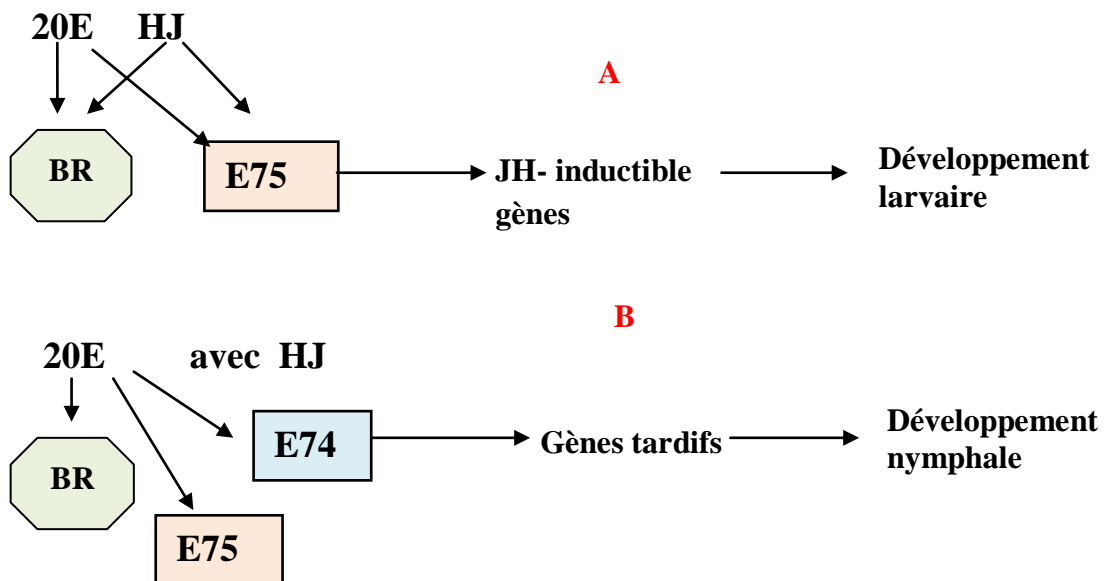


Figure 29. Modèle simple du rôle de BR-C (Broad complexe), **A** : chez la larve et **B** : chez la chrysalide (Klowden, 2010).

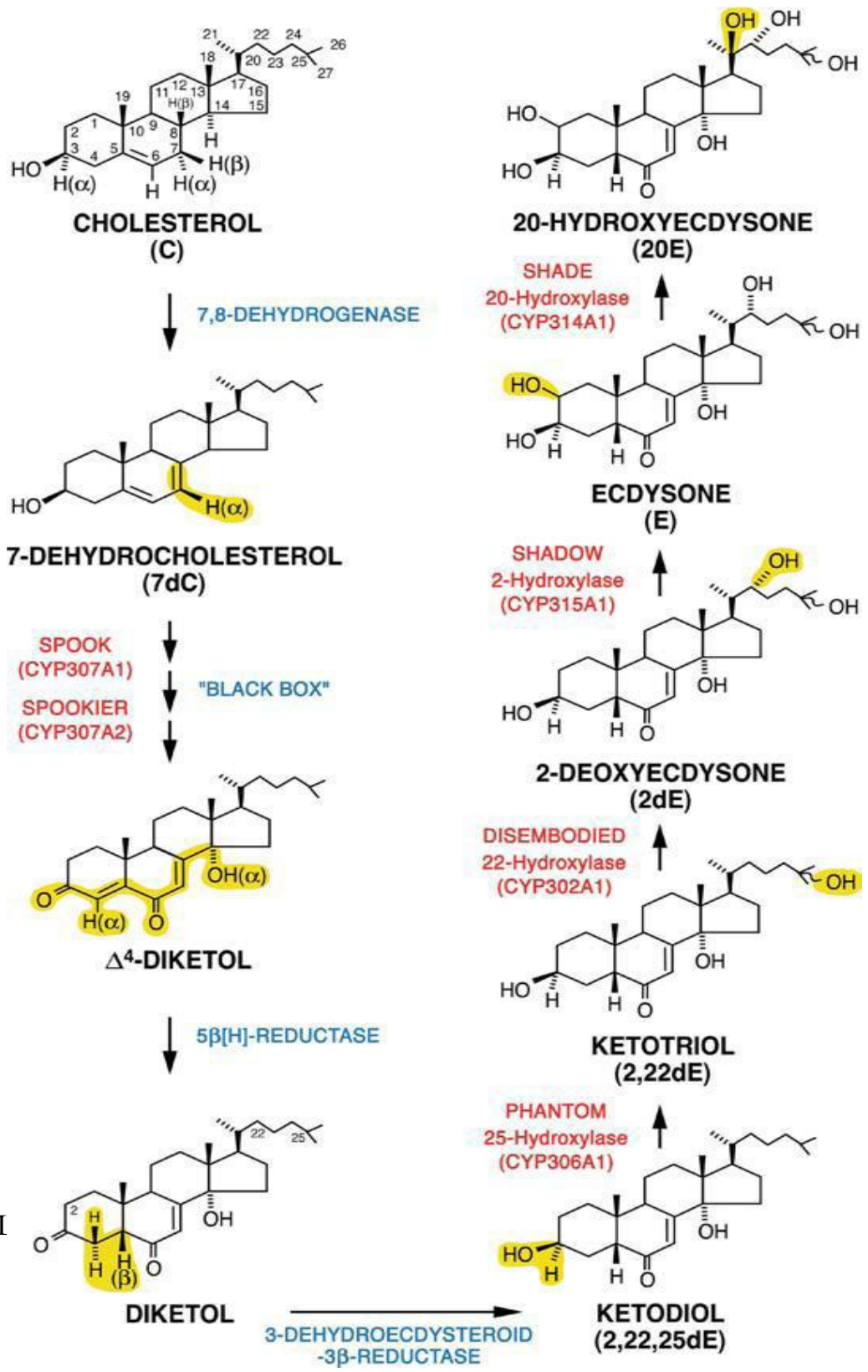


Figure 30. I

Récemment Marchal *et al.* (2010) montrent que de nombreux gènes appelés « Halloween genes » et d'autres gènes sont impliqués dans la voie de biosynthèse des ecdystéroïdes (Fig. 29). Ces gènes d'Halloween, codent pour la synthèse de l'enzyme cytochrome P450, enzyme qui catalyse une série d'étapes d'hydroxylation entraînant la participation active de la 20-hydroxyecdysone (Chavez *et al.*, 2000 ; Niwa *et al.*, 2004 ; Warren *et al.*, 2004 ; Ono *et al.*, 2006 ; Sztal *et al.*, 2007 ; Iga *et al.*, 2010) (Fig. 30).

Les glandes prothoraciques sont la source majeure d'ecdystéroïdes durant le développement larvaire. Ces glandes apoptose après la mue nymphale ou pendant le stade adulte, au cours de laquelle la synthèse des ecdystéroïdes est assurée par les ovaires (Rees *et al.*, 2010). Aussi l'embryon semble être capable de synthétiser *de novo* d'ecdystéroïdes (Maeda *et al.*, 2008). Chez *Blattella germanica*, l'apoptose de la glande prothoracique est stimulée par la 20 E en absence de la JH au cours du dernier stade nymphale (Manc Pados *et al.*, 2010). L'HJ contrôle, sous l'action du cerveau, la transcription des gènes de la vitellogénine et leur synthèse (Li *et al.*, 2003 ; 2004). Chez tous les groupes d'insectes, à l'exception de quelques espèces de diptères, l'HJ est considérée comme la principale hormone gonadotrope chez les femelles adultes, car elle contrôle la synthèse de la vitellogénine (VG) et d'autres protéines au niveau du corps gras et leur libération dans l'hémolymphe où elles sont prélevées par les ovocytes en maturité (Tufail & Takeda, 2008).

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes au cours du stade nymphal chez les chrysalides femelles témoins d'*E. kuehniella*, révèle la présence de deux pics situés à 3 et à 5 jours. L'augmentation des ecdystéroïdes au jour trois semble liée au processus de la reproduction (Zimowska *et al.*, 1991). Des augmentations similaires des concentrations hormonales ont été retrouvées chez la plupart des espèces de Lépidoptères comme *Bombyx mori* (Swevers & Latrou, 1999) et *C. pomonella* (Soltani *et al.*, 1989). Alors que le pic du 5^{ème} jour, semble être responsable du développement imaginal retrouvé aussi chez les mâles d'*E. kuehniella* (El Ouar *et al.*, 2010). Ces taux élevés sécrétés au 5^{ème} jours sont retrouvés également chez *Z. atratus* (Aribi *et al.*, 1999) et chez *T. molitor* (Soltani *et al.*, 2002; Aribi *et al.*, 2006 ; Berghiche *et al.*, 2007) et ils coïncident avec la synthèse de la cuticule pré-exuviale adulte qui débute à

partir du troisième jour et se poursuit jusqu'à la veille de l'exuviation adulte (Maamcha, 1997 ; Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011). Ainsi, le pic à 3 jours paraît d'origine ovarienne, alors que celui du 5^{ème} jour est d'origine prothoracique.

Chez la plupart des insectes, une fluctuation hémolymphatique des taux d'ecdystéroïdes marque les différentes étapes de la vitellogénèse (Hagedorn, 1985; Riddiford, 1985, 1994, Rees, 1995 ; Romana *et al.*, 1995). En effet, chez les femelles de *Musca domestica*, des faibles doses d'ecdystéroïdes sont enregistrées à la pré-vitellogénèse, suivi par un pic au cours de la vitellogénèse proprement dite, puis une diminution des taux est enregistrée à la post-vitellogénèse (Adams *et al.*, 1988). L'administration du RH-2485 à des femelles d'*E. kuehniella* dès l'exuviation nymphale, augmente les taux d'ecdystéroïdes dès le premier jour. Une diminution hautement significative est enregistrée au troisième jour entraînant une suppression du pic hormonal enregistré chez la série traitée qui coïncide avec le déroulement de la vitellogénèse. Cette suppression du pic ovarien pourrait être dû à une perturbation de la vitellogénèse déjà constatée à cette période au niveau de la croissance ovarienne lors du processus de captation des métabolites ovariens. Cependant chez les Lépidoptère dits à « pre-eclosion vitellogenesis » (la vitellogénèse s'effectue au stade nymphal), comme *E. kuehniella*, *B. mori*, *C. pomonella*, *P. interpunctalla* et *L. dispar*, les ecdysteroïdes stimulent la vitellogénèse, mais à des concentrations bien déterminées, une forte dose ou une concentration élevée de la 20 E inhibe ce processus (Tsuchida *et al.*, 1987). En effet, l'administration de forte dose de la 20 E inhibe la vitellogénèse chez *L. Dispar* (Davis *et al.*, 1990). Au cinquième jour, une stimulation des taux d'ecdystéroïdes est encore notée en respectant le pic qui correspond à l'exuviation imaginale. Ces mêmes résultats ont été également, enregistrées chez les femelles de *C. pomonella* (Soltani *et al.*, 1989) et *G. bimaculatulors* (Holfmann *et al.*, 1996) lors du traitement au DFB, un inhibiteur de la synthèse de la chitine.

D'autres mimétiques de la 20 E ont été testés par plusieurs auteurs. Les taux élevés d'ecdystéroïdes détectés après traitement *in vitro* des explants tégumentaires avec le RH-5849 et le RH-5992 sont probablement dus à la capacité des agonistes qui s'explique par la reconnaissance et la jonction de ces molécules aux récepteurs des ecdystéroïdes EcR-USP (Dhadialla *et al.*, 2005), puis la persistance et la stabilité

métabolique de ces agonistes préviennent l'expression des gènes tardifs (Retnakaran *et al.*, 1997). Dhadialla *et al.*, 1998 ont précisé que le halofénozide et le tebufénozide agissent comme des agonistes des ecdystéroïdes à des niveaux cellulaires et biochimiques ; ils ont le même mode d'action que la 20E. Des résultats similaires ont été trouvés avec l'application du RH-0345 qui entraîne des augmentations dans le contenu des ecdystéroïdes chez les nymphes de *T. molitor* (Aribi *et al.* ; 2001 ; Soltani *et al.*, , 2002 ; Berghiche *et al.*, 2007) en gardant la position du pic qui n'a pas été affectées. Les mêmes résultats ont été trouvés chez *E. kuehniella* traitées avec le RH-0345 mais avec une avancée du pic qui s'étale entre deux et quatre jours (El Ouar, 2005 ; Taïbi, 2007). De même, l'application topique du halofénozide à des larves de moustique *Culex pipiens* du quatrième stade larvaire a révélé également, une augmentation significative des taux d'ecdystéroïdes dans le corps entier (Boudjelida *et al.*, 2005). Par contre le tébufénozide et le RH-5849 réduisent les concentrations des ecdystéroïdes dans l'hémolymphe chez *S. exigua* et chez *L. decemlineata* (Smagghe & Degheele, 1995 ; Gu *et al.*, 2008).

Les analogues de l'HJ sont des produits de synthèse, simulant l'action des hormones juvéniles et pouvant restaurer les processus physiologiques et biochimiques nécessitant la présence de ces hormones (Hoffmann et Lorenz, 1998), néanmoins, leur action est dépendante du temps ou de la période de l'application (Tunaz et Uygan, 2004). L'analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les chrysalides femelles traitées au pyriproxifène révèle une augmentation des taux des ecdystéroïdes à 1 et à 7 jours et une diminution hautement significative au troisième jour entraînant une suppression du pic hormonal enregistré chez la série traitée. Cet analogue stimule la synthèse des ecdystéroïdes, via la stimulation du cerveau à sécréter la PTTH qui à son tour stimule la synthèse des ecdystéroïdes (Tunaz & Ugan. 2004), ou via la stimulation directe des glandes prothoraciques, il est important de signaler que l' HJ empêche l'apoptose de ces glandes (Dai & Gilbert, 1998). Une telle action stimulatrice de l'HJ a été également observée chez les chrysalides de *M. sexta* traitées à l'HJ où le pic d'ecdystéroïdes a été aussi supprimé (Dai et Gilbert, 1998). Plusieurs études ont montré que, au début du dernier stade larvaire chez les Lépidoptères l'HJ, agit directement ou indirectement sur les glandes prothoraciques (Marchal *et al.*, 2010) .

Contrairement a nos résultats une action inhibitrice du pyriproxylène sur les taux d'ecdystéroïdes a été rapportée chez quelques espèces de Coléoptères comme *Tribolium freemani* (Hirachima *et al.*, 1995), *T. molitor* (Aribi *et al.*, 2006) ou encore *Z. altratus* traité avec le méthoprène, analogue de l'HJ (Aribi *et al.*, 1999) ; ceci s'explique par la dégénérescence des glandes prothoraciques au cours du stade nymphal (Glitho *et al.*, 1979 ; Aribi *et al.*, 1997) et donc à une modification de la régulation hormonale. De plus, Aribi *et al.*, 2006 ont rapporté que le pyriproxylène réduit la concentration hémolympatique des ecdystéroïdes chez les nymphes durant la métamorphose et diminue significativement la libération des ecdystéroïdes dans le milieu de culture des explants tégumentaires nymphaux de *T. molitor*. Aussi, l'injection ou l'application topique de l'HJ ou l'un de ses analogues (JHA) au début du dernier stade larvaire de *B. mori* provoque un retard dans l'initiation de la transformation larve-nymphe (Marchal *et al.*, 2010). L'inactivation de la glande prothoracique au début du dernier stade larvaire pourrait être dû à l'inhibition de feed back négatif produit par la 20E, qui est maintenue par l'HJ (Takaki & Sakurai, 2003 ; Mizoguchi & Kataoka, 2005). Oberlander *et al.* (2000) a montré que JH-I, JH-III, le méthoprène, fénoxycarbe et le farnesol inhibent la prolifération des cellules du disque imaginal de *P. interpunctella*. Une étude récente de Yamanaka *et al.* (2007) montre l'effet direct de l'HJ sur la glande prothoracique au cours de l'ecdystéroïdogénèse.

Chez les adultes femelles, les cellules folliculaires des ovaires produisent en effet, des ecdystéroïdes qui jouent un rôle important dans le développement des ovaires, la vitellogénèse et la maturation des œufs. De plus les ecdystéroïdes ovariens ont été retrouvée sous deux formes libres et conjuguées. Ces ecdystéroïdes sont absorbé et accumulé dans des œufs matures et servent comme un substrat hormone pour les mues embryonnaires au cours de l'embryogénèse (Hagedorn, 1985 ; Lafont *et al.*, 2005). Des expériences *in vitro* ont permis de démontrer que les ovaires produisent des ecdystéroïdes chez des espèces de différents ordres d'insectes comme *S. gregaria* (Rees & Isaac, 1984), *L. migratoria* (Lagueux *et al.*, 1981), *M. sexta* (Thompson *et al.*, 1987), *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 1999). Récemment il a été montré que les ovaires et les testicules des Crustacées synthétisent également des ecdystéroïdes (Styrishave *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2009).

La quantification des ecdystéroïdes synthétisés par les ovaires des femelles adulte d'*E. kuehniella* témoins et traitées avec les deux régulateurs de croissance des insectes, le RH-2485 et le pyriproxifène a été réalisée par un dosage enzymo-immunologique. Les deux molécules ont été utilisées en traitement simple et combiné. Nos résultats ont révélé une stimulation significative de la production des ecdystéroïdes par les ovaires confirmant des travaux antérieurs faits avec d'autres régulateurs de croissances chez *E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005) et *T. molitor* (Soltani *et al.*, 2002 ; Taibi *et al.*, 2003). Les deux combinaisons RH-2485 suivi du pyriproxifène et pyriproxifène suivi du RH-2485 entraînent aussi une augmentation très hautement significative ($P=0,0001$) de la production des ecdystéroïdes ovariens. Les travaux réalisés *in vitro* par Soltani *et al.*, (1998) et Berghiche (1999) indiquent que les ovaires de *T. molitor* libèrent des ecdystéroïdes dans le milieu de culture. L'administration du RH-0345 stimule la production *in vitro* des ecdystéroïdes par les ovaires âgés de 2 jours. Les résultats obtenus avec le RH-0345, montrent que cet agoniste des ecdystéroïdes administré à 0 et 2 jours après l'émergence, stimule la synthèse des ecdystéroïdes ovariens enregistré après 2 et 4 jours. Plusieurs études indiquent que le mécanisme de l'ecdysioïstéroïdogenèse et le changement du taux d'ecdystéroïdes impliquent différents facteurs, des hormones et des peptides qui peuvent influencer la biosynthèse des ecdystéroïdes (Lafont *et al.*, 2005 ; Lafont & Koolman, 2009). Par conséquent, le halofénozide est susceptible de stimuler le taux des ecdystéroïdes libres. En effet, les taux menés *in vivo* sur *T. molitor* par Soltani-Mazouni *et al.* (2004) ont révélé que le halofénozide, le RH-5992 et le tebufénozide augmentent les taux des ecdystéroïdes ovariens chez les femelles de *T. molitor* adultes. Contrairement à nos résultats le traitement des adultes de *T. molitor* avec différents agonistes des ecdystéroïdes (le RH-5849, le RH-5992 et le RH-0345) à la dose 10 µg/ femelles dès l'émergence adulte, diminue la production d'ecdystéroïdes par les ovaires de 2 et 4 jours correspondant au début et à la fin de la vitellogénèse avec un effet plus significatif enregistré avec le RH-5992 comparativement au RH-0345 et le RH-5849 respectivement (Boukachabia *et al.*, 2003). Un antagoniste de l'hormone de mue le KK-42, administré dès l'émergence des adultes de *T. molitor*, affecte les taux d'ecdystéroïdes ovariens enregistrées après 2 et 4 jours (Amrani *et al.*, 2004). De plus, les résultats obtenus par Amrani (2007) avec le KK-42, mettent en évidence une

production d'ecdystéroïdes lorsqu'il sont incubés, *in vitro*, et que les taux des ecdystéroïdes augmentent au cours de la maturation des ovocytes confirmant les données enregistrées *in vitro* par Soltani-Mazouni *et al.*, (1999). Cette inhibition de la production des ecdystéroïdes par les glandes prothoracique et les ovaires a été aussi mise en évidence *in vitro* et *in vivo* Chez *B. mori* (Kiuchi *et al.*, 1988), *Locusta migratoria* (Jarvis *et al.*, 1994 ; Roussel *et al.*, 1989) et *Gryllus bimaculatus* (Lorenz *et al.*, 1995). Le FCX, inhibiteur de la synthèse de la chitine, utilisé par ingestion provoque une baisse des taux des ecdystéroïdes ovariens chez *T. molitor* (Taïbi, 2000).

Nos résultats montrent que le pyriproxifène entraîne une disparition du pic ovarien chez les femelles. Il a été démontré chez *C. pomonella*, que les HJs exogènes et les analogues de l'HJ entraînent une nécrose folliculaire (Gelbric & Shenal, 1973). Des altérations structurales et physiologiques irréversibles au niveau des ovocytes, en outre, des taux élevés d'HJ ou d'analogue de l'HJ comme le fénoxycarbe entraîne une altération de l'activité neurale et musculaire au niveau des ovaires et de l'oviducte chez la même espèce (Cole *et al.*, 2002), mais aussi des réductions de libération des facteurs stimulateurs de l'oviposition chez *S. littura* (Hatakoshi *et al.*, 1992). Par ailleurs, les analogues de l'HJ, notamment, le méthhoprène, stimule la vitellogénèse chez *Leucophea maedera* (Engelman, 2002). *Psoeudoletia unipuncta* (Cusson *et al.* ; 1994), *H. zea* (Satyanarayan *et al.*, 1994), *Locusta migratoria* (Dhadialla & Watt, 1983).

L'interaction ecdystéroïdes-hormone juvénile a été largement étudiée au cours des stades larvaires (Bollenbacher, 1988 ; Sakurai & Gilbert, 1990) ou l'action de ces deux hormones se limite au contrôle des mues et des métamorphoses. Chez *D. melanogaster*, l'équilibre entre la concentration de 20E et l'HJ semble jouer un rôle important dans le développement des ovocytes au cours du stade nymphale (Gilbert *et al.*, 1998; Soller *et al.*, 1999; Gruntenko & Rauschenbach, 2008). Chez les femelles, l'activité des deux insecticides est plus complexe du fait de la mise en place d'autres processus comme la vitellogénèse et la stéroïdogénèse ovarienne. Ainsi, bien que les rôles de l'ecdysone et l'HJ aient été élucidés dans certaines étapes du développement des ovocytes, chez les insectes, la maturation ovarienne dans son ensemble demeure très complexe puisque de nombreuses interactions synergiques et inhibitrices ont lieu entre ces deux hormones et d'autres neurohormones (Bellés ; 1995 ; Hoffmann et

Sorge, 1996). Divers travaux ont testé l'effet des combinaisons 20E-HJ analogue, dans la régulation ovarienne et sur le processus de la vitellogénèse, mais l'administration du méthoprène ne rétablit pas ce processus (Shirk *et al.*, 1990). De même, le traitement inverse, montre que le méthoprène inhibe la vitellogénèse chez *L. dispar* et cette inhibition n'est pas restauré par la 20 E (Davis *et al.*, 1990).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos expérimentations ont été menées en vue d'évaluer l'action de deux régulateurs de croissance, un mimétique de l'hormone de mue, le RH-2485 et un analogue de l'hormone juvénile, le pyriproxifène, administrés par application topique, à l'émergence des chrysalides d'*E.kuehniella* (Lépidoptère) et d'évaluer leurs effets sur l'inhibition de l'exuviation adulte, la morphométrie des ovaires, l'épaisseur du chorion, le potentiel reproducteur et la production des ecdystéroïdes dans les ovaires et au cours du stade nymphale.

Les essais toxicologiques ont permis de déterminer les DI50 des deux régulateurs de croissance. Ils révèlent des effets insecticides avec une relation dose-réponse. Ils inhibent la mue imaginale avec l'apparition de divers types morphologique et perturbent la durée du stade nymphale.

L'étude morphométrique des ovaires chez les femelles traitées avec le RH-2485 et le pyriproxifène administré *in vivo* à l'émergence des chrysalides, révèle une perturbation de la croissance et le développement des ovaires d'*E.kuehniella*. Ils réduisent le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires, la taille et le volume de l'ovocyte basal au cours de la maturation sexuelle. Ces anomalies morphométrique de l'ovaire induites par le méthoxyfénoside et le pyriproxifène ont affecté la reproduction de l'espèce. De plus, les mensurations du chorion révèlent que le méthoxyfénoside réduit significativement l'épaisseur du chorion, cependant le pyriproxifène n'a aucun effet. Le traitement combiné, pyriproxifène /RH- 2485 entraîne aussi une réduction que lorsque on utilise la combinaison RH-2485/pyriproxifène sur l'épaisseur du chorion. En effet, la combinaison des deux molécules révèle que le pyriproxifène arrive a limité en partie les effets causés par le RH-2485 mais aucune information exacte sur le trajet moléculaire de ces composé n'est disponible.

Les résultats obtenus, concernant le potentiel reproducteur montrent que le RH-2485 n'affecte pas la période de pré-oviposition mais réduit la période d'oviposition,

la fécondité et la viabilité des œufs. Cependant le traitement avec le pyriproxifène provoque un allongement de la période de pré-oviposition et une réduction de la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs. Les expérimentations réalisées montrent que le RH-2485, suivi du pyriproxifène n'a aucun effet sur la période de pré-oviposition mais réduit la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs. Le traitement combinant respectivement le pyriproxifène et le méthoxyfénozide allonge la période de pré-oviposition et réduit la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs, ce qui laisse conclure que la diminution du potentiel reproducteur engendré par le RH-2485 et par le pyriproxifène en traitement seul ou combiné chez *E. kuehniella* est du probablement à l'accumulation de ces insecticides dans les œufs en développement ce qui provoque une réduction du contenu ovarien en protéines et lipides capté pendant le développement ovarien.

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes dans le corps entier au cours du stade nymphal a été réalisé par une méthode immuno-enzymatique (EIA). Le pyriproxifène stimule la production hormonale à 1 et 7 jours tandis que le méthoxyfénozide provoque une augmentation hautement significative des taux à 1 et 5 jours. La comparaison entre les femelles témoins et traitées avec le méthoxyfénozide et le pyriproxifène montre une suppression du pic du troisième jour. De plus, l'évaluation des effets du RH-2485 et du pyriproxifène *in vivo* sur la production d'ecdystéroïdes, dans les ovaires révèle que le RH-2485 et le pyriproxifène, stimulent significativement la synthèse des ecdystéroïdes ovariens par rapport aux témoins. Les deux combinaisons RH-2485 suivi du pyriproxifène et pyriproxifène suivi du RH-2485 entraînent aussi une augmentation très significative de la production des ecdystéroïdes ovariens.

Ainsi, il serait intéressant, d'établir chez *E. kuehniella* :

-une analyse quantitative et qualitative des ecdystéroïdes dans les œufs pondus.

-Une analyse quantitative des métabolites ovariens, puis de confirmer le mode d'action du méthoxyfénozide et du pyriproxifène en traitement seuls et en traitement combiné sur la reproduction des insectes.

RESUMES

Cette étude a examiné l'effet de deux régulateurs de croissances, le méthoxyfénoside un analogue de l'hormone de mue et le pyriproxifène un analogue de l'hormone juvénile. Les molécules ont été évalués, en application topique, sur des chrysalides nouvellement exuviées sur le développement et la reproduction d'un insecte lépidoptère, *Ephestia kuehniella*.

Les résultats mettent en évidence des perturbations au niveau de plusieurs aspects :

Toxicité : Les deux régulateurs de croissances, utilisées *in vivo* par application topique à différente dose : le méthoxyfénoside (0,004- 0,008- 0,02 et 0,04 µg/insecte) et le pyriproxifène (1,25- 2,50- 5,00 et 10 ng/insecte) aux nymphes nouvellement exuviées. Ces composés entraînent une inhibition de l'exuviation adulte avec une relation dose-réponse.

Morphométrie : L'étude morphométrique des ovaires chez les femelles traitées avec les DI50 (0,01µg/insecte et 2,53ng/insecte) du méthoxyfénoside et du pyriproxifène respectivement administrés séparément par application topique à l'émergence des chrysalides, met en évidence l'effet toxique de ces deux molécules qui réduisent le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocytes, la taille et le volume de l'ovocyte basale. L'étude structurale des ovocytes basaux des femelles adulte montre que le méthoxyfénoside réduit significativement l'épaisseur du chorion, cependant le pyriproxifène n'a aucun effet. Le traitement combiné, pyriproxifène suivi par le méthoxyfénoside administrés aux DI 50 entraîne aussi une réduction que lorsqu'on utilise la combinaison méthoxyfénoside suivi par le pyriproxifène sur l'épaisseur du chorion.

Reproduction : L'efficacité du méthoxyfénoside seul ou combiné avec le pyriproxifène sur le potentiel reproducteur, n'affecte pas la période de pré-oviposition mais réduit la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs. Cependant le traitement avec le pyriproxifène seul ou combiné avec le méthoxyfénoside provoque un allongement de la période de pré-oviposition et une réduction de la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs par rapport aux témoins.

Biochimie : L'analyse quantitative des ecdystéroïdes dans le corps entier au cours du stade nymphal a été déterminée grâce à un dosage enzymo-immunologique (EIA). Les résultats obtenus *in vivo* indiquent que le pyriproxifène stimule la production hormonale à 1 et à 7 jours tandis que le méthoxyfénoside provoque une augmentation hautement significative des taux à 1 et à 5 jour. De plus les deux composés entraînent une suppression du pic du troisième jour. Les résultats obtenus montrent que, le RH-2485 et le pyriproxifène, stimulent significativement la synthèse des ecdystéroïdes ovariens par rapport aux témoins. Les deux combinaisons RH-2485 suivi du pyriproxifène et pyriproxifène suivi du RH-2485 entraînent aussi une augmentation très significative de la production des ecdystéroïdes ovariens.

Mots clés : *Ephestia kuehniella*, régulateurs de croissance, toxicité, reproduction, biochimie

Abstract

This study examined the effects of two insect regulators, methoxyfenozide, an ecdysteroid agonist, and pyriproxyfen, an analog of juvenile hormone on *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). The molecules were evaluated on growth and reproduction after topical application on newly ecdysed pupae. Several aspects were investigated:

-Toxicity tests: The compounds were diluted in acetone (2µl/insect) and applied topically at various doses (methoxyfenozide: 0.008- 0.004- 0.02 and 0.04 µg/insect and pyriproxyfen: 1.25- 2.5 -5 and 10 ng/insect) to newly ecdysed pupae. The two tested compounds exhibited insecticidal activity with a dose-response relationship. Mortality occurs following an inhibition of adult emergence.

-Morphometric measurements: Data obtained on ovaries from newly emerged females treated with their respective LD₅₀ (methoxyfenozide: 0.01µg/insect and pyriproxyfen: 2.53ng/insect) revealed that the compounds reduced the weight of ovaries, the number, the size and the volume of basal oocytes. The structural study showed that the thickness of chorion from basal oocytes was reduced only by methoxyfenozide. In addition, the combined treatment pyriproxyfen followed by methoxyfenozide at LD 50 also reduced the thickness of chorion,

-Reproductive events: Methoxyfenozide applied topically alone or combined with pyriproxyfen reduced the duration of the oviposition period, the fecundity and the egg-viability. However, The pyriproxyfen applied alone or combined with methoxyfenozide increased the duration of the pre-oviposition period and to reduce the duration of the oviposition period, the fecundity and the egg- viability, respectively compared to control series.

-Biochemical study: The quantification of ecdysteroids in whole body extracts during the pupal stage was determined by an enzyme-immunoassay. The results indicated that pyriproxyfen stimulates the hormonal amounts at 1 and 7 days while methoxyfenozide causes an increase at day 1 and 5 following treatment. In addition, methoxyfenozide and pyriproxyfen causes a suppression of the peak detected at day 3 as compared to control series. Furthermore, methoxyfenozide and pyriproxyfen increased the ovarian ecdysteroid amounts. The combined treatments (methoxyfenozide followed by pyriproxyfen or pyriproxyfen followed by methoxyfenozide) also enhanced significantly increase in the hormonal amounts in ovaries compared to control series.

Key words: *Ephesia kuehniella*, Insect growth regulators, Methoxyfenozide, Pyriproxyfen Toxicity, Growth, Reproduction, Ovaries, Molting hormone.

ملخص

تمت هذه الدراسة لمعاينة تأثير نوعين من منظمات النمو RH-2485 (مشابه لهرمون الانسلاخ) و pyriproxyfène (مشابه لهرمون الشباب) على عذاري حديثة الانسلاخ بطريقة الدمج الموضوعي (*in vivo*) على نمو و تكاثر حشرة *Ephestia kuehniella* حيث أظهرت النتائج عدة اضطرابات :

(1) دراسة السمية :

تم استخدام منظمات النمو *in vivo* بطريقة الدمج الموضوعي بجرعات مختلفة من RH-2485 (0.004 -0.008 -0.02 و 0.04µg) و pyriproxyfène (1.25 . 2.50 . 5.00 و 10.00ng) في يوم انسلاخ العذاري (0 يوم) أدت إلى تثبيط إنسلاخ الحشرة الكاملة مع وجود علاقة بين الجرعة و الاستجابة.

(2) الدراسة البيومترية :

تمت الدراسة البيومترية لمبيض الإناث المعالجة بجرعة DL_{50} لكل من RH-2485 و Pyriproxyfène مضافة بطريقة منفصلة في يوم الانسلاخ العذاري الإناث على طريق المعالجة السطحية. وضحت النتائج تأثير منظمات النمو على وزن المبايض , عدد البيض , طول و عرض البويضة و حجم لبويضة القاعدية. وضحت الدراسة النسيجية لبويضات إناث *E. Kuehniella* أن ال RH-2485 يؤثر على سمك ال Chorion أما ال pyriproxyfène ليس له أي تأثير. المعالجة بجمع كل من المركبين ال RH-2485/pyriproxyfène لها تأثير على سمك ال Chorion أما الدمج pyriproxyfène/RH-2485 ليس له أي تأثير مقارنة مع الشاهد.

(3) اضطرابات على التكاثر:

إن الدراسة التجريبية تبين أن RH-2485 وحده او بدمجه مع pyriproxyfène لا يؤثر على مدة ما قبل الوضع و ينقص فترة وضع البيض , القدرة التكاثرية و كذلك في نسبة البيض المفقس, إلا أن المعالجة ب pyriproxyfène وحده او بدمجه مع ال RH-2485 أدت إلى زيادة في مدة ما قبل الوضع و نقص في فترة وضع البيض , في القدرة التكاثرية وفي نسبة البيض المفقس مقارنة مع الشاهد .

(4) اضطرابات بيوكيميائية :

التحليل الكمي لهرمون الانسلاخ الأوكديستيرويد (ecdystéroïde) يبين أن ال pyriproxyfène يؤثر ايجابيا على إنتاج هذا الهرمون في اليوم الأول و السابع في المرحلة ما بعد الجنينية إلا أن المركب RH-2485 يزيد من إنتاج الأوكديستيرويد في اليوم الأول و الخامس , كذلك كل من المركبين أدى إلى حذف ذروة اليوم الثالث. بالإضافة يبين التحليل الكمي للهرمون المنتجة من طرف المبيض *in vivo* أن ال RH-2485 و pyriproxyfène يؤثران ايجابيا على هرمون الأوكديستيرويد من طرف المبايض. كذلك الدمج بين المركبين pyriproxyfène/RH-2485 و RH-2485/pyriproxyfène يؤدي إلى زيادة في إنتاج الهرمون من قبل المبايض.

الكلمات المفتاحية: *Ephestia kuehniella*, منظمات النمو , السمية, التكاثر, البيوكيمياء

Références bibliographiques

A

Abbott W.B. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*.**18**:265–267.

Abo-Elghar G.E, El-Sheikh A.E, El-Sayed F.M, El-Maghraby H.M, El-Zun H.M, 2004. Persistence and residual activity of an organophosphate, pirimiphos-methyl, and three IGRs, hexaflumuron, teflubenzuron and pyriproxyfen, against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Pest Manag. Sci.* **60**: 95–102.

Adams T.S., Filipi P.A., 1988. Interaction between juvenile hormone, 20 –hydroxyecdysone, the corpus cardiacum allatum complex, and the ovaries in regulating vitellogenin levels in the housefly, *Musca domestica*. *J. Insect. Physiol.*, Vol. **34 (1)**: 11-19.

Adel, M. M., and F. Sehna. 2000. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* **46**: 267-274.

Bellés X., Comas D., Martin D. & Piulachs., 2000. Molecular aspects of juvenile hormone action upon vitellogenin. *XXI- international congress of Entomology, Brazil, August 20-26.*

Amrani L. Zerguine K. Farine J.P. Smaghe S. et Soltani-Mazouni N. 2004. Imidazole derivative KK42 reduces ecdysteroids titers and reproduction in adult females of *Tenebrio molitor* .Pesticide Biochemistry and Physiology. **80** : 163-172

Amrani L., 2007. Bioactivité de deux régulateurs de croissance, le derive de l'imidazole (KK-42) et le mimétique des ecdystéroïdes (RH-0345) sur la reproduction de *Tenebrio molitor* : Morphométrie de l'ovaire, potentiel reproducteur et production hormonale. Thèse de Doctorat. Université d'Annaba. Algérie.

Andersen w.A. & Ellis R. A., 1965. Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi* : flagellum, microtubules and the kinoplaste. *j. Protozool.*, **12** :483-499.

- Antoniewski C., O'Grady M.S., Edmondson R.G., Lassieur S.M. & Benes H. 1996.** Characterization of an EcR/USP heterodimer target site that mediates ecdysone responsiveness of the *Drosophila Lsp-2* gene. *Molec. Gen. Genet.* **249**:545-556.
- Aribi N., 1997.** L'entrée en métamorphose chez *Zophoba atratus* (Coleoptera : tenebrionidae) : Analyse des ecdystéroïdes ; effet de l'isolement (groupement) ; effet de régulateurs de croissance et étude des sources hormonales. Thèse Doctorat, Université d'Annaba, Algerie.
- Aribi N., Pitoizet N., Quennedy A. & Delbecque J. P., 1997.** 2-Deoxyecdysone is a circulating ecdysteroid in beetle *Zophobas atratus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1335**: 246-25.
- Aribi N., Quennedey A., Soltani N., Delbecque J.P., 1999.** L'initiation de la métamorphose chez *Zophobas atratus*: (Coleoptera: Tenebrionidae): eVects des ligatures et des régulateurs de croissance, *Ann. Soc. Entomol. Fr.* (NS 35) 59–64.
- Aribi N., Lacbar C., Smaghe G. & Soltani N. 2001.** Comparative action of RH-0345 and pyriproxyfen on molting hormone production and protein analysis in mealworm pupae. *Med . Fac Landbouww. Univ. Gent* **66 (2a)**: 445-454.
- Aribi N., Smaghe G., Lakbar S., Soltani-Mazouni N., Soltani N., 2006.** Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*, *Pesticide Biochemistry and Physiology* **84**: 55–62.
- Arthur, F.H., Lui, S., Zhao, B., Phillips, T.W., 2009.** Residual efficacy of pyriproxyfen and hydroprene applied to wood, metal and concrete for control of stored-product insects. *Pest Management Science* **65**: 791-797.
- Asahina M., Fugo H. & Takeda S., 1994.** Ecdystéroïds synthesis in dissociated Cells of the prothoracique glands of silkworm, *Bombix mori*. *Zool.*, **11 (1)** 107-111.
- Athanassiou C.G., Arthur F. H. & Throne J. E., 2011.** Efficacy of layer treatment with methoprene for control of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) on wheat, rice and maize. *Pest Manag Sci*; **67**: 380–384.

B

- Balachowsky, 1972.** Blood sucking ticks (Ixodoidea)- Vectors – of diseases of man and animals. *Mix. Publ. Ent. Soc. Am.* **8**: 161-376.

- Bataille A., anton M., Mollat F., Bobe M., Bonneau C. Caramaniam M.N., Geraut G. & Dupas D., 1985.** Respiratory allergies among symptomatic bakers and pastry cooks : initial results of a prevalence study.(French). *Allergie et immunologie.*, **27(1)**: 7-10.
- Bath R. H. & Lester L. j., 1973.** Neuro-hormonal control of sexual behavior in insects. *Ann. Rev. Entomol.* **18** : 445- 472.
- Bellés X., 2005.** Vitellogenesis directed by juvenile hormone. *In. Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 12 Part B: Progress in vitellogenesis* A. S. Raikhel (Eds.), Science Publishers, Enfield, USA/Plymouth, UK, **pp.** 157-197.
- Bellés X. & Maestro J.L. 2005.** Endocrine peptides and insect reproduction. *Invert. Reprod. Devel.*, **47 (1)**: 23-37
- Bendjddou F., Bouslama Z., chebira S. & Soltani N., 1998.** Effects of flucyclohexuron, a benzoyl phenyl urea derivative, on growth, development and cuticule secretion in *Ephestia kuehniella*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **63(2b)**: 575-580.
- Berghiche H., 1999.** Activité in vitro d'un nouvel agoniste des ecdystéroïdes (RH-0345) sur deux organes ecdysiosynthétiques, le tégument et l'ovaire chez *Tenebrio molitor* : Production hormonale, cuticulogénèse et morphométrie de l'ovaire. Thèse de Magister en biologie animale. Université de Annaba. Algérie.
- Berghiche H., Houamria M., Smagghe G. & Soltani N. 2005.** Activity of KK-42 in combined treatment with RH-0345 or 20 hydroxyecdysone on morphometric measurement and free ecdysteroid in eggs of mealworms *Comm. Appl. Biol. Sci.*, Ghent University, 70/4.
- Berghiche H., Smagghe G., Van De velde S. & Soltani N. 2007.** *In vitro* cultures of pupal integumental explants to bioassay insect growth regulators with ecdysteroid activity for ecdysteroid amounts and cuticule secretion. *African Journal of Agricultural Research.* **2 (5)**: 208-213.
- Berghiche, H., M. Houfida, S. Van de Velde, N. Soltani, and G. Smagghe. 2008.** Effects of two insect growth regulators on the ecdysteroid contents in eggs of the mealworm. *Belg. J. Zool.*, **138**: 140-145.
- Berry S.J., 1985. Reproductive system.** In Bulm M.S. (Eds): *Fundamentals of insect physiology.* J. Wiley and Sons, New York., **pp.**437-466.
- Beydon P. & Lafont, R. 1983.** Feedback inhibition of ecdysone production by 20-hydroxyecdysone in *Pieris brassicae* pupae. *J. Insect Physiol.* **29** : 529-533

Biddinger, D., L. Hull, H. Huang, B. McPheron, and M. Loyer. 2006. Sublethal effects of chronic exposure to tebufenozide on the development, survival, and reproduction of the tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* **99**: 834-842.

Bloch G., Hefetz A. & Hartfelder K., 2000. Ecdysteroid titer, ovary status, and dominance in adult worker and queen bumble bees (*Bombus terrestris*). *Journal of Insect Physiology* **46**: 1033-1040.

Bollenbacker W. E., 1988. The interendocrine regulation of Laval-pupal development in the Tobacco hornworm, *Manduca sexta*: a model. *J. Insect. Physiol.* **34**: 941- 947.

Bonneton F., Zelus D., Iwema T., Robinson-Rechavi M. & Laudet V., 2003. Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between EcR and USP-RXR. *Mol. Biol. Evol.*, **20 (4)**: 551- 553.

Boudjelida H., Bouaziz A., Soin T., Smaghe G., 2005. Effects of ecdysone agonist halofenozide against *Culex pipiens*. *Pest. Biochem. Physiol.* **83**: 115-123.

Boukachbia A., Soltani-Mazouni N., Smaghe G & Soltani N. 2003. Comparative effects of some ecdysteroid agonists in mealworm : ecdysteroid amounts and protein analysis in developing ovaries under in vivo conditions. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University*, **68(4a)**: 307-312.

Brévault, L. Couston, A. Bertrand, M. Thézé, S. Nibouche, M. Vaissayre. 2009. Sequential pegboard to support small farmers in cotton pest control decision-making in Cameroon. *Crop protection* **28**: 968-973.

Browder M. H. D'Amico L. J., Nijhout H. F., 2001. The role of Low levels of juvenile hormone esterase in metamorphosis of *Manduca sexta*. *J. Insect. Sci.* **1**: 11-15.

Brown M.R., Sieglaff D.H., & Rees H.H., 2009. Gonadal ecdysteroidogenesis in arthropoda: occurrence and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **54**: 105-125.

Bruce A. & Baratt. 2008. Assessment of methoxyfenozide exposure on the sexual attractiveness and responsiveness of adult codling moth, *Cydia pomonella* L., in small orchard blocks. Entomology program Area, division of Plant Sciences, *Agriculture buildmbia, University of Missouri, Columbia, MO 62511, USA*, 1-31.

- Carlson G.R, Dhadialla TS, Hunter R, Jansson RK, Jany CS, Lidert Z, et al., 2001.** The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *PestManag Sci* **57**:115–119 (2001).
- Cassier P. 1996.** L'expression de deux milieux: le passage de la vie imaginable chez les insectes. Le contrôle endocrine. *Bull. Soc. Zol., Fr.* **121 (2)**, 187-197.
- Cassier P., Lafont R., Descamps M., Porchet M., Soyez D., 1997.** La reproduction des invertébrés : Stratégies, modalités et régulation. *Edition Masson.*, p. 354.
- Chanbang Y., Arthur F.H., Wilde G.E., Throne J.E., Subramanyam B.H. 2008.** Susceptibility of eggs and adult fecundity of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, exposed to methoprene. *J. Insect Sci.* **8(48)**: 1–5.
- Charmillot p.J., Gourmelon A., Fabre A. L., & Pasquier D., 2001.** Ovicidal and Larvicidal effectiveness of several insect growth inhibitors on the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera; Tortricidae) *J. Appl. Entomol.*, **125**: 147-153.
- Charmillot P. J., Pasquier D., 2004.** Efficacité larvicide de différents insecticides incorporés au milieu artificiel d'élevage sur les vers de la grappe. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. **36 (3)**: 141-145.
- Chavez VM, Marques G, Delbecque JP, Kobayashi K, Hollingsworth M, Burr J. 2000.** The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* ;**127**:4115–26
- Chebira S., Soltani N., & Smagghe G., 2006.** Uptake and distribution of three insect growth regulators-diflubenzuron, flucycloxuron and halofenizide- in pupae and adults of *Tenebrio molitor*. *Phytoparasitica*, **34(2)**: 187-196.
- Chen L, Zhu J, Sun G. & Raikhel A.S., 2004.** The early gene *Broad* is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Mol. Endocrinol.* **33**: 743-761.
- Chen C.H. & Gu S.H., 2006.** Stagge-dependent effects of starvation on the growth, metamorphosis, and ecdysteroidogenesis by the prothoracic glands during the last larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect. Physiol.* **52**: 968-974.

Cherbas, L., Lee, K. & Cherbas, P. 1991. Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* Eip28/29 gene. *Genes Dev.* **5**: 120-131

Cilss, 1992 - Sahel PV-INFO. *Bull. Inf. Prot. Végét. UCTR/PV*, **48** : 25.

Cipola C., Lugo G., Sassi C., Belisario A., Nucci M. C. Palermo A., Pascarolli M.A. Nobile M. & Raffi G.B., 1996. A new risk of occupational disease : allergic asthma rhinoconjunctivitis in persons working with beneficial arthropods. *Insect. Arch. Occup. Environ Health.*, **68**: 133-135.

Cole T.J., Ramaswamy S. B., Srinivasan A. & Dorn S., 2002. Juvenile hormone catabolism and oviposition in the codling Moth, *Cydia pomonella*, as function of age, Mating status, and hormone treatment. *Archiv. Insect. Biochem. Physiol.*, **49**: 10- 21.

Cusson M. & Palli S.R., 2000. Can juvenile hormone research help rejuvenate integrated pest management? *Can. Entomol.*, **132**: 263-283.

Cusson M.C.G., Carruthers K. Wyatt G. R. Tobe S. S. & Mc Neil J. N., 1994. Regulation of vitellogenin production in army word moth, *Pseudaletia unipuncta*. *Journal of .T. Isect physiology*, **40** : 183-199.

D

Daas O., Daas, T., Scaps, P., Descamps, M., 2005. –Compared toxicity of two ecdysteroid analogs (RH-0345 and RH-5992) and of a JH mimic (pyriproxyfen) on *Eupolybothrus elongatus* (Myriapoda: Chilopoda). Hemelymph components. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **130(3)**: 303-313

Daas, O., Scaps, P., Bouzerna, N., Descamps, M., 2007. Effects of two ecdysteroid analogs (RH-0345 and RH-2485) on the total growth of *Eupolybothrus nudicornis* (Myriapoda, Chilopoda). *Vie et Milieu – Life and Environment*. **57(1/2)**: 5pp.

Dai J.D., Gilbert L.I., 1998. Juvenile hormone prevents the onset of programmed cell death in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol* ;**109**:155–65.

Darriet F. & Corbel V., 2006. Laboratory evaluation of pyriproxyfen and spinosad, alone and in combination, against *Aedes aegypti* larvae. *J. Med. Entomol.* **43**, 1190–1194.

Davis R. E., Kelly T. J., Masler E. P., Fescemeyer H. W., Thyagaraja B. S., Borkovec A. B., 1990. Hormonal control of vitellogenesis in the gypsy moth, *lymantria dispar* (L.): suppression of

hemolymph vitellogenin by the juvenile hormone analog, methoprene. *J. Insect. Physiol.* **36** : 231-238.

Davis R. E., Williams D. R., Turner P. C., Rees H. H., 2006. characterization in relation to development of an ecdysteroid agonist-responsive cytochrome P 450, CYP18A1, in *Lepidoptera*. *Arch. Biochem. Biophysics.* 453-2-10.

Deak, P. & Lauter, H. 1995. Ecdysteroids receptor in *Chironomus thummi* (Diptera: Chironomidae). *Eur. J. Entomol.* **92** : 251-257

Delbecque JP, Weidner K, Hoffmann KH., 1990. Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invert Reprod Devel*; **18**: 29-42.

Dhadialla T. S. & Wyatt G. R., 1983. Juvenile hormone dependant vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body: inducibility related to sex and stage. *Devl. Biol.* **96**: 436-444.

Dhadialla S., R. Carlson, and P. Le. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu.Rev. Entomol.* **43**: 545-569.

Dhadialla T.S., Retnakaran A. Smagghe G. 2005. Insect Growth- and development- Disrupting Insecticides. *Article number in press : NSCT/ 00076.*

Dhadialla T.S., Retnakaran A., Smagghe G., 2005. Insect growth and development-disturbing insecticides, in: L.I. Gilbert, K Iatrou, S.S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 6, Elsevier-Pergamon, Oxford, UK, 2005, pp.

Dhadialla T.S & Ross R., 2007. Bisacylhydrazines: novel chemistry for insect control. In: Kramer W, Schirmer U, editors. *Modern crop protection compounds*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 773-796.

Ding W.E., Shaaya j.j, Wang Z. M. Zhao & Goa F., 2002. Acute lethal effect of two insect growth regulators on *Liposcelis entomophila* (Psocoptera; Liposcellididae). *Zool. Res.*, **23**: 173-176.

Dorn S., Frishknecht M.L., Martinez V., Zurfluh R. & Fisher U., 1981. A novel non-neurotoxic insecticide with a broad activity spectrum. *Z. Pflanzenkrankh.*, **88**:269-257.

Doumandji-Mitiche, 1977. Etude d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* (Zeller). *Ann. Ent.* El Harrach.

E

Eizaguirre M, López C, Schafellner Ch, Sehnal F., 2007. Effects of ecdysteroid agonist RH-2485 reveal interactions between ecdysteroids and juvenile hormones in the development of *Sesamia nonagrioides*. *Arch Insect Biochem Physiol* **65**: 74-84.

Elbert A. & Nauen R., 2000. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest. Manag. Sci.*, **56**:60-64.

El Ouar I., 2005. Effets d'un analogue de l'hormone de mue (RH-0345) et de l'hormone juvénile (Pyriproxifène) au cours du stade nymphal d'*Ephestia kuehniella* (Lépidoptera). Dosage des ecdystéroïdes et de la Glutathion S- transférase. Thèse de Magister en physiologie Animale.

El Ouar I. Aribi N. & Soltani –Mazoubi N., 2010. Dosage des ecdystéroïdes chez *Ephestia kuehniella*. O. Himmi (ed). Actes de la CIFE VI. Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat, 2010. N° 47, Tome **I** : 137-140.

Engelmann F., 1979. Insect vitellogenin : identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. In : Treherne J. E., Berridge M. J., wigglesworth V. B. (Eds). Advances in insect physiology, New York, academic Press, 49-108.

Engelmann F., 2002. Ecdysteroids, juvenile hormone and vitellogenesis in the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. Insect. Sci.*, **2**: 20- 28.

Evans, H.E. (1984). Insect Biology. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Massachusetts.

F

Farinós G. P., Smaghe G., Tirry L., Castanera P., 1999. Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeonnymus mariaefrancisciae* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **41** : 201-213.

Finney D.J., 1971. Probit analysis. 3rd ed. London: Cambridge University Press.

Fisher R. & Yates, 1957. Statical tables for biological agricultural and medical research. 5^{eme} edition, Olivier et Boyd .London. p. 64-66

Freind D. S. & farequar H. E. ,1967. functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. *J. Cell. Biol.*, **35**: 357-376.

G

Gäde G., Hoffman K. H., Spring J.H., 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future directions, *Physiol. Rev.* **77**: 963–1032.

Gäde G. & Hoffmann K. H., 2005. Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol. Entomol.*, **30**: 103-121.

Gadenne C.,Grenier S., Plantevin G. & Mauchamp b., 1990. Effects of juvenile hormone mimetic, Fenoxycarb, on post- embryonic of the European comborer, *Ostrinia nubilalis Hbs.*, **46**:744-745.

Geber G. H., 1967. A possible mechanism for the regulation of the female reproduction cycle in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Can. Entomol.*, **99**: 1298-1303.

Ghasemi A., Sendi J.J., Ghadamyari M., 2010.Physiological and Biochemical effect of pyriproxyfen on Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Huber) (Lepidoptera: Pyralidae). *Jourman of plant protection research* vol. **50(4)**:416-422.

Gilbert L.I., Song Q., & Rybczynski R., 1997. Control of ecdysteroidogenesis. Activation and inhibition of prothoracic gland activity. *Invert Neurosci* 1997; **3**: 205–46.

Gilbert L.I., Serafin R.B., Watkins N.L., & Richard D.S., 1998. Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *J. Insect Physiol.* **44**: 637-644.

Gilbert, L.I., Granger, N.A., Roe, R.M., 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 617–644.

Gilbert L.I., Rybczynski R, Warren G.T. 2002. Control and bio-chemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Revu. Entomol.* **47**: 883-916.

Gilbert L.I., 2008. *Drosophila* is an inclusive model for human diseases, growth and development. *Mo.l Cell Endocrinol*, **293(1-2)**:25-31.

- Gilbert, L. I., and Rewitz, K.F. (2009).** The function and evolution of the halloween genes: the pathway to the arthropod molting hormone. In: Smagghe, G. (Ed.), *Ecdysone: Structure and Function*, Springer, Netherlands, pp. 231-269.
- Glitho I., Delbeque J. P. & Delachambre J., 1979.** Prothoracic gland involution related to molting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* (L.) *Insect. Physiol.*, **25** : 187-191.
- Gobbi, A., F. Budia, M. I. Schneider, P. Del Estal, S. Pineda, and E. Vinüela. 2000.** Acción del tebufenocida sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Mythimna unipuncta* Haworth) y *Spodoptera exigua* (Hübner). *Biol. San. Veg. Plagas* **26**: 119-127.
- Goodman W. G. & Chang E. S., 1985.** Juvenil hormone cellular and hmolymph binding proteins. In: *comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Parmacology*. kerkut. G. a. and Gilbert L. I. (eds), Pergamon Press. Oxford. 7: 491-510.
- Gorman k., Hewitt E., Denholm I. & Devine G. j., 2002.** New development in insecticide resistance in the glasshouse whitefly (*Trialeurode vaporariorism*) and the two spotted spider mite (*Tetranychbus uricae*) in the UK. *Pest. Manag. Sci.*, **58**: 123-130.
- Granger N. A., Rybczynski R. & Gilbert L. I., 2000.** Contrôle of juvenil hormone synthesis by the corpus allatum. Xxi. International Congress of Entomology. Brazil, 20-26, 2000.
- Gruntenko N.E., & Rauschenbach I.Y., 2008.** Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J. Insect Physiol.* **54**: 902-908.
- Grünewald B., 2006.** *Neurobiol Learn Mem.* ; **86(2)**:164-74
- Gu S. H., Lin J., L., Lin P. L., Kou R., & Smagghe G., 2008.** Effects of RH-5992 on Ecdysteroidogenesis of the Prothoracic Glands During the Fourth Larval Instar of the Silkworm, *Bombyx mori*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **68**:197–205.
- Gullan, P.J., and Cranston, P.S., 2005.** *The insects: An outline of entomology* (3rd ed.). Malden, Ma: Blackwell Publishing.

H

- Habes D., Kilani-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 Stransferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **84**: 17-24.
- Hagedorn H.H., 1985.** The role of ecdysteroids in reproduction. Dans Comprehensive insect physiology, Biochemistry and pharmacology. Kerkut G. A. et Gilbert, L. I. (Eds), Pergamon, Oxford, **Vol 8**: 205- 262.
- Hagedorn H.H., 1989.** The role of ecdysteroids in reproduction. In G.A.Kerkut et L.I. Gilbert (Eds). *Compreh. Insect. Biochem.; Physiol. Pharmacol* **Vol.8** pp 205-262.
- Hami M., Taïbi F., Soltani-Mazouni N. 2004.** Effects of flucycloxuron, chitin synthesis inhibitor on reproductive events and thickness of chorion in mealworms. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **69 (3)**: 249–255.
- Hami M., Taïbi F., Smaghe G. & Soltani-Mazouni N., 2005.**"Comparative toxicity of three ecdysone agoniste insecticides against the mediterranean flour moth", *Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, **70(4)**:767-772.
- Hartfelder K., 2000.** Insect juvenile hormone: from " *status quo* " to high society. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **33**: 157-177.
- Hatakoshi M. Nakayama I., & Riddiford L.M., 1986.** The induction of imperfect supernumerary larval molt by juvenile hormone analogs in *Manduca sexta.*, *J. Insect. Physiol.* **34**: 373-378.
- Henrick, C. A. 2007.** Methoprene. *J. Am. Mosq. Control Assc.* **23**: 225-239.
- Hinton H.H., 1981.** Biology of insect eggs. Pergamon Press, Oxford..
- Hardie J. et al., 1985.** The identification of an aphid juvenile hormone, and its titre in relation to photoperiod. *Physiol. Entomol.*, **10**: 297-302
- Hirachima R., Takeya E., Tanigushi M. & Eto M., 1995.** Metamorphosis, activity of juvenile hormone esterase and alteration of ecdysteroid titers: effects of larval density and various stresses on the red flour beetle *Tribolium freeman Hinton* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Insect. Physiol.* **51**: 383-388.

Hoffmann K. H., Espig W., Weidner K. & Librich W., 1990. Modulation of hormone titers during insect reproduction by external factors, pp. 291-296. *In* : M. Hoshiet O. Yamashita (eds.) : *Advances in invertebrate reproduction*, Vol. 5, Elsevier, Amsterdam.

Hoffmann K.H. & Sorge D., 1996. Vitellogenin levels in allectomized female crickets *Gryllus bimaculatus* de geer (Ensifera, Gryllidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **32**:549-558.

Hoffman K.H. & Lorenz M.W., 1998. Recent advances in Hormones in Insect pest control. *Phytoparasitica* **26**(4): 1-8.

Huang X, Warren JT, Gilbert LI., 2008. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J Genet Genomics*; **35**:1-10

I

Iga M. & Smaghe G. 2010. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Peptides*; 31:456-67.

Ishaaya I., 2001. Biochemical processes related to insecticide actions: an overview. In: Ishaaya I., (Ed), *Biochemical sites of Insecticide action and resistance*. Springer, Berlin pp. 1-6.

J

Javis T.D., Early F.G.P. & Rees H.H., 1994. Inhibition of the ecdysteroid biosynthesis pathway in ovarian follicle cells of *Logusta migratoria*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **48**: 153-162.

Jenkins S. P., Brown M. R. & Lea A. O., 1992. Inactive prothoracic glands in larvae and pupae *Aedes aegypti* ecdysteroid release by tissues in the thorax and abdomen. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **22** (6): 553-559.

Judy K.J., Schooley, D.A., Dunham, L.L., Hall, M.S., Bergot, B.J., and Siddall, J.B. 1973. Isolation, structure, and absolute configuration of a new natural insect juvenile hormone from *Manduca sexta*. *Proc Natl Acad Sci*, **70**: 1509-1513.

Jurenka R., 2011. Physiology and maintenance- Insect physiology-Encyclopedia of lik support systems (EOLSS).

K

- Kallupur V.L., Majumber C. & Roe R.M., 1996.** In vivo and in vitro tissues specific metabolism of juvenile hormone during the last stadium of cabbage looper, *Trico plusia*. *J. Insect. Physiol.*, **42**:181-190.
- Karnovski M.J., 1965.** A formaldehyde – gluteraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **27**: 137A.
- Kellouche A. & Soltani N., 2006.** Impact of hexaflumuraon, a chitin synthesis inhibitor, on growth, development and reproductive performance of the progeny in *Callosobruchus maculatus* after adult treatments. *African Journal of Agricultural Research*, Vol. 1 (3) : 57-64.
- Khebbeb, M. E. H., Gaouaoui, R. & Bendjeddou, F., 2008.** Tebufenozide effects on the reproductive potentials of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* . *African Journal of Biotechnology* Vol. **7 (8)**: 1166-1170
- Kidokora K., Iwata K.I., Fujiwara Y. & Takeda M., 2006.** Effects of juvenile hormone analogs and 20-hydroxyecdysone on diapauses termination in eggs of *Locusta migratoria* and *Oxya yezoensis*. *J. Insect. Physiol.* **52**: 473- 479.
- Kilani-Morakchi S, Aribi N, Soltani N., 2009a.** Activity of boric acid on German cockroaches: Analysis of residues and effects on reproduction. *Afr. J. Biotechnol.* **8**: 703-708.
- Kiuchi M. & Akai H., 1988.** *In Vivo* and *in vitro* inhibition of prothoracic gland activity by 1-benzyl-5- [- 2,6- dimethyl -1,5-heptadienyl] imidazole, KK-42, in *Bombyx mori*, in “Invertebrate and Fish Tissue Culture” (Kuroda Y., Kurstak E. & Maramorosch E., eds), *Japan. Sci. Sos. Press. Tokyo.*,p. 60-63
- Klowden M.J., 2010.** physiological system in insects. Academic press ISBN.
- Knight, A. L. 2000.** Tebufenozide targeted against codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) adults, eggs, and larvae. *J. Econ. Entomol.* **93**: 1760-1767.
- Koepe j. K. Fuchs m., Chen T. T., Hunt L. M., Kovalick G. E., Briers T., 1985.** The role of juvenile hormone in reproduction in: *Comprehensive Insect Biochem. And Pharmacology*, Kerkut, G. A. and Gilbert, L.I. (Eds) *Pergamon Press, Oxford.*, **8**: 165- 203.
- Kokoza V.A., Martin D., Mienaltowski M.J., Ahmed A., et al., 2001.** Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene* **274**: 47-65.

Koolman J., 1990. Ecdysteroids, *Zool. Sci.* **7**:563–580.

Kort C. A. D. & Granger N. A., 1996. Regulation of JH titers: the relevance of degradative enzyme and binding proteins. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **20**: 87-105.

Kozlova T. Y. & Thummel C.S., 2003. Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*, **301** : 911-1914.

Kumar K. & Santharam G., 2008. Toxicity of RH-2485 (Methoxy fenocide20F) against *Helicoverpa armigera* (Hub.) *Journal of Biopesticides*, **1(2)**:199- 200 (2008)

Kuwano E., Fujita N., Furuta K., Yamada N. 2008. Synthesis and biological activity of novel anti-juvenile hormone agents. *J. Pestic. Sci.* **33 (1)**: 14–16.

L

Labeyrie V., 1992. Problèmes fondamentaux posés par les insectes des denrées. *In* : Foua-Bi K. & Philogène B.J.R., éd. *Actes du séminaire international à Abidjan, Côte d'Ivoire, 29 janvier-1 février 1992*, 9-14.

Lafont R., 1994. Contrôle hormonal des mues et des métamorphose des arthropodes fait établis et question ouvertes. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **119(3)**: 1985-1999.

Lafont R. & Toullec J. Y., 1997. Les insectes. *In Encyclopaedia Universalis*. Volume 12-CD ROM. Version 3.0.

Lafont R., Harmatha J.F., Marion-poll L., Dinan, Wilson D., 2002. Régulation cellulaire de la synthèse des ecdystéroïdes, the ecdysone *Hand Book*, 3rd edition.

Lafont R. Dauphin-Villemant C. Warren J.T. Rees H.H., 2005. Ecdysteroid chemistry and biochemistry. *In*: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive molecular insect science*. Oxford: Elsevier; **p.** 125–95.

Lafont R. & Koolman J., 2009. Diversity of ecdysteroids in animal species. *In* Ecdysone: structure and functions, G. Samghe (Ed.).Chapter 2 Springer Science + Business B.V. **pp.** 47-72.

Lagueux M., Harry P. & Hoffman J.A., 1981. Ecdysteroids are bound s of to vitelling in newly laid eggs of *Locusta*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **P.** 224- 325.

Lamy M., 2001. La reproduction, Insectes. 85 N° 121 (2).

Lanot R., Dorn A., Günsten B., Thiebold J., Lagueux M., Hoffman J. A., 1989. functions of ecdysteroids in oocyte maturation and embryonic of Insects, 260-270. In J. Koolmann (ed) : Ecdysone, from chemistry to mode of action. *Thieme Stuttgart*.

Laverdure A. M., 1972. L'évolution de l'ovaire chez les femelles adultes de *Tenebrio molitor* : La Vitellogénèse. *J. Insect Physiol.*, **18** : 1369- 1385.

Lawrence P.O. 1992. Egg development in *Anastrepha suspensa*: influence of the ecdysone agonist, RH-5849. In: Aluja M, Liedo P, editors. Fruit flies: recent advance in research and control programs. New York, NY: Verlag, p.51-56.

Li Y., Unnithan G.C., Veenstara J.A., Feyerisen R. & Noriega F. G., 2003. Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti* *in vitro*: effect of farnesoic acid and Aedes allatotropin, *J. Exp. Biol.*, **206**: 1825- 1832.

Li Y., Hernandez-Martinez S. & Noriega F. G., 2004. Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in mosquitoes, effect of allatostatic head factors, PISCF and YXFCL-Amid-allatostatins, *Regul. Pept.*, **118**: 175-182.

Li Y., Warren J. T., Boyen G., Gilbert L. I., Gold A., Sangaiah R., Ball L. M. and Swenberg J. A., 2006. Profiling of ecdysteroids in complex biological samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20(2)**: 185-192.

Lim J.L., Yap H.H., 1996. Induction of wing twisting abnormalities and sterility on German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) by a juvenoid pyriproxyfen. *J. Econ. Entomol.* **89**: 1161-1165.

Lim S.P., Lee C.Y., 2005. Effects of juvenile hormone analogs on new reproductives and colony growth of Pharaoh ant (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* **98**: 2169-2175.

Liu T.X. & Chen T.Y., 2001. Effects of a juvenile hormone analog, pyriproxyfen, on the apterus form of *Lipaphis erysimi*. *Entomol. Exp. Appl.* **98**: 295-301.

Loeb M.j., Woods C. W., Brandit E. P. & Borkovec A. B., 1982. Larval testes of the tobacco bud worm: A new source of insect ecdysteroids. *Science* **218**: 896-898.

Loeb M.j., Brandit E. P. & Birnbaum M. j., 1984. Ecdysteroid production by testes of the tobacco bud worm, *heliiothis virescens*, from last instar to adult. *J. Insect. Physiol.*, **30**: 357-381.

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*. *Zeitschrift für Naturforschung*. **50(C)**:507–513.

Lucantoni L, Giusti F, Cristofaro M, Pasqualini L, Esposito F, Lupetti P, Habluetzel A., 2006. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and Cell* **38**: 361-371.

Luna G. K., Robinson V.A., Martínez A. M., Schneider M. I., Figueroa J.I. Smaghe G., Viñuela E., Budia F. Pineda S., 2011. Long-Term Effects of Methoxyfenozide on the Adult Reproductive Processes and Longevity of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) *J. Econ. Entomol.* **104(4)**: 1229-1235

M

Maamcha Z., 1997. Etude biologique de la pyrale de la farine *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae). Effet du Flucycloxuron à l'égard des nymphes sur la sécrétion cuticulaire. Thèse de Magister.

Maeda S., Nakashima A., Yamada R., Hara N., Fujimoto Y., Ito Y., et al. 2008. Molecular cloning of ecdysone 20-hydroxylase and expression pattern of the enzyme during embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B*; **149**:507–16.

Maiza A., Kilani S., Fraine J.P., Aribi N., Soltani N. 2004. Reproductive effects in German cockroach by ecdysteroid agonist RH- 0345, juvenile hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 69 (3): 257–266.

Manc Pados D., Cruz J., Vilaplana L., Nieva C., Urena E., Belles X. & Martin P., 2010. The hormonal pathway controlling cell death during metamorphosis in a metabolos insects. *Dev. Biol.* **346**: 150- 160.

Marchal E., Vandersmissen H. P., Badisco L., Velde S.V.D., Verlinden H., Iga M., Wielendaele P.V., Huybrechts R., Simonet G., Smaghe G., Broeck j.V., 2010. Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review. *Peptides* **31**: 506–519

Margaritis L.H., 1985 a. Structure and the physiology of the eggshell. In: Gilbert L. H., Kerkut G. a. (Eds) . *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 6. Pergamon Press, Oxford. UK, pp. 151-230.

- Margaritis L.H., Mazzini M., 1998.** Structure of the egg. In: Harrison. F. W., Loke M. (Eds), Microscopic Anatomy of invertebrates, *Insecta*. Vol. 11 c. Wiley-Liss, New york, pp. 995 – 1037.
- Martin D., Piulachs M.D. & Bellés X., 1995.** Patterns haemolymph vitellogenin and ovarian in the German cockroach and the role of juvenile hormone. *J. Physiol. Entomol.*, **20**:59-65.
- Mazzini M., Carcupino M. & Birnbaum M., 1993.** Egg chorion architecture in stick insects (Pharmatodea). *Int. j. Insect Morphol. Embriol.*, **22**: 391-415.
- Mc Ewen F. L., 1978.** Food production. The challenge of pesticides. *Biosci.*, **28**: 773-778.
- Mc Neil J.N., Laforge M., Bédard C., Cusson M., 1996.** Juvenile hormone production and sexual maturation in True Armyworme, *Pseudaletia unipuncta* (HAW). (Lepidoptera: Noctuidae): Acomparaison of migratory and non- migratory populations. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **32**: 575-584.
- Medina, M.P.F., Budia, L. Tirry, G. Smagghe, and E. Vinüela. 2001.** Compatibility of spinosad, tebufenozide and azadirachtin with eggs and pupae of the predator *Chrysoperla carnea* (Stephens) under laboratory conditions. *Biocontrol Sci. Technol.* **11**: 597- 610.
- Meyer, A.S., Schneiderman, H.A., Hanzmann, E., and Ko, J.H. 1968.** The two juvenile hormones from the *Cecropia* silk moth. *Proc Natl Acad Sci*, **60**: 853-860.
- Mizoguchi A. & Kataoka H., 2005.** An in vitro study on regulation of prothoracic gland activity in the early last-larval instar of the silkworm *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*; **51**:871–9.
- Mommaerts V., Sterk G., Smagghe G., 2006.** Bumblebees can be used in combination with juvenile hormone analogues and ecdysone agonists. *Ecotoxicology* **15**: 513–521.
- Morakchi S., 2000.** Evaluation de l'activité d'un insecticide inorganique, l'acide borique à l'égard de *Blatella germanica* : aspect toxicologique, réssiduel, structurale et biochimique. Thèse de magister.
- Moulton, J. K., D. A. Pepper, R. K. Jansson, and T. J. Dennehy. 2002.** Pro-active management of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the tebufenozide and methoxyfenozide: baseline monitoring, risk assessment, and isolation of resistance. *J. Econ. Entomol.* **95**: 414-424.

Nauen R. & Bretschneider T., 2002. New mode of action of insecticide. *Pestic Outlook*. **241**: 241-245.

Nauen R. & Elbert A., 2003. European monitoring of resistance to insecticides in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with special reference to imidacloprid. *Bull. Entomol. Res.*, **93**: 47-54.

Neudueser D., Warren J. T., Gilbert L. & Cohen S. M., 2005. Molting defective is required for ecdysone biosynthesis. *Dev. Biol.*, **280**: 362-372.

Nijhout H.F., 1994. *Insects Hormones*, Princeton University Press, Princeton, NJ, p. 267.

Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Fujimoto Y, et al., 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J Biol Chem*; **279**:35942–9

O

Oberlander H., Silhacek D. L. & Prcheron P., 1995. Nonsteroid agonists: Tools for the study of hormonal action. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **28**: 209-223.

Oberlander H., Silhacek D.L, Shaaya E., Ishaaya I., 1997. Current status and future perspectives of the use of insect growth regulators for the control of stored product insects. *J Stored Prod Res.*, **33**:1–6

Oberlander H., Leach C.E., Shaaya E., 2000. Juvenile hormone and juvenile hormone mimics inhibit proliferation in a lepidopteran imaginal disc cell line, *J. Insect Physiol.* **46** : 259–265.

Onishi E., 1997. Growth and maturation of ovaries in isolated abdomens of *Bombyx mori*. Response to ecdysteroids and other steroids. *Zoological Sciences*. **4**: 315-321.

Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, Itoyama K, Petryk A, Rybczynski R, et al., 2006. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev Biol*; **298**:555–70

Oouchi H., 2005. Insecticidal properties of a juvenoid, pyriproxyfen, on all life stages of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* **40**: 145–149.

Osorio, A., Martínez A. M., Schneider M. I., Díaz O., Corrales J.L., Avilés M.C., Smagghe G., & Pineda S., 2008. Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. *Pest Manag. Sci.* **64**: 1001-1007.

P

Palli, R., and A. Retnakaran. 2001. Ecdysteroid and juvenile hormone receptors: properties and importance in developing novel insecticides. *In* I. Ishaaya (ed.), *Biochemical sites of insecticides action and resistance*. Springer, Berlin, Germany. **pp.** 107-132

Parkman J.P., Frank J.H., 1998. Development and reproduction of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae) after treatments with hydroprene and pyriproxyfen. *J. Econ. Entomol.* **91**, 392-397.

Pineda, S., F. Budia, M. I. Schneider, A. Gobbi, E. Viñuela, J. Valle, and P. Del Estal. 2004. Effect of two biorational insecticides, spinosad and methoxyfenozide, on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* **97**: 1906-1911.

Pineda, S., M. I. Schneider, G. Smagghe, A. M. Martínez, P. Del Estal, E. Viñuela, J. Valle, and F. Budia. 2007. Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **100**: 773-780.

Pineda, S., A. M. Martínez, J. I. Figueroa, M. I. Schneider, P. Del Estal, E. Viñuela, B. Gómez, G. Smagghe, and F. Budia. 2009. Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis*. *J. Econ. Entomol.* **102**: 1490-1496.

Q

Quennedy A. Arribi N., Evrraerts C. & Delbeque J. P., 1995. Postembryonic development of *Zophoba atratus* Fab (coleopteran Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue application. *J. Insect. Physiol.*, **41 (2)**: 143-152.

R

Raikhel A.S. & Dhadialla T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Ann. Rev. Entomol.*, **37**: 217-251

- Raina A. K., Klun J. A., 1984.** Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. *Science*, **225**: 531- 533.
- Rajakpse CNK, Meola R., Readio J, 2002.** Comparative evaluation of juvenoids for control of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in topsoil. *J. Med. Entomol.* **39**: 889–894.
- Rafaelli A., 2002.** Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moth. *Inv. Rev. Cytol.*, **213**:49-91.
- Rameswamy S.B., Shengqiang S., Yong I.P. & Fanrong Z., 1997.** Dynamics of juvenile hormone-mediated gonadotropism in the Lepidoptera. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **35**: 539-558.
- Rees H.H. & Isaac R.E., 1985.** Biosynthesis and metabolism of ecdysteroids and methods of isolation and identification of the free and conjugate compounds. In Methods Enzymol. Law J.H., Rilling H.C., (eds): *Academic Press, New York.*, **111**: 377-410.
- Rees H.H., 1995.** Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function. *Eur. J. Ent.*, **92**: 9-39.
- Rees d. A., Giles P., Lewis M. D. & Ham J., 2010.** Adenosine regulates thrombomodulin and endothelial protein C receptor expression in folliculo stellate celles of the pituitary gland. *Purinergic signal.* **6**: 19-29.
- Renée D., 2003.** Effects sous-létaux du tébufénozide, un régulateur de croissance d'insecte. Sur la communication chimique et le succès reproducteur chez *Choristoneura rasaceana* (Lepidoptera: Tortriciadae). Thèse de Doctorat. Université Laval.
- Retnakaran A., 1970.** Blocking of embryonic development in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), by some compounds with juvenile hormone activity. *Can. Entomol.*, **302**: 1592-1596.
- Retnakaran A., Granett J., & Ennis T., 1985.** Insect growth regulators. In: Kerkut Pergamom Press: Oxford. **12. P.** 530- 601.
- Retnakaran A. & Oberlander H., 1993.** Control of chitin synthesis in insects. In: Muzzarelli, R. a. a. (Ed). *Chitin Enzymology. European chitin society*, **pp.** 89-99.
- Retnakaran A., Macdonald A., Tomkins X.L., Daris C.N. & Brownwright A.J., 1997.** Ultrastructural effects of a non steroidal ecdysone agonist, RH-5992 on the sixth instar larvae of the spruce budworm, *choristoneura fumiferana.*, *J. Insect. Physiol.*, **43(1)**: 55-68.

- Retnakaran A., Kerll P., Feng Q., & Arif B., 2003.** Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **54**: 187-199.
- Retnakaran A., Dhadialla T.S., & Smagghe G., 2005.** Insect Growth—and Development- disrupting Insecticides. *Article number*: NSCT: 00076.
- Rewitz, K.F., Rybczynski, R., Warren, J.T., and Gilbert, L.I. (2006a).** Developmental expression of *Manduca sexta*, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Mol Cell Endocrinol* **247 (1)**: 166-174.
- Rewitz, K.F., Rybczynski, R., Warren, J.T., and Gilbert, L.I. (2006b).** The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem Soc Trans*, **34 (6)**: 1256-1260.
- Rewitz, K.F., Larsen, M.R., Lobner-Olesen, A., Rybczynski, R., O'Connor, M.B., and Gilbert, L.I., 2009.** A phosphoproteomics approach to elucidate neuropeptide signal transduction controlling insect metamorphosis. *Insect Biochem Mol Biol*, **39(7)**: 475-83.
- Richardson M.L. & Lagos DM. 2007.** Effects of a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen, on the apterous form of soybean aphid (*Aphis glycines*). *Journal of Applied Entomology* **131**: 297-302.
- Riddiford L.M. & Williams C.M., 1967.** The effects of juvenile hormone analogues on the embryonic development of silkworms. *Proc. Natl. Acad. USA.*, **57**: 595-601.
- Riddiford, L. M ., 1985.** Hormone action at cellular level. In: G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (eds), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 8. Pergamon, Oxford. , pp. 37-84
- Riddiford L.M. Hiruma K., Zhou X. & Nelson C.A., 2003.** Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect. Biochem. Mol.*, **33**:1327-133.
- Riddiford L.M.,1994.** Cellular and Molecular action of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect. Physiol.* **24**: 213-243.

Riddiford L.M., 1996. Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. *In metamorphosis*, Gilbert L.I., Tata J.R. and Atkinson B.G. (Eds), *Academic Press. Inc.*, **6**: 223-243.

Riddiford L.M., 2008. Juvenile hormone action: A 2007 perspective. *J Insect Physiol* 54:895–901.

Rodríguez M., Otea A., Reagan E., 2001. Selection, egg viability, and fecundity of the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) with tebufenozide. *J. Econ Entomol* **94**: 1553-1557.

Rodríguez Enríquez C.L., Pineda S, Figueroa J.I., Schneider M.I., Martínez A.M. 2010. Toxicity and sublethal effects of methoxyfenozide on *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. **103(3)**:662–667.

Romana I. Pazscual N. & Bellés X., 1995. The ovary is the source of circulating ecdysteroids in *Blatella germanica* (Dictyoptera: Blatellidae). *Eur. J. Ent.*, **92**: 93-103.

Romer F., 1971. Die prothorakaldüsen der larvae von *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) und ihre veränderungen währendeines häntungszyklus. *Z. Zellforsh. Mikroock. Anat.* **122**: 425- 455.

Roussel J.P., Mojtahed-Zqdeh K., Lanot R., Kuwano E. & Akai H., 1989. Effect of an imidazole derivative, KK-42, on development and ecdysteroid production in *Locusta migratoria* (Orthoptera). *Arch.Int.Physiol. Biochem.*, **97(6)**: 511-520.

Ruegg R.P., Orchard I. & Davey K.G., 1992. 20-hydroxyecdysone as a modulator of activity in neurosecretory cells of *Rodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, **28**: 243-248.

Rybczynski R., 2005. Prothoracicotropic hormone. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive MolecularInsect. Science*. Oxford: Elsevier; p.61–123.

S

Sadeghi A., Van Damme E.M. & Smaghe 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)**: 1536-2442.

Sahlèn G., 1994. Ultrastructure of eggshell of *Aeshna juncea* (L.) (Odonata. Aeshnidae). *Int. J. Embryol.*, **23**: 345-354.

- Sakurai S. & Gilbert L. I., 1990.** Biosynthesis and secretion of ecdysteroids by the prothoracic glands. In *Molting metamorphosis*. (Eds. Ohnishi and Ishizaki H.). *Japan. Sci. Soc. Press.* p. 83-106.
- Salem H., Smagghe G., Degheele D., 1997.** Effects of tebufenozide on oocyte growth in *Plodia interpunctella*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **62 (1):** 9-13.
- Sato H. , 1932.** Die postembryonale Differenzierung der Gana den von *Limantoria dispar*. *Z. Zellforsch.*, **16** : 63-87.
- Satyanarayana K., Bradfield J.Y., Bhaskaran G., Meola R., 1992.** Regulation of vitellogenin synthesis by juvenile hormone in the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Invert. Reprod. develop.*, **25**: 21-37.
- Schneider, M. I., G. Smagghe, S. Pineda, and E. Vinuela. 2008.** Studies on ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym., Ichneumonidae). *Pharmacokinetics approach. Ecotoxicology* **17**: 181-188.
- Schulz D. J. Sullivan J.P. & Gene E. R., 2002.** Juvenile hormone and octopamine in regulation of division of labor in Honey bee colonies. *Hormon. Behavi.* **42**: 222-231.
- Shirk P. D. Bean D. W. & Brookes V. J., 1990.** Ecdysteroid control vitellogenesis and egg maturation in pharate adult females of the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **15**: 183-199.
- Sial A. & Brunner F., 2010.** Lethal and sublethal effects on an Insect Growth Regulator, Pyriproxyfen, on Obliquebanded Leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* **103(2)**: 340-347
- Silhacek D. L. Oberlander H. & Porcheron P., 1990.** Action of RH- 5849, a nonsteroidal mimic On *Plodia interpunctella* (Hübner) *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **15**: 201-212.
- Smagghe G. & Degheele D., 1992.** Effects of the non steroidal ecdysteroid agonists, RH-5849 on production of *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae) Parasitica, **48**: 23- 29.
- Smagghe G. & Degheele D., 1994a.** Action of the non steroidal ecdysteroid mimic RH- 5849 on larval development and adult reproduction of insects of different orders. *Invert. Reprod. Dev.*, **25**: 227- 236.

- Smagghe G. & Degheele D., 1994c.** Action of a non steroidal ecdysteroid mimic RH-5849 on larval development and reproduction of insects of different orders. *Invert. Reprod. Develop.*, **25**: 227-236.
- Smagghe G. & Degheele D., 1995.** Biological activity and receptor binding of ecdysteroid agonists RH-5992 (Tebufenozide) in *Spodoptera Exempta*, *Spodoptera exigua* and *Liptinotarsa decemlineata.*, *Pest. Biochem. Physiol.*, **49**: 224-234.
- Smagghe G, Vinuela E, Budia F, Degheele D 1996a.** *In vivo* and *in vitro* effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist tebufenozide on cuticle formation in *Spodoptera exigua* : an ultrastructural approach. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **32**: 121-134.
- Smagghe G., Carton B., Heirman A., & Tirry L. 2000.** Toxicity of Four Dibenzoylhydrazine Correlates with Evagination–Induction in the Cotton Leafworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **68**: 49–58
- Smagghe, G., S. Pineda, B. Carton, P. Del Estal, F. Budia, and E. Vin~ uela. 2003a.** Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest. Manag. Sci.* **59**: 1203-1209.
- Smagghe, G., D. Bylemans, P. Medina, F. Budia, J. Avilla, & E. Vin~ uela. 2004.** Tebufenozide distorted codling moth larval growth and reproduction, and controlled field populations. *Ann. Appl. Biol.* **145**: 291-298.
- Smith S. L., 1985.** regulation of ecdysteroid titer. Synthesis, in: comprehensive insect *physiology, Biochemistry and pharmacology*, vol. 1.7. Kerkut G and Gilbert L.I. (eds.) *Pergamon Press. Oxford.*, **7**: 323-332.
- Soin T., Geyter E.D., Mosallanejad H., Iga M. Martín D., Ozaki S., Kitsuda S., Harada T., Miyagawa H., Stefanou D., Kotzia G., Efroze R., Labropoulou, V., Geelen D., Iatrou K., Nakagawa Y., Janssen C. R., Smagghe G. & Swevers L., 2010.,** Assessment of species specificity of moulting accelerating compounds in Lepidoptera: comparison of activity between *Bombyx mori* and *Spodoptera littoralis* by *in vitro* reporter and *in vivo* toxicity assays. *Pest. Manag. Sci.* **66**: 526–535.
- Soller M. Bownes M. & Kubli E., 1999.** Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev. Biol.*, **208**: 337-351.
- Soltani-Mazouni N. 1994 .** Effects of ingested diflubenzuron on ovarian development during the sexual maturation of *Tenebrio molitor* (L.). *Tissue & Cell.*, **26** (3) : 439-445.

- Soltani-Mazouni N. & Soltani N. 1994.** Diflubenzuron affected DNA synthesis in the ovaries of *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Reprod. Dev.*, **25** (1) : 19-21.
- Soltani-Mazouni N. & Soltani N. 1995.** The protein synthesis in the fat body of *Tenebrio molitor* (L.) during oocytes maturation : effect of diflubenzuron and starvation. *J. Stored Product Research*, **31** (2) : 117-122.
- Soltani–Mazouni N., Khebbab M.E.H., Soltani N., 1999.** Production d'écydystéroïdes ovarien Durant la maturation des ovocytes chez *Tenebrio molitor*. *Ann. Soc. Entomol. France* **35** : 82-86
- Soltani-Mazouni N., Taïbi F., & Zerguine K., 2001.** Evaluation de deux régulateurs de croissance sur le potentiel reproducteur d'un ravageur des denrées stockées. *Revue synthèse* ; **9** : 95- 103.
- Soltani-Mazouni N., Taïbi F., Berghiche H., Smaghe G., Soltani N., 2001.** RH- 0345 restored partly the effects induced by KK- 42 on reproductive events in mealworms. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **66/2a**: 437- 444.
- Soltani-Mazouni N., Boukachabia A & Smaghe G., 2004.** Biological activity of some molting hormone agonists in mealworms : ecdysteroid and protein analysis in ovaries. *Revue des sciences et de la technologie (Synthèse)* **13** : 7-10
- Soltani-Mazouni N. & Hami M ., 2010.** Effets de deux agonistes des ecdystéroïdes sur la reproduction chez *Ephestia kuehniella* (Insectes, Lépidoptères) : dosage des acides nucléiques et des protéines ovariens. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat, N° 47, Tome I*, 153-156.
- 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*, Vol. **56(2)**: 157-163.
- Soltani N., Delachambre J. & Delbecque J.P., 1989.** Stage- specific effects of diflubenzuron on ecdysteroid titers during the development of *Tenebrio molitor*: evidence for a change in hormonal source. *Gen. Comp. Endoc.*, **76**: 350-356.
- Soltani N., Quenedey B., Delbecque J.P. & Delachambre J. 1987.** Diflubenzuron induced alteration during in vivo developpement of *Tenebrio molitor* pupal integument. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **5**: 201-209.
- Soltani N., & Soltani –Mazouni N., 1992.** Diflubenzuron and oogenesis in colding moth, *Cydia pomonella* L., *Pest. Sci.*, **34**: 257-261.

- Soltani N., Soltani-Mazouni N. & Delachambre J. 1996.** Evaluation of Triflumuron, a benzoylphenylurea derivative, on *Tenebrio molitor* pupae : effects on cuticle. *J. Appl. Ent.*, **120** : 627-629.
- Soltani N & Soltani –Mazouni N., 1997.** Oogenesis in mealworms: Cell density of germarium, thickness of chorion and ecdysteroid production. Effect of regulator. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **62 (2B)**: 565- 571.
- Soltani N., Pitoizet N., Delachambre J.& Delbeque J.P., 1997.** Activity an a ecdystéroïd compound (KK-42) on ovarian developpement and ecdysteroid compound (KK-42) on ovarian development and ecdysteroid secretion mealworm. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **62 (2)**: 531-537.
- Soltani N., Smaghe G., Soltani – Mazouni N., 1998.** Evaluation of the ecdysteroid agonist RH-0345 on the hormonal production by tegumental explants and ovaries application. *50th international symposium on crop protection. 5 may, Ghent Belgique.*
- Soltani N, Aribi N, Berghiche H, Lakbar S, Smaghe G. 2002.** Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion in *Tenebrio molitor* pupae in vivo and in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **72**:83–90.
- Spindler, S.R., Ortiz, I., Fung, S., Takashima, S., Hartenstein, V. 2009.** Drosophila cortex and neuropile glia influence secondary axon tract growth, pathfinding, and fasciculation in the developing larval brain. *Dev. Biol.* **334(2)**: 355-368.
- Srivastava U. S., 1960.** Secratory cycles and disappearance of the prothoracic development in *Tenebrio molitor* L (Coleoptera- Tenebrionidae). *Experientia* (Basel). **16 (10)**: 445.
- Staal G. B., 1982.** Insect control with growth regulators interfering with the endocrine system. *Entomol. Exp. Appl.*, **31**: 15- 23.
- Stay B., Sereg Bachmann J.A., Stolzman C. A., Frairbaira S. F., Yu C. E & Tobe S.S., 1994.** Factors affecting allatostatinrelease in cockroach (Diploptera: Punctata) :nerve secretion, juvenile hormone analog and ovary. *Insect. Physiol.*, **35**:393-372.
- Styrishave B., Lund T. & Andersen O., 2008.** Ecdysteroids in female shore crabs *Carcinus maenas* during the moulting cycle and oocyte development. *J. Mar. Biol. Assoc.* **88**: 575-581.

Sullivan J., 2000. Environmental fate of pyriproxyfen PhD. Environmental Monitoring and pest Management Branch. Department of pesticide regulation. Scaramento. CA.

Sullivan J.J., Goh K.S. 2008. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *J. Pestic. Sci.* **33**: 339–350.

Sun X., Baret B.A, Biddinger D.J., 2000. Fecundity and fertility reductions in adult leafrollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonist tebufenozide and methoxyfenoside. *Entomol. Exp. Appl.*, **94**: 75-83.

Svoboda J. A. & Feldlaufer M. F., 1991. Neutral Sterol Metabolism in Insectes. *Lipids* **26**: 614-618.

Swevers I. & Latrou K., 1999. The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid- induced regulatory cascade and arrests silkworm oogenesis at mid vitellogenesis. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **29**: 955-963.

Sztal T, Chung H, Gramzow L, Daborn PJ, Batterham P, Robin C. 2007 Two independent duplications forming the Cyp307a genes in Drosophila. *Insect Biochem Mol Biol*;37:1044–53.

T

Taïbi F., 2000. Activités de quelques effecteurs de la biosynthèse de l'hormone de mue sur la production d'ecdystéroïdes ovariens, la ponte et la viabilité des œufs chez *Tenebrio molitor*. Thèse de Mgister. Université de Annaba. Algérie.

Taïbi F., Smaghe G., Amrani L. & Soltani- Mazouni N., 2003. Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comparative Biochemistry and physiology Part C* **135**: 257- 267.

Taïbi F., 2007. Etude comparée du développement et du reproduction chez de es ravageurs des denrées stockées *Ephestia kuehniella* et *Tenebrio molitor* : Aspect endocrinien en rapport avec l'impact d'un mimétique de l'hormone de mue, le RH-0345. Thèse de doctorat en biologie et physiologie animale, Université d'annaba. Algérie.

Tail G., Porcheron P. and Doumandji-Mitiche B. 2010. Diflubenzuron et évolution des taux des ecdystéroïdes dans les ovaires et dans les oeufs du Criquet

pèlerin, *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera: Acrididae) (original language French) *Journal of Orthoptera Research* **19** (2), 363-370.

Takaki K. & Sakurai S., 2003. Regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenic activity leading to pupal metamorphosis. *Insect Biochem Mol Biol.* **33**:1189–9.

Tatar M., Priest N., Chien S., 2001. Nigligible senescence during reproductive diapauses in *Drosophila melanogaster*. *Am. Natur.* **158**: 248-258.

Telfer, W. H. 2009. Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect Sci.* **9**: 50. (insectscience.org/9.50).

Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B. 2007. Trends *Pharmacol Sci.* **28**(1):14-22.

Thompson M.J., Rees H.H. & Wilzer K.R., 1987. Isolation and identification of 26-hydroxyecdysone 2-phosphate: An ecdysteroid conjugate of egg and ovaries of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Physiol.* **4**: 183.

Thornhill R. & Alcock J., 1983. The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 547 pp.

Thummel C. S. and Chory J., 2002. Steroid signaling in plants and insects-common themes, different pathways. *Genes & Development* **16** (24): 3113-3129.

Tine S., Aribi N. & Soltani N., 2011. Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *African Journal of Biotechnology* **10**(85): 19816-19824.

Tomizawa M, Casida J.E. 2009. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Acc. Chem. Res.* **42**(2):260-9

Tong-Xian L. & Stansly A., 2004. Lethal and sublethal effects of two insect growth regulators on adult *Delphastus catalinae* (Coleoptera; Coccinellidae), a predator of whiteflies (homoptera:aleyrodidae) *Elsevier. Sci. Biological. Control.*, **30**: 298-305.

Trougakos I. P. & Margaritis L. H., 2002. Novel morphological and physiological aspects of insect Eggs. In: Hiker M. Meiners T. (Eds), *Chemoecology of insect Eggs and Egg Deposition* Blackwell Verlag GmbH, Berlin, Vienna., **pp.** 3-36.

Truman, J.W. 1985. Hormonal control of ecdysis. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds.). Pergamon, Oxford, England. Vol. 8 *Endocrinology II*, pp. 413-440.

Truman, J.W., 2005. Hormonal Control of the Form and Function of the Nervous System, In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 2: Development, Elsevier, Oxford, **pp.** 135-163.

Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2007. The morphostatic actions of juvenile hormone. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**: 761-770.

Tsuchida K., Nagata M., Suzuki A., 1987. Hormonal control of ovarian development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **5**: 167-177.

Tu M. P., Yin C.M. & Tahar M. 2002. Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants. *Aging. Cell.*, **1**: 158-160.

Tufail, M. & Takeda, M., 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.* **54**:1447-1458.

Tunaz H. & Uygun N., 2004. Insect growth regulator for insect pest control. *Turk. J. Agric.* **28**: 377-387.

V

Vercruyse L., Gelman D., Raes E., Hooghe B., Vermeirssen V., Van Camp J. & Smaghe G., 2004. The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril reduces oviposition and ecdysteroid levels in *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **57**: 123-132.

W

Watson, R.D., Spaziani, E., and Bollenbacher, W.E. 1989. Regulation of ecdysone biosynthesis in insects and crustaceans: A comparison. In: *Ecdysone* (J. Koolman, Ed.) George Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. pp. 188-203.

Westerlund S.A. & Hoffmann K.H., 2004. Rapid quantification of juvenile hormones and their metabolites in insect haemolymph by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 540-543.

White D.F. & Lamb K.P., 1968. Effect of a synthetic juvenile hormone on adult cabbage aphids and their progeny. *J. Insect Physiol.* **14**: 395–402.

Wigglesworth V. B., 1965. The principles of insect physiology, Methuen and Co., London.

William J.C. K., 1971. Follicle cell protein synthesis in moth, *Ephesia kuehniella* oocytes. *Insect Physiol.*, Vol. 17: pp. 217-232.

Wing K. D., 1988. RH-5849, a non steroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. *Sciences.* **241**: 464- 469.

Y

Yamanaka N., Honda N., Osato N., Niwa R., Mizoguchi A., Kataoka H., 2007. Differential regulation of ecdysteroidogenic P450 gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **71**: 2808–14.

Yanagi, M., Y. Tsukamoto, T. Watanabe, and A. Kawagishi., 2006. Development of a novel lepidopteran insect control agent, chromafenozide. *J. Pestic. Sci.* 31: 163- 164.

Yao T.P., Segraves W. Q., Oro A. E., M. & Evans R., 1992. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *cell.*, **71** : 36- 72.

Yezli-Touiker S, Soltani-Mazouni N. 2011. Profil des ecdystéroïdes durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephesia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae). *Synthèse.* **22**: 49–55.

Z

Zamora M.C, Martínez A.M, Nieto M.S, Schneider M.I, Figueroa J.I, Pineda S., 2008. Actividad de algunos insecticidas biorracionales contra el gusano cogollero. *Rev Fitotec Mex* **31**: 351-357.

Zarate N., Díaz O. Martínez A.M., Figueroa J.I., Schneider M.I., Smagghe G., viñuela E., Budia F., Pinada S., 2011. Lethal and Sublethal Effects of Methoxyfenozide on the Development,

Survival and Reproduction of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop Entomol* **40(1)**: 129-137

Zeh D. W., Zeh J. A. & Smith R. L., 1989. Ovipositions, amnions and eggshell architecture in the diversification of terrestrial Arthropods. *Qart. Rev. Biol.*, **46**: 147- 168.

Zhu J., Chen L. & Raikhel A.S., 2007. Distinct roles of Broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, *Vitellogenin*, in the mosquito *Aedes aegypti*. *Mol. Cell Endocrinol.* **267**: 97-105.

Zimowski G., Silhacek D.L. Schaaya E. & Shirk P.D., 1991. Immuno-fluorescent analysis of follicular growth and development in whole ovaries of the Indian meal moth *J. Morphol.*, **209**: 215-228.

Zimowska, G., Shirk, P.D., Silhacek, D.L., Shaaya, E., 1995. Termination of vitellogenesis in follicles of the moth, *Plodia interpunctella*: changes in oocyte and follicular epithelial cell activities. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**: 357–380.

ANNEXE : Production scientifique (Publications & Communications)

Publications :

1. **HAMI M.** ; TAIBI F. & SOLTANI-MAZOUNI N., **2004**. Effects of flucycloxuron, a chitin synthesis inhibitor, on reproductive events and thickness of chorion in mealworms. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **69(3)**: 249-255.
2. **HAMI M.**, TAIBI F., SMAGGHE G. & SOLTANI-MAZOUNI N., **2005**. Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides agonist the Mediterranean flour moth. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, 70/4: 767-773.
3. SOLTANI-MAZOUNI N. & **HAMI M.**, **2010**. Effets de deux agonistes des ecdystéroïdes sur la reproduction chez *Ephestia kuehniella* (Insectes, Lépidoptères): dosage des acides nucléiques et des protéines ovariens. Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat, N° 47, Tome **I**, 153-156.
4. 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*, Vol. **56(2)**: 157-163.

Communications :

1. TAIBI F., MERZOUG S., **HAMI M.** & SOLTANI N., **2003**. Effets de quelques agonistes des ecdystéroïdes sur la structure fine du chorion chez *E. kuehniella*. Les premières journées sur la protection de l'environnement. Tlemcen, les 28 et 29 mai 2003.
2. **M. HAMI**; F. TAIBI & N. SOLTANI-MAZOUNI. **2004**. Effects of flucycloxuron, a chitin synthesis inhibitor, on reproductive events and thickness of chorion in mealworms. 56th International Symposium on Crop Protection. Gent, Belgium, May 4, 2004.
3. **M. HAMI**; F. TAIBI & N. SOLTANI-MAZOUNI, **2004**. Toxicité comparée de quelques mimétiques de l'hormone de mue à l'égard des chrysalides d'*Ephestia kuehnielle* . Euromediterranean workshop on animal Ecologi .Annaba November 22-24, 2004
4. **M. HAMI**; F. TAIBI & N. SOLTANI-MAZOUNI, **2005**. Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides agonist the Mediterranean flour moth. 57th International Symposium on Crop Protection. Gent, Belgium, May , 2005.
5. **M. HAMI** & N. SOLTANI -MAZOUNI, **2006**. Evaluation de trois nouveaux régulateurs de croissance des insectes chez *Ephestia kuehniella* : Analyse des

protéines ovariennes. 4^{ème} journée d'Entomologie et de Nématologie. EL Harrach- Alger, 17 Avril 2006.

6. **M. HAMI & N. SOLTANI -MAZOUNI, 2009.** Evaluation de deux régulateurs de croissance RH- 5992 et le RH- 2485 sur le potentiel reproducteur d'un ravageur de denrées stockées, *Ephestia kuehniella*. Colloque International de Biologie Environnementale(SIBE'2009). SKIKDA : du 08 au 10 novembre 2009.
7. **M. HAMI & N. SOLTANI -MAZOUNI, 2010.** Effet de deux régulateurs de croissance sur la production de l'hormone de mue et la formation de chorion chez *Ephestia kuehniella*. Le 2^{ème} congrès Franco-Magrébin et les 4^{ème} journées Franco-Tunisiennes de Zoologie, qui se déroulés du 4 au 9 novembre 2010 à Zarzis (tunisie).
8. **N. SOLTANI- MAZOUNI & M. HAMI, 2010.** Evaluation de deux mimétiques de l'hormone de mue sur la reproduction chez *Ephestia kuehniella* : dosage des acides nucléiques et des protéines ovariens. Conférence Internationale Francophone d'Entomologie (CIFE VI), organisée à Rabat- Maroc du 02 au 06 juil. 2006.