

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 de  
Docteur en Biologie Animale

**EVALUATION DE L'IMPACT DE DEUX MIMETIQUES DE  
L'HORMONE DE MUE (RH-2485 ET RH-5992)  
SUR LES GONADES MALES D'*EPHESTIA KUEHNIELLA*, UN  
LEPIDOPTERE RAVAGEUR DES DENREES STOCKEES :  
ASPECT STRUCTURAL, BIOCHIMIQUE ET HORMONAL**

Présenté par

**M<sup>elle</sup> BOUZERAA Hayette**

Directrice de thèse

**Professeur SOLTANI-MAZOUNI Nadia**

Devant un jury composé de :

Président : Pr. SOLTANI N.

Examineur : Pr. SMAGGHE G.

Examineur : Pr. BOUKHALFA-BENMESSAOUD H. ENSA, Alger

Examineur : Pr. TINE-DJEBBAR F.

Examineur : Pr. REHIMI N.

Université Badji Mokhtar, Annaba

Université de Gand, Belgique

Université de Tebessa

Université Badji-Mokhtar, Annaba

**Année universitaire : 2013-2014**

# Remerciements

*La réalisation de cette thèse est l'aboutissement d'un parcours académique, long et laborieux, parfois semé d'embûches.*

*C'est un devoir que de remercier au début d'un tel travail tous ceux qui, plus ou moins directement, ont contribué à le rendre possible et agréable. C'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui, à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse. Je désire alors leur exprimer ma profonde gratitude.*

*Tout d'abord, mes sincères remerciements vont à Monsieur le Professeur **SOLTANI Nouredine**, Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée- Université d'Annaba, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Je le remercie chaleureusement pour ses enseignements et ses encouragements durant toutes mes inscriptions en thèse. En m'accueillant dans son laboratoire, il était là pour me pousser vers la carrière scientifique, il a su m'assurer un cadre de travail où réflexion, opinions et requêtes ne sont jamais restées lettre morte. Ses critiques, observations et suggestions m'ont permis d'améliorer ce travail. Sa rigueur pour le travail scientifique m'a toujours émerveillée. Qu'il soit assuré de mon attachement à l'esprit de son enseignement. Merci !*

*je souhaiterais exprimer également ma gratitude à ma Directrice de thèse, Professeur **SOLTANI-MAZOUNI Nadia**, du Département de biologie – Université d'Annaba, pour l'excellent encadrement fourni, son soutien, sa disponibilité et sa patience malgré ses nombreuses tâches. Ce fut pour moi un réel plaisir d'être dirigée par un tel promoteur avec un enthousiasme motivant. Grâce à ses conseils judicieux, j'ai pu réaliser ce travail et j'espère avoir été à la hauteur de ses attentes. Merci d'avoir en toutes occasions pris le temps de m'écouter et de me comprendre. Pour tout cela et encore bien pour votre humanisme, votre bonté et votre gentillesse, Merci!*

*J'ai tout le plaisir et l'honneur de la présence de Monsieur le Professeur **SMAGGHE G.** du Laboratoire d'Agrozoologie- Université de Gand, Belgique. Je le remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail. Je suis sûr que sa présence apportera énormément à cette thèse.*

*Je suis très reconnaissante envers Mme. **BOUKHALFA-BENMESSAOUH H.** de l' ENSA d' Alger d'avoir accepté d'examiner ma thèse malgré ses nombreuses occupations. Qu'elle trouve ici ma profonde gratitude*

*Mes remerciements vont aussi à Mme **TINE-DJEBBAR F.** Professeur à l'Université de Tebessa et à Mme **REHIMI N.** Professeur à l'Université d'Annaba d'avoir accepté de faire partie du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.*

*Je réserve un remerciement spécial à mes très chers parents, Papa et Maman à qui, j'ai eu la possibilité de faire des études supérieures. Ces quelques lignes ne suffisent pas, mais je tiens à leur exprimer ma reconnaissance éternelle. Ces travaux de recherche n'auraient jamais vu le jour sans l'appui moral et intellectuel de tous les membres de ma famille.*

*Je n'oublie pas de remercier Mme. **YAZLI- TOUIKER S.** Maître de conférence à l'Université d'Annaba pour ses conseils et ses encouragements permanents. Mme **CHAKOURI N.** technicienne au laboratoire de physiologie végétale pour son aide, son amabilité et son esprit scientifique.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à toute l'équipe du Laboratoire de Biologie Animale et à tous mes camarades du Département de Biologie.*

# SOMMAIRE

	Page
<b>1. NTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2.METHODOLOGIE.....</b>	<b>13</b>
2.1 Matériel d'étude.....	13
2.1.1 Modèle biologique.....	13
2.1.2 Présentation des insecticides.....	14
2.2 Méthode d'étude.....	17
2.2.1 Technique d'élevage.....	17
2.2.2 Traitement.....	17
2.2.3 Détermination des différents types morphogénétiques.....	17
2.2.4 Etude morphométrique.....	17
2.2.5 Détermination du potentiel reproducteur.....	18
2.2.6 Etude électrophorétique des protéines.....	19
2.2.7 Dosage immuno-enzymatique des testicules.....	23
2.2.8 Microscopie électronique à transmission.....	27
2.3 Analyse statistique.....	28
<b>3.RESULTATS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Effets du RH-2485 et du RH-5992 sur le développement.....	29
3.1.1 Effets sur la durée du développement nymphal.....	29
3.1.2 Répartition des différents types morphogénétiques.....	30
3.2 Effets du RH-2485 et du RH-5992 sur la reproduction.....	32
3.2.1 Effets sur la morphométrie des testicules.....	32
3.2.2 Effets sur le potentiel reproducteur.....	37
3.2.3 Effets sur les protéines testiculaires.....	39
3.2.4 Effets sur les ecdystéroïdes testiculaires.....	44
3.3 Effets sur la structure des testicules .....	46
<b>4.DISCUSSION.....</b>	<b>49</b>
4.1 Effets sur le développement nymphal.....	49
4.2 Effets sur la morphométrie des testicules.....	54

4.3 Effets sur le potentiel reproducteur.....	57
4.4 Effets sur les ecdystéroïdes testiculaires.....	61
4.5 Effets sur les protéines testiculaires.....	63
4.6 Effets sur la structure des testicules.....	65
<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>70</b>
<b>RESUMES.....</b>	<b>71</b>
Français.....	71
Anglais.....	72
Arabe.....	73
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>74</b>
<b>ANNEXE : PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES</b>	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les différents groupes de régulateurs de croissance et leur activité (Tunaz & Uygun, 2004).	8
<b>Tableau 2.</b> Insecticides Bisacylhydrazine et leur mode d'action (Dhadialla <i>et al.</i> , 2005).	9
<b>Tableau 3.</b> Composition du gel de séparation (Runing gel) et du gel de concentration (Stacking gel).	19
<b>Tableau 4.</b> Composition du tampon d'échantillon (samplp buffer).	21
<b>Tableau 5.</b> Composition du tampon de migration (Runing buffer).	22
<b>Tableau 6.</b> Poids moléculaire des protéines standard.	22
<b>Tableau 7.</b> Composition de la solution de coloration.	23
<b>Tableau 8.</b> Composition de la solution décolorante.	23
<b>Tableau 9.</b> Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la longueur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ , $n = 10$ ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$ ).	33
<b>Tableau 10.</b> Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la largeur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ , $n = 10$ ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$ ).	34
<b>Tableau 11.</b> Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur le volume ( $\text{mm}^3$ ) des testicules d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ , $n = 10$ ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$ ).	35
<b>Tableau 12.</b> Gamme d'étalonnage des protéines.	39
<b>Tableau 13.</b> Poids moléculaire et mobilités relatives des fractions protéiques des différentes protéines standards.	41
<b>Tableau 14.</b> Poids moléculaires et mobilités relatives des fractions protéiques dans les testicules d'adulte d' <i>E. kuehniella</i> chez les témoins et les traitées.	42

- Tableau 15.** Analyse quantitative des ecdystéroïdes testiculaires d'*E.kuehniella*. Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) exprimant B/B0 en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone. 44
- Tableau 16.** Effets du méthoxyfénoside (RH-2485) et du tébufénoside (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées, sur la quantité des ecdystéroïdes testiculaires ( $m \pm SD$  ;  $n = 4$ ) ; les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ). 45
- Tableau 17.** Liste représentative des insectes nuisibles contrôlés par les agonistes d'ecdystéroïdes (Doucet *et al.*, 2007). 52

## Liste des figures

- Figure 1.** Contrôle hormonal des différents types de mue chez les insectes (Truman & Riddiford, 1999). 4
- Figure 2.** La biosynthèse de l'ecdysone (Gilbert & Rewitz, 2009). 5
- Figure 3.** Mode d'action des ecdystéroïdes (Asbburner, 1974 ; In Klowden, 2010). 12
- Figure 4.** Cycle de développement d'*E. kuehniella* à 27°. 15
- Figure 5.** Formules de structure de l'hormone de mue et deux agonistes des ecdystéroïdes. 16
- Figure 6.** Dissection et prélèvement des testicules chez *Ephestia kuehniella*. 20
- Figure 7.** Principe du dosage EIA (Pocheron *et al.*, 1989). 25
- Figure 8.** Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du Tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles et femelles nouvellement exuviées, sur la durée (jour) du développement nymphal chez *E. kuehniella* ( $m \pm SD$ ,  $n=20$ , les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p>0,05$ ). 29
- Figure 9.** Répartition (%) des différents types morphogénétiques observés après traitement des mâles et des femelles par le méthoxyfénozide (RH-2485) et le tébufénozide (RH-5992) chez *E. kuehniella*. ( $n= 3$ ) répétitions comportant chacune 20 chrysalides par série. 30
- Figure 10.** Les divers types morphogénétiques induits par le méthoxyfénozide (RH-2485) et le tébufénozide (RH-5992) après traitement des chrysalides mâles et femelles d'*E. kuehniella*. **A**: Adulte normal (**x6**), **B** : Adulte malformé (**x5**), **C** : Exuviation partielle (**x7**), **D** : Exuviation bloquée (**x8**). 31
- Figure 11.** Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la longueur ( $\mu m$ ) des testicules d' *E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$ ). 33
- Figure 12.** Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la largeur ( $\mu m$ ) des testicules d' *E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$ ). 34
- Figure 13.** Effets du RH-2485 et RH-5992 après application topique à des chrysalides mâles d'*E. kuehniella* nouvellement exuviées, sur l'évolution du volume ( $mm^3$ ) des testicules au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$ ). 35

- Figure 14.** Observation au stéréomicroscope de l'évolution de la taille des testicules d'*E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés. A : témoin ; B : RH-2485 ; C : RH-5992. 36
- Figure 15.** Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) sur les périodes de préoviposition et d'oviposition des femelles adultes d'*E. kuehniella* après traitement des chrysalides mâles et femelles ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$  couples, pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ). 37
- Figure 16.** Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) sur la fécondité des femelles adultes d'*E. kuehniella* après traitement des chrysalides mâles et femelles ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$  couples, pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ). 38
- Figure 17.** Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) sur la fertilité des oeufs des femelles adultes d'*E. kuehniella* après traitement des chrysalides mâles et femelles ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$  couples ; pour les oeufs :  $n = 4$  répétitions chacune comportant 10 oeufs ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ). 38
- Figure 18.** Courbe d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine. 39
- Figure 19.** Effets de deux agonistes des ecdystéroïdes (RH-2485, RH-5992) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur la quantité des protéines testiculaires ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de testicules) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$  ; les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ). 40
- Figure 20.** Courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (KDa) des protéines standards en fonctions de leurs mobilités relatives (a : B-Galactosidase ; b : Phosphorylase ; c : Albumin ; d : Glyceraldehyde ; e:Trypsinogen). 41
- Figure 21.** Profile électrophorétiques des protéines testiculaires d'*E. kuehniella*. A : protéines standards ( a : Myosin ; b : B-Galactosidase ; c : Phosphorylase ; d : Albumin ; e : Glutamic dehydrogenase ; f : Ovalbumin ; h :Glyceraldehyde i : Carbonic anhydrase ; k : Trypsinigen) ; B: Témoin ; C : RH-2485 ; D : RH-5992. 43
- Figure 22.** Analyse quantitative des ecdystéroïdes testiculaires d'*E.kuehniella*. Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B0 en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone. 44
- Figure 23.** Observation au stéréomicroscope des testicules d'*Ephestia kuehniella* chez la larve et chez la chrysalide. A: paire de testicules chez la larve (x 20). . B : un testicule chez la chrysalide après fusion (x 23). (Ts) testicules ; (F) follicule ; (Cle) cloison épithéliale. 47

- Figure 24.** Coupe longitudinale des testicules d'adultes d'*Ephestia kuehniella* observée sous microscope photonique montrant un follicule rempli de cystes. A: Témoin (x 33); B : RH-2485 (x 15); C : RH-5992 (x 24). (Cys) cystes sphériques ; (Cyp) cystes polyhédriques ; (Cya) cystes allongés ; (Cle) Cloison épithéliale ; (Ep) monocouche épithéliale. 48
- Figure 25.** Schematic model of molt regulation by 20E (Retnakaran *et al.*, 2001). 20E: 20-hydroxyecdysone; EcR: Ecdysone receptor; USP: ultra spiracle; ERE: Edysone Response Element; A1-3: transcription factors; B1-3: genes activated by A1-3; C1-3: genes expressed in the absence of 20E. 51
- Figure 26.** Diagrammatic section through a testis in Lepidoptera (Snodgrass, 1935). 66
- Figure 27.** Diagram of a testis follicle showing the sequence of stages of development of the sperm (Wigglesworth, 1965). 68

## 1. Introduction

Le monde est confronté aux défis d'accroître la production agricole pour répondre aux besoins d'une population croissante, en limitant les pertes avant et après récolte tout en préservant l'environnement.

Le secteur des céréales occupe une place très importante dans l'économie algérienne. Devant la place qu'occupe le blé dans le mode de consommation de sa population, l'Algérie appartient au groupe des plus gros importateurs de blé dans le monde où elle est classée à la première place en Afrique et à la troisième place dans le monde après le Brésil et l'Égypte. A titre indicatif, l'Algérie importe en moyenne 51,5 millions de quintaux de blé (blé dur et blé tendre) représentant un montant global annuel moyen de 1 milliard de dollars US (MADR, 2006). Pour faire face à une demande alimentaire sans cesse croissante, les importations peuvent être aussi massives que nécessaires. Il s'agit donc de les prévoir, les financer et les stocker. Cependant le stockage est difficile à gérer en raison des contraintes liées aux attaques d'insectes. Or ce moyen constitue l'un des facteurs clés pour assurer de façon durable la sécurité alimentaire d'un pays. Dans cette perspective un accent particulier devrait être mis sur le contrôle des insectes déprédateurs des récoltes dans les stocks dont les dommages occasionnés peuvent entraîner d'énormes pertes financières, des risques d'intoxication liés à la consommation des produits avariés et des risques de pénuries alimentaires.

Le degré d'attaque provoqué par les insectes nuisibles sur les céréales stockées en Algérie atteint une moyenne annuelle de l'ordre de 15,02% durant 2003/2004 (Mebarkia & Guchi, 2004). Selon les estimations du Système d'Information Africain sur les pertes post-récolte, les pertes en grains qui surviennent avant les procédés de traitement et de transformation varient de 10 à 20 % soit 1,6 milliard de dollars par an de la valeur totale de la production de grains. La valeur totale des pertes post-récolte en Afrique subsaharienne serait de 4 milliards de dollars par an pour une production totale annuelle évaluée à 27 milliards de dollars (moyenne annuelle 2005-2007). (FAO, 2011).

Face à cette menace que constituent les insectes ravageurs des stocks, les moyens de lutte sont essentiellement articulés autour de l'utilisation de pesticides de synthèse. Les organophosphorés, les pyréthroïdes ou encore les fumigations d'aluminium phosphide (Phostoxin®) sont généralement les produits chimiques utilisés actuellement en Algérie.

Dans des conditions optimales, leur efficacité à contrôler les nuisibles des stocks est certaine. Toutefois, ils sont neurotoxiques sur les vertébrés (Mathew & Thanuja, 2008 ; Timothy, 2012) et les organismes aquatiques (De Groot, 2004) et présentent beaucoup d'inconvénients et ne donnent plus satisfaction par rapport à la durabilité des agro-écosystèmes (perte de diversité biologique, dégradation de la qualité physico-chimique du milieu) et l'apparition de graves déséquilibres dans le milieu (pollution des eaux, contamination du sol et de l'air) (Regnault-Roger, 2002 ; Gueye *et al.*, 2011).

Les questions environnementales sont devenues une préoccupation internationale, majeure et croissante, en particulier à travers la convention sur la conservation de la diversité biologique et le plan d'action mondiale recommandant des pratiques agronomiques durables (Lévêque & Mounolou, 2001). Ainsi, l'utilisation des pesticides de synthèse contre les insectes ravageurs des cultures et des denrées stockées en particulier, repose sur deux critères primordiaux : la connaissance de la biologie et de la physiologie de l'insecte ainsi que le choix de l'insecticide. Ce dernier doit répondre à certains critères : être capable d'agir sur le plus grand nombre possible de ravageurs des cultures et ne pas persister dans l'environnement. Nous retiendrons ainsi que les molécules recherchées doivent être efficaces uniquement sur les insectes ciblés et ne pas avoir d'incidence sur les Vertébrés. Le moyen le plus logique pour approcher cet objectif est de trouver aux insecticides des cibles qui n'existent que chez les insectes ou chez les acariens (Mauchamp, 1990).

La connaissance du monde des insectes nous apprend qu'à l'état larvaire et nymphal, l'insecte se développe par une succession de mues, phénomène de remplacement de la cuticule. La cuticule à un stade déterminé, devenue trop étroite, est remplacée par celle plus vaste du stade suivant. A chaque mue, la région profonde de la cuticule est digérée, ce qui amincit cette enveloppe et permet sa déchirure. Les muscles vont pouvoir se détacher, autorisant le rejet des parties les plus superficielles de la cuticule (exuvie) (Retnakaran *et al.*, 1997; Dhadialla *et al.*, 2005). Au moment de la mue, il est indispensable qu'une nouvelle cuticule ait déjà été déposée au sommet des cellules épidermiques. Ces processus d'ordre physiologique et biochimique se produisant dans les cellules, les tissus et les organes sont en grande partie contrôlés et coordonnés par des molécules ayant des rôles messagers. Celles-ci transportées par le sang sont libérées par les tissus sécréteurs endocriniens. De nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré

l'influence de l'hormone juvénile et de l'ecdysone dans la programmation de la mue, le déterminisme de la croissance et le développement chez les insectes (Nijhout, 1994 ; Riddiford, 1994, 1996; Bellés, 2005 ; Gade & hoffman, 2005; Dhadialla *et al.*, 2005).

L'hormone juvénile (JH), un dérivé terpénoïde est le grand orchestrateur du développement de l'insecte (Riddiford, 1996 ; Dhadialla *et al.*, 1998 ; Dhadialla *et al.*, 2005). Elle est présente durant toute la vie larvaire et synthétisée par les corps allates sous la dépendance de neurohormones céphaliques (Stay & woodhed, 1993; koopmashap *et al.*, 1991). Sa présence à des niveaux élevés chez les insectes immatures empêche le déclenchement de la métamorphose au moment de la mue, assurant ainsi le maintien de caractères « juvéniles » jusqu'à la fin du développement larvaire. Hors son absence permet le passage de l'insecte du stade larvaire au stade pupal durant lequel l'insecte se métamorphose par une succession d'histolyse et d'histogénèse. Ces phénomènes sont initiés par une augmentation des taux des ecdystéroïdes et se terminent par leur chute et la sécrétion de l'hormone d'éclosion donnant un insecte adulte (Dhadialla *et al.*, 2005). (Fig. 1)

L'ecdysone est le premier ecdystéroïde isolé par Butenandt & Karlson en 1954 (Dinan, 2001). Sa structure chimique a été identifiée par Hoppe & Huber (1965) : c'est une prohormone des ecdystéroïde correspondant à la famille de stéroïdes polyhydroxylés. L'ecdysone est gonadotropique. Il est produit par les glandes prothoraciques, libéré dans l'hémolymph puis convertie en (20E) par l'enzyme ecdysone 20-monoxygénase qui est le cytochrome P450 (CYP) dépendant des hydroxylases des stéroïdes (Gilbert *et al.*, 2002 ; Warren *et al.*, 2004 ; Rewitz *et al.*, 2006a,b ; Gilbert & Rewitz, 2009 ; Iga *et al.*, 2010)

. La 20E se trouve dans différent tissus périphériques tels que le corps gras, le tube digestif et les tubes de malpighi (Rybczynski, 2005 ; Huang *et al.*, 2008). La voie biosynthétique de l'ecdysone est complexe. Le précurseur synthétique est le cholestérol, substance que les insectes ne peuvent pas synthétiser, mais dépend d'un apport exogène (Lafont *et al.*, 2002; Neubueser *et al.*, 2005). (Fig.2). Les ecdystéroïdes sont impliqués dans le contrôle des processus vitaux chez les insectes, l'embryogenèse, le développement post embryonnaire (Koslova & thummel, 2003) et spécialement dans la reproduction (Baltaev & Shangaraeva, 2000).

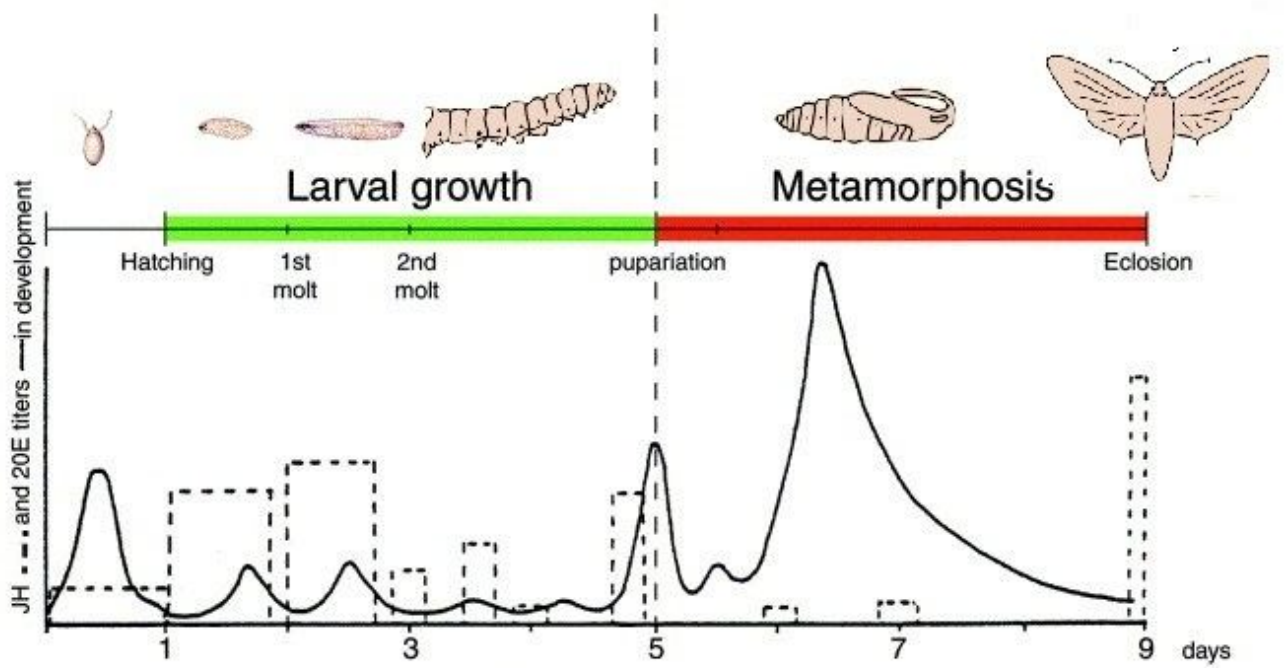


Figure1. Contrôle hormonal des différents types de mue chez les insectes (Truman & Riddiford, 1999).

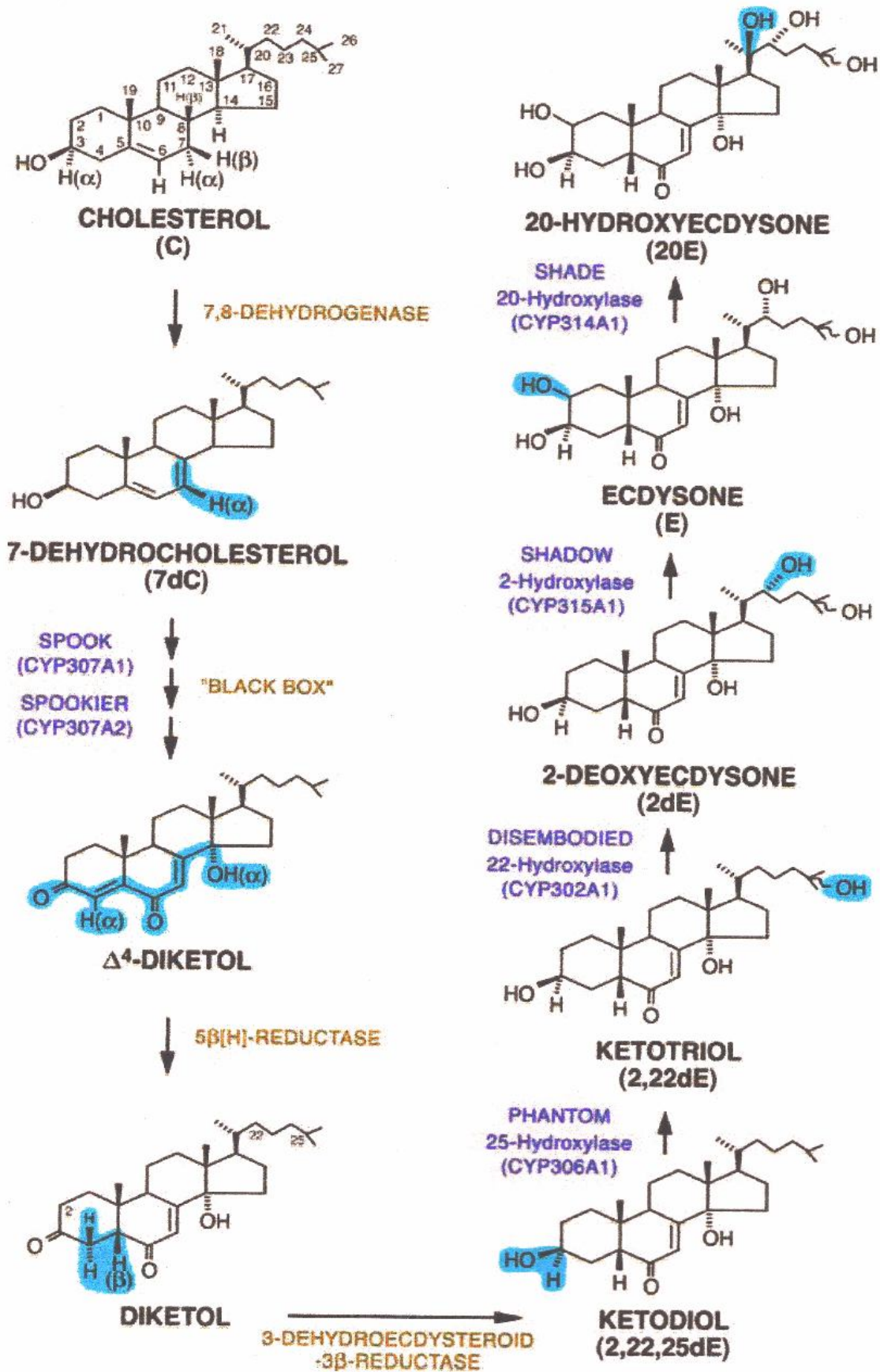


Figure 2 : La biosynthèse de l'ecdysone (Gilbert & Rewitz, 2009)

Au niveau de la reproduction, l'hormone juvénile, fut reconnue très tôt comme étant impliquée dans l'activité gonadotrope au niveau du développement des ovocytes chez *Rhodnius prolixus* (Wigglesworth, 1936). Or, ce n'est que 40 ans plus tard que l'ecdysone fut identifiée dans les ovaires des femelles chez le moustique *Aedes aegypti* (Hagedorn *et al.*, 1975). Les glandes prothoraciques qui synthétisent l'ecdysone au stade larvaire dégénèrent rapidement chez l'adulte (Rybczynski, 2005), l'ecdysone sera ensuite synthétisée par les ovaires des femelles (Sieglaff *et al.*, 2005 ; Ito *et al.*, 2008 ; Brown *et al.*, 2009 ; Rees *et al.*, 2010), les testicules des mâles (Loeb, 2001 ; Vafopoulou & Steel, 2005) et encore les oenocytes, les sternites et l'épiderme (Delbecq *et al.*, 1990 ; Spindler *et al.*, 1991 ; Kelly *et al.*, 1992 ; Asahina *et al.*, 1994 ; Soltani *et al.*, 1997).

Chez les femelles, les ecdystéroïdes sont présents dans les cellules folliculaires des ovaires de nombreux insectes et sont importants dans le développement de l'embryon et l'éclosion de l'œuf (Lafont *et al.* 2005). Elles jouent aussi un rôle clé dans la différenciation et la maturation du système reproducteur mâle (Loeb, 1991, 1994) et la production des spermatozoïdes (Gielbultowicz *et al.* , 1993; Seth *et al.* , 2002; Kawamura *et al.* , 2003) et ce, bien avant le stade adulte.

La capacité des mâles à produire des substances accessoires nécessaires pour le transport et l'activation des spermatozoïdes vers la femelle (Xue & Noll, 2000), la stimulation de la ponte par ces derniers (Chen, 1984), le développement des ovocytes et l'émission d'une substance chimique attractive (la phéromone) par la femelle sont sous le contrôle des hormones et des neurohormones (Dallaire *et al.*, , 2004).

Chez les femelles de la mouche domestique, *Musca domestica*, la production de la phéromone sexuelle est directement corrélée avec une augmentation du taux d'ecdystéroïde dans l'hémolymphe (Adams *et al.*, 1984; Dees, *et al.*, 1985). Dans ce cadre, les hormones ecdystéroïdes ont principalement pour fonction de synchroniser la maturation sexuelle avec l'initiation des comportements pré-copulatoires ayant pour finalité la rencontre des partenaires sexuels en vue de réaliser l'accouplement (Barth & Lester, 1973).

Vu les multiples rôles des ecdystéroïdes, de l'hormone juvénile et la structure complexe de la cuticule des insectes qui n'existe pas chez les vertébrés, le passage à une

lutte chimique contre les insectes nuisibles devrait selon Mauchamp, (1990) viser comme cible spécifique la cuticule et l'environnement hormonal de la croissance de l'insecte.

Ceci englobe selon Dhadialla *et al.* (2005) que toute absorption d'hormones exogènes ou d'analogues de synthèse (agonistes ou antagonistes) par l'insecte cible, entraînerait l'interruption de son développement ou des anomalies dans sa croissance.

La recherche permanente d'analogues successifs a abouti à la découverte de quelques molécules qui ont fait l'objet d'un développement et d'une mise sur le marché des produits phytosanitaires alternatifs appelés : Régulateurs de croissance des insectes (Insect Growth Regulator : IGRs). On en distingue trois catégories : les mimétiques des hormones juvéniles ou JHA (Juvenile Hormone Analogs), les inhibiteurs de la synthèse de la chitine que nous ne traiterons pas ici et les mimétiques d'hormones de mue ou MAC (Moulting Accelerating Compounds) qui font l'objet de notre présente étude (Tab. 1 et 2). Ces molécules relativement peu coûteuses à synthétiser sont commercialisées en France et un peu partout dans le monde. En Algérie seul le Diflubenzuron (DFB) ou Dimilin, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, est actuellement en vente. Il est largement utilisé contre les ravageurs des forêts.

La description, le mode d'action et le domaine d'application des IGRs ont fait l'objet de nombreux travaux. (Taylor , 2001, Tunaz & Uygun, 2004 ; Dallaire *et al.*, 2004 ; Ware & Whitacare , 2004 ; Dhadialla *et al.*, 2005 ; Ishayaa *et al.*, 2005 ; Collins , 2006 ; Gilbert & Gill, 2010 ; Rimoldi *et al.*, 2011 ; Perveen, 2011).

Les régulateurs de croissance des insectes (IGRs) appelés également Insecticides de troisième génération (Williams, 1956), sont des insecticides biorationnels (Khater, 2011). Ils ont une stabilité métabolique supérieure à l'hormone de mue endogène (20E) (Retnakaran, *et al.*, 1995). Ils ont une affinité vers les sites biochimiques des insectes cibles (Ishaaya *et al.*, 2005) et perturbent leur physiologie et leur développement (Retnakaran *et al.*, 2005). Ils sont sélectifs et moins toxiques vers les organismes non ciblés (Schneider *et al.* 2008; Pineda *et al.*, 2011) et présentent un faible risque écotoxicologique (Pineda *et al.*, 2006).

Tableau 1. Les différents groupes de régulateurs de croissance et leur activité (Tunaz & Uygun, 2004)

Nom commun	Activité
Bistfluron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Chlorfluazorun	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Buprofezin	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Cyromazine	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Diflubenzuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Flucycloxuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Flufenoxuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Hexaflumuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Lufenuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Noyaluron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Noyiflumuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Penfluron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Teflubenzuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Triflumuron	Inhibiteur de la synthèse de la chitine
Epofenonane	Mimétique de l'hormone juvénile
Fenoxycarb	Mimétique de l'hormone juvénile
Hydroprene	Mimétique de l'hormone juvénile
Kinoprene	Mimétique de l'hormone juvénile
Methoprene	Mimétique de l'hormone juvénile
Pyriproxyfen	Mimétique de l'hormone juvénile
Triprene	Mimétique de l'hormone juvénile
Juvenil hormone I	Analogue de l'hormone juvénile
Juvenil hormone II	Analogue de l'hormone juvénile
Juvenil hormone III	Analogue de l'hormone juvénile
Chromafenozide	Agoniste de l'hormone de mue
Halofenozide	Agoniste de l'hormone de mue
Methoxyfenozide	Agoniste de l'hormone de mue
Tebufenozide	Agoniste de l'hormone de mue
a-ecdysone	Analogue de l'hormone de mue
Ecdysterone	Analogue de l'hormone de mue
Diofenolan	Inhibiteur de mue

**Tableau 2.** Insecticides Bisacylhydrazine et leur mode d'action (Dhadialla *et al.*, 2005)

Nom commun	Code	Industrie	Nom commercial	Type de ravageurs
Méthoxyfénoside	RH-2485	Rohm and Hass Co <sup>a</sup> ., Dow AgroSciences LLC <sup>b</sup>	INTREPID <sup>®</sup> , RUNNER <sup>®</sup> , PRODIGY <sup>®</sup> , FALCON <sup>®</sup>	Lépidoptère
Tébufénoside	RH-5992	Rohm and Hass Co <sup>a</sup> ., Dow AgroSciences LLC <sup>b</sup>	MIMIC <sup>®</sup> , CONFIRM <sup>®</sup> , ROMDAN <sup>®</sup>	Lépidoptère
Halofénoside	RH-0345	Rohm and Hass Co <sup>a</sup> ., Dow AgroSciences LLC <sup>b</sup>	MACH 2 <sup>®</sup>	Lépidoptère Coléoptère
Chromofénoside	ANS 118,CM001	Nippon Kayaku, Saytn, Japan and Sankyo, Ibaraki, Japan	MATRIC <sup>®</sup> , KILLAT <sup>®</sup>	Lépidoptère

a: Mis au point et Commercialisé par Rhom and Hass Company, Spring House, PA, USA

b: maintenant détenus et commercialisés par Dow AgroSciences, LLC., Indianapolis IN, USA

La première notion de l'utilisation de ces régulateurs de croissance des insectes (IGRs) date de 1956, lorsque une application topique de l'hormone juvénile, isolée de l'abdomen d'un lépidoptère mâle *Hyalophora cecropia*, a empêché la métamorphose et la multiplication ultérieures de l'insecte. Cette découverte a été confirmée plus tard dans les années 60 lorsque les chercheurs de Harvard ont observé que *Pyrrhocoris apterus*, un hémiptère originaire de Tchécoslovaquie, avait un faible taux d'éclosion des œufs et que des larves surnuméraires ont été formées. Cette anomalie serait due à l'ingestion d'une molécule « juvabione » contenue dans les serviettes en papiers (Scott, marque 150) utilisées dans les bocaliers d'élevage. Cette dernière a pour source le sapin baumier, *Abies balsamea*, le principal arbre de pâte utilisée dans l'industrie du papier aux États-Unis (journaux, magazines, etc.). La découverte de cet analogue de l'hormone juvénile conduit à l'intérêt des industriels dans le développement des IGRs. Depuis, d'autres substances chimiques dérivées des plantes sont synthétisées selon la compréhension de la physiologie et la biochimie des insectes cibles, avec compatibilité potentielle et une protection intégrée (Tunaz & Uygun, 2004).

Les ecdystéroïdes présents chez les Arthropodes et les plantes possèdent diverses applications au niveau pharmacologique, médicinal et agricole (Reshma *et al.*, 2013). La recherche des molécules non stéroïdes mais capables de déclencher une mue a abouti à la découverte de diacylhydrazines (dérivés des hydrazides de l'acide benzoïque: dibenzoylhydrazines DBH) (Hsu, 1991). Ces agonistes des ecdystéroïdes sont des agents potentiels de lutte contre les insectes nuisibles et aussi un outil valable pour l'étude de leur mode d'action sur les ecdystéroïdes. Ils sont les derniers représentants d'une nouvelle classe d'IGRs ( Dhadialla *et al.*, 1998 ; Dhadialla *et al.*, 2005).

Ces analogues (agonistes) des ecdystéroïdes ne possèdent pas de stérol dans leur structure moléculaire, mais ils en conservent toutefois leur action. Ces agonistes administrés par pulvérisation ou par ingestion aux insectes ciblés se fixent aux récepteurs nucléaires EcR spécifiques de l'ecdysone des cellules épidermales (Riddiford *et al.*, 2000 ; Dhadialla *et al.*, 2005; Beckage *et al.*, 2004 ; Paul *et al.*, 2006) empêchant l'expression des gènes normalement activés en l'absence de l'ecdysone endogène (l'action de l'hormone ecdysone naturelle est limitée dans le temps) (Wing *et al.*, 1988; Retnakaran *et al.*, 1995) (Fig.3). Des travaux menés *in vitro* indiquent que les diacylhydrazines exercent la même action que la 20-hydroxyecdysone (Retnakaran *et al.*, 1995, Carlson *et al.*, 2001; Smaghe

*et al.*, 2001, 2002b; Nakagawa *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2007). Ils perturbent le système hormonal en induisant des mues létales et incomplètes dans divers ordres d'insectes (Dhadialla *et al.*, 2005 ; Dhadialla & Ross, 2007, Soltani-Mazouni *et al.*, 2012) et la formation d'adultes malformés (Sundaram *et al.*, 2002 ; Bouzeraa & Soltani-Mazouni , 2012 ). Parmi ces agonistes, le tébufénozide (RH-5992), l'halofénozide (RH-0345) et le méthoxyfénozide (RH-2485), affectent généralement la reproduction en réduisant la fécondité et la fertilité (Taibi *et al.*, 2003 ; Seth *et al.*, 2004; Saenz-de-Cabezón *et al.*, 2005; Dhadialla *et al.*, 2005 ; Rodriguez *et al.*, 2010 ; Bouzeraa & Soltani-Mazouni , 2012), produisent une activité ovicide, provoquent une altération du processus de la spermatogenèse (Dhadialla *et al.*, 1998 ; Nakagawa, 2005), une perturbation du comportement sexuel (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009) et nuisent de manière générale à la dynamique des populations (Pineda *et al.*, 2009).

Afin de déterminer l'efficacité des deux agonistes de l'hormone de mue (méthoxyfénozide RH-2485 et tébufénozide RH-5992) sur la diminution de la pullulation de l'insecte ou son potentiel reproducteur, l'objectif de cette thèse est de faire une étude sur : i) le développement ( durée du développement nymphal, pourcentage de survie de l'insecte et les différents types morphogénétiques observés) ; ii) la reproduction, en déterminant l'évolution de la taille des testicules chez la chrysalide et le potentiel reproducteur (période de préoviposition et d'oviposition, fécondité, fertilité) ; iii) l'aspect quantitatif et qualitatif des protéines testiculaires ; iiiii) la synthèse des ecdystéroïdes testiculaires ; et iiiiii) la cytologie des testicules chez un Lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*.

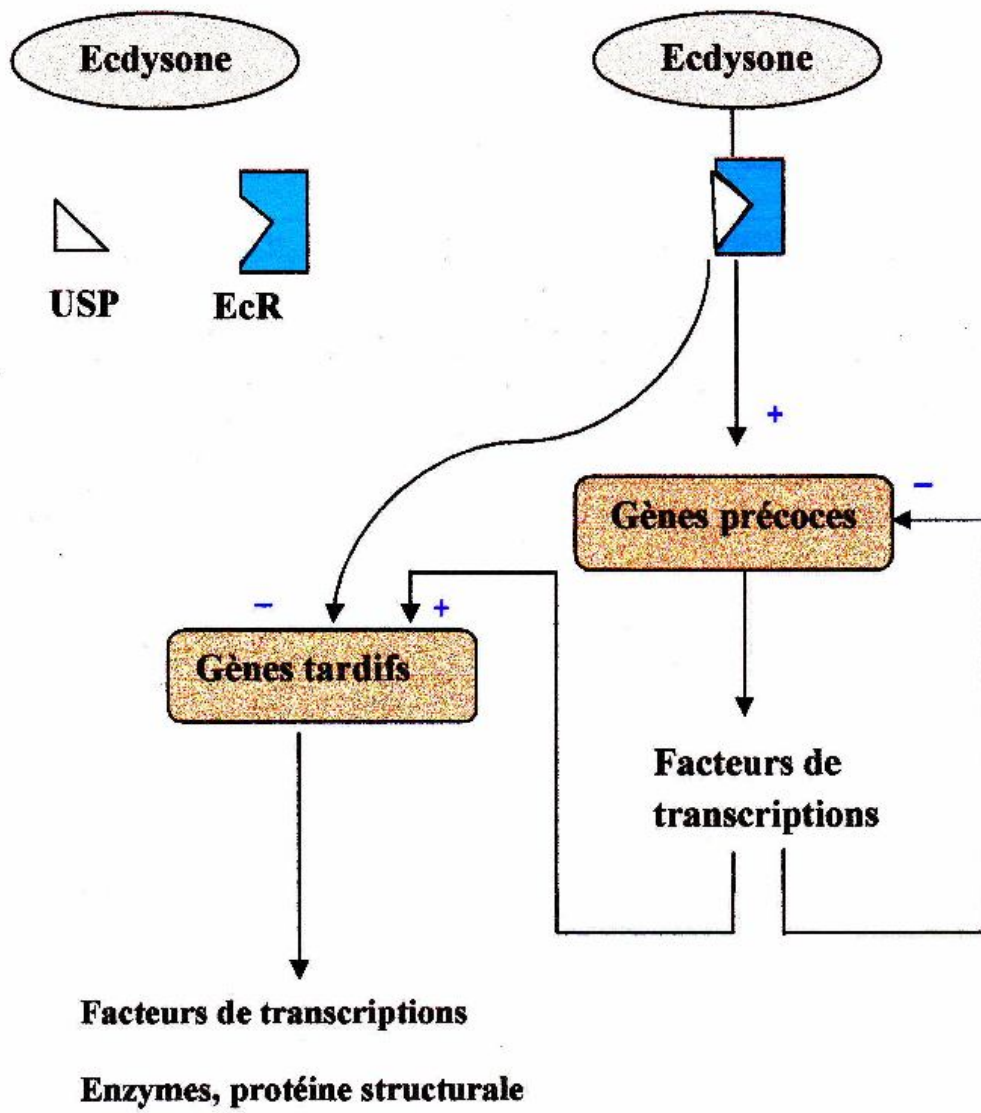


Figure 3. Mode d'action des ecdysteroïdes (Klowden, 2010)

## 2. Méthodologie

### 2.1 Matériel d'étude

#### 2.1.1 Modèle biologique

*Ephestia kuehniella* (Zeller) est un insecte présentant un modèle de premier choix pour la biologie évolutive à but agronomique, sa position systématique est la suivante :

Embranchement :	Arthropoda
Sous embranchement :	Hexapoda
Classe :	Insecta
Sous classe :	Pterygota
Section ;	Neoptera- oligoneoptera
Super ordre :	Endopterygota
Ordre :	Lepidoptera
Famille :	Pyralidae
Genre :	<i>Ephestia</i>
Espèce :	<i>kuehniella</i> (zeller) (1879)

Ce Lépidoptère holométabole est originaire de l'Inde mais existe aussi dans les régions tempérées et méditerranéennes. Il a une nette préférence pour la farine d'où « Pyrale de la farine », il peut également s'attaquer aux grains de céréales, biscuits, pâtes alimentaires, chocolat, riz (Contact Webmaster, 2002).

De type à moeurs nocturnes, *Ephestia kuehniella* (Zeller) se tient au repos contre les murs ou caché dans la farine (Balashowsky, 197). Ses larves facilement identifiables, présentent une tête bien développée et un corps clairement découpé en trois segments. Leur développement est fortement influencé par l'environnement, à savoir la température, l'humidité, et les sources de nourriture.

Le cycle complet du développement d'*Ephestia kuehniella* (Zeller) est de 80 jours (Fig.4). L'accouplement a lieu immédiatement après le début de la vie d'adulte. Juste après, sur une période de 3 jours, la femelle pond environ 100 à 200 œufs de couleur blanchâtre, de forme ovoïde, d'une longueur de 440 µm, et une largeur de 250 µm. Après 4 à 5 jours, les œufs formant un amas au fond et sur les parois des sacs de farine éclosent en

donnant naissance à des larves blanchâtres ou rosâtres mesurant 1 à 1,5 mm accompagnées de tubes en soie tissée dans lesquels elles vivent . Six mues plus tard, les larves achèvent leur croissance, elles sont totalement brunes et mesurent entre 10 à 13 mm. Elles errent alors en s'éloignant de leur source de nourriture en tissant une enveloppe de soie « cocon » contenant des substances nutritives dans laquelle elles évolueront pendant 8 à 12 jours donnant un stade immobile dans les coins sombres des bâtiments ou des machines. À l'émergence l'adulte alors de couleur grise, mesure 10 à 12 mm d'envergure. Il est formé par deux paires d'ailes : deux ailes antérieures grisâtres avec des points noirs et deux ailes postérieures blanchâtres finement frangées. Sa longévité est de 14 jours.

La finalité de la vie adulte est la reproduction. Les mâles meurent en général quelques jours après l'accouplement, les femelles après la ponte.

### 2.1.2 Présentation des insecticides

Le RH-2485 ou méthoxyfénozide (nom commercial : Runner ou Intrepid, Dow AgroSciences, USA) est le nom commun du 3-methoxy-2-methylbenzoic acide 2- (3,5-dimethylbenzoyl) -2- ( 1,1- dimethylethyl) hydrazine; *N-tert-butyl-N'*- ( 3 methoxy-o-toluoyl)- 3,5 xylohydrazide. Sa formule empirique est : C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et son poids moléculaire est de 368,47g (Fig.5).

Le RH-5992 ou tébufénozide (nom commercial : Mimic ou Confirm, Dow AgroSciences, USA) est le nom commun du 3,5-dimethylbenzoic acide 1-(1,1 dimethylethyl)-2- (4-ethylbenzoyl) hydrazine; *N-tert-butyl-N'*-( 4-ethylbenzoyl)-3,5-dimethylbenzohydrazide, sa formule empirique est : C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> et son poids moléculaire est de 352,48g (Fig.5).

Les deux molécules sont classées par l'Agence Américaine de la Protection de l'Environnement (US EPA) comme insecticides à faible risque (Khater, 2011). Ils sont spécifiques aux Lépidoptères (Dhadialla *et al.*, 2010 ; Smagghe *et al.*, 2012) et toxiques après ingestion ou application topique à des doses élevées (Hsu, 1991). L'effet commence par une inhibition de l'alimentation pendant 3 à 14 h (Retnakaran *et al.*, 1997), ce qui est très important pour prévenir des dommages aux cultures.

Pour notre expérimentation, les deux produits nous ont été aimablement fournis par Pr. G. Smagghe (Ghent University, Belgium).

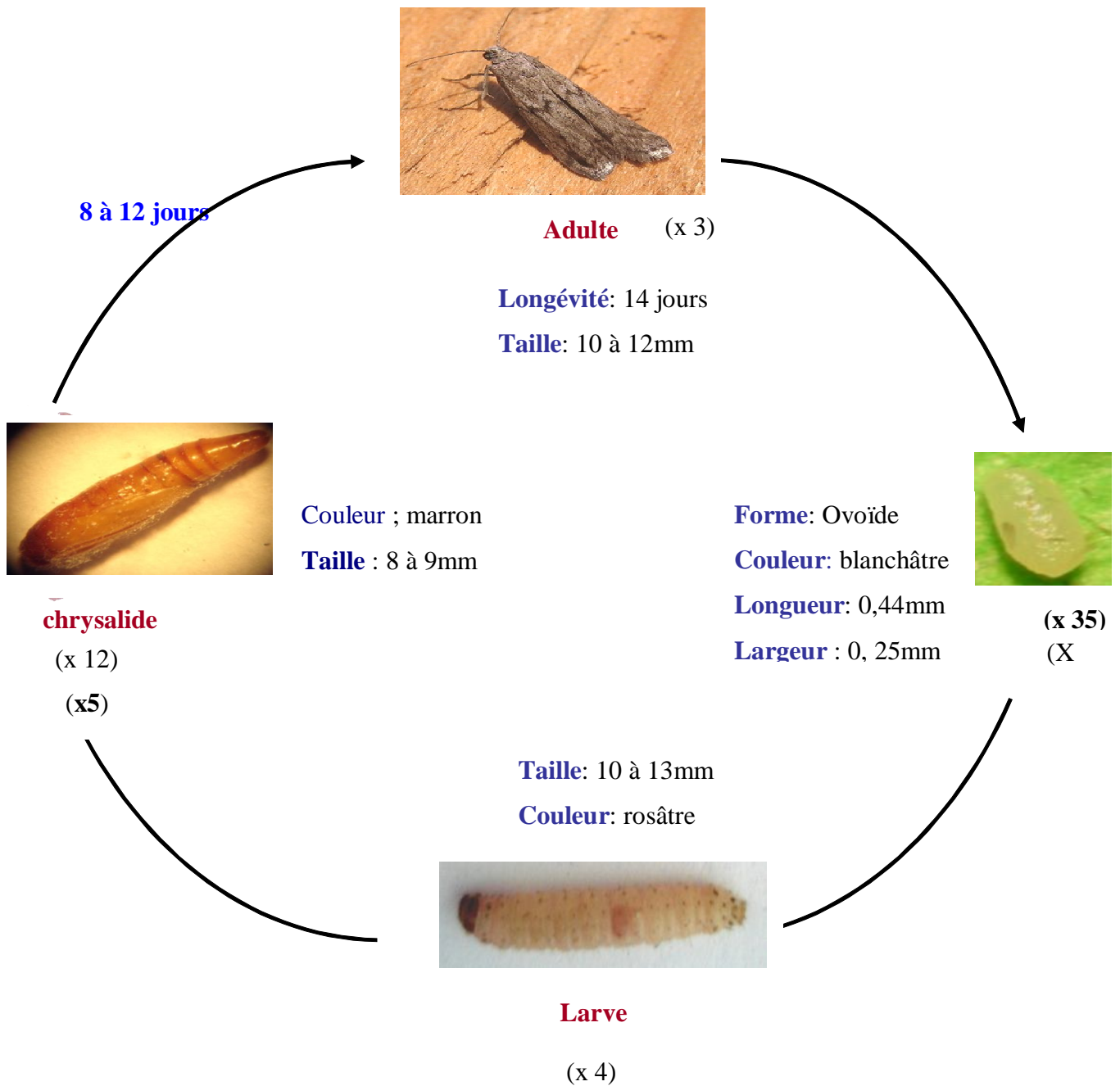


Figure 4 : Cycle de développement d'*E. kuehniella* à 27°C. (Photos : H. BOUZERAA)

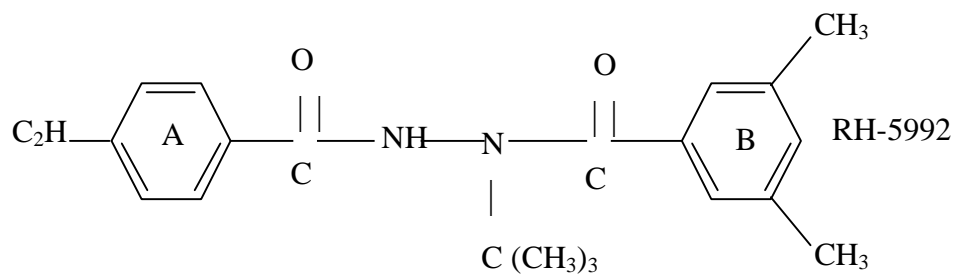
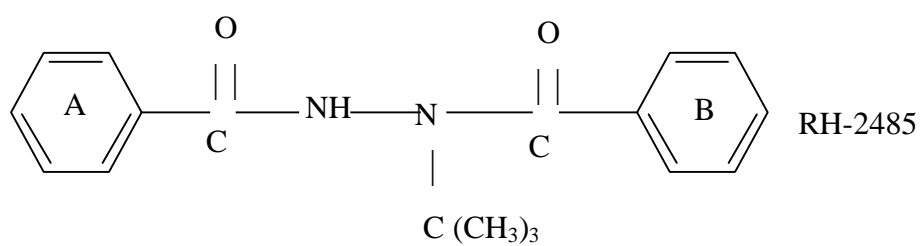
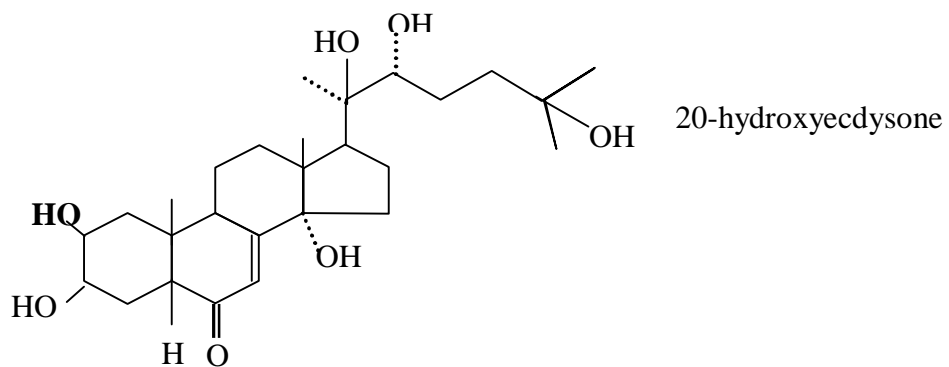


Figure 5 : Formules de structure de l'hormone de mue et deux agonistes des ecdystéroïdes.

## 2.2. Méthode d'étude

### 2.1.1 Technique d'élevage

La farine infestée a été obtenue à partir du moulin Hippone. L'élevage est réalisé au laboratoire à une température de 27°C et une humidité relative de 80% (Payne, 1966). Les individus d'*E. kuehniella* sont déposés dans des jarres en verre contenant de la farine et recouvertes par un morceau de tulle maintenu par un élastique. Les larves du dernier stade récoltées à la surface du tulle, sont séparées en fonction de leur sexe et sont déposées séparément dans des boîtes en plastique contenant la farine et du papier plissé pour qu'elles puissent se nymphoser.

### 2.2.2 Traitement

Le RH-2485 et le RH-5992 ont été administrés séparément par application topique sur la face ventrale des chrysalides mâles et femelles nouvellement exuviées (< 8h) à l'aide d'une seringue Hamilton à des doses subléthales (DL50).

Les DL50 ont été déterminées précédemment : tébufenozide : 0,005µg/insecte (Hami *et al.*, 2005) et méthoxyfenozide : 0,01µg/insecte (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). La quantité du produit est dissoute dans 2µl d'acétone. Les chrysalides témoins reçoivent 2µl d'acétone seule.

### 2.2.3 Détermination des différents types morphogénétiques

Durant le développement nymphal, l'insecte immobile est mis sous observation jusqu'à l'émergence adulte pendant laquelle toute apparition anormale a été signalée. L'expérimentation a été faite sur 20 individus comparés à des témoins. Le taux de formation morphogénétique et la durée de leur développement nymphal ont été déterminés.

### 2.2.4 Etude morphométrique

La majorité des espèces d'insectes ont une paire de testicules recouverts par un épithélium fréquemment pigmenté, de couleur rouge, vert, jaune ou marron selon les espèces. Cette pigmentation facilite l'identification des testicules au cours de la dissection. Les chrysalides traitées et les témoins de différents jours: 1<sup>er</sup> jour, 3<sup>ème</sup> jour, 5<sup>ème</sup> jour, 7<sup>ème</sup>

jour et dernier jour nymphal ainsi que les adultes nouvellement émergés (à 0 jour) sont soumis à la dissection sous une loupe binoculaire. Fixés sur une boîte de paraffine par une aiguille sur le thorax, l'abdomen est coupé à l'aide de microciseaux jusqu'au 4<sup>ème</sup> segment. Les testicules situés dorsolatéralement du tube digestif sont ainsi prélevés et divers paramètres morphométriques ont été mesurés :

\* La longueur (L) et la largeur (l) des testicules sont mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire monté sur un microscope préalablement étalonné.

\* Le volume (V) testiculaire exprimé en mm<sup>3</sup> est obtenu grâce à la formule suivante (Lambreas *et al.*, 1991).

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

Pour chaque période dix répétitions ont été réalisées.

#### 2.2.5. Détermination du potentiel reproducteur

Juste après l'exuviation des adultes, les mâles et les femelles traités ont été mis dans des jarres individuelles de 10 cm de long recouvert sur toute la surface interne par un tulle afin de récupérer un éventuel œuf pondu. Une petite quantité de farine et un coton imbibé d'eau y ont été déposés. Les jarres ont été fermées et maintenues à une température de 25°C. Les résultats ont été comparés par rapport aux témoins et dix répétitions ont été réalisées pour chacun des cinq paramètres suivants :

\* Période de préoviposition : déterminée par le nombre de jours séparant l'émergence et le début de la ponte.

\* Période d'oviposition : déterminée par la durée (en jour) de la ponte.

\* fécondité des femelles : c'est le nombre total d'œufs pondus par une femelle durant la période d'oviposition. Après chaque ponte, les œufs ont été comptés et déposés dans une boîte de Pétri étiquetée.

\* Fertilité des œufs : c'est le nombre d'œufs éclos parmi la totalité des œufs pondus par une femelle. Le taux d'œufs éclos a été obtenu selon la formule suivante : le nombre d'œufs éclos par femelle x100/ le nombre totale d'œufs pondus par femelle.

## 2.2.6 Etude électrophorétique des protéines

L'étude qualitative des protéines testiculaires des adultes d'*E. kuehniella* nouvellement exuviés (Fig.6) a été réalisée par électrophorèse sur mini gel selon la technique de Laemmli (1970). Il s'agit d'une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide à 30% comprenant le Running gel à 8% et le stacking gel à 4.5% additionné de sodium dodécyl sulfat (SDS) à 10% (Tab. 3).

Tableau 3. Composition du gel de séparation (Runing gel) et du gel de concentration (Stacking gel)

Produits	Stacking gel	Runing gel
Acrylamide 30% (ml)	1.50 ml	5.3 ml
Lower gel (ml)	-	5 ml
Upper gel (ml)	2.5 ml	-
SDS10% (ml)	-	0.2 ml
Sucrose55% (ml)	-	2.5 ml
Eau distillée (ml)	5.7 ml	6.8 ml
Amonium persulfate10% (ml)	300 µl	0.2 ml
TEMED (µl)	10µl	25µl

### - Principe de l'électrophorèse

C'est une technique de séparation basée sur le fait que des molécules chargées électriquement et placées dans un champ électrique migrent à des vitesses différentes selon leur poids moléculaire, leur configuration, leur concentration ainsi que leurs propriétés amphotères (Lemoine, 1980 ; Maurer, 1991 ).

### - Composition de l'appareil électrophorétique

Cet appareil est composé d'une mini cuve de 8cmx7cm destinée à recevoir le tampon de migration, 2 plaques d'alumine blanches opaques, deux plaques de verre, quatre espaceurs de 1.5 mm, quatre pinces servant à attacher les plaques en verre avec les plaques d'alumine, deux peignes pour le moulage des chambres de dépôt et un chapeau avec électrodes.

Après dissection, les testicules témoins et traités *d'E. kuehniella* ont été déposés dans des tubes eppendorff et broyés dans 500 µl d'eau distillée + 1µl de phenylmethanesulfonylfluoride (PMS). Après centrifugation (5000 tours/10mn), 100µl du surnageant ont servi pour le dosage quantitatif des protéines. La quantité des protéines testiculaires a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant comme réactif le bleu brillant de coomassie. Les quantités de protéines mesurées ont été exprimées en µg/mg de tissu. Les 400 µl restants ont été mis sous agitation pendant 24 heures. Après congélation, ils ont été lyophilisés jusqu'à une déshydratation totale. Un tampon d'échantillon (Sample buffer) est ensuite préparé (tabl. 4) et mis dans chaque tube eppendorff des séries témoins et traités. La quantité du tampon additionnée correspond à la quantité des protéines déterminée auparavant.

Tableau 4. Composition du tampon d'échantillon (samplpe buffer)

Produits	Sample buffer
Upper buffer	6,25ml
Mercaptoéthanol	2,50ml
SDS 10%	7,14ml
Bleu de bromophénol 0,05%	5ml
Glycérol	5ml
EDTA	18,6mg

#### - Manipulation

Une fois l'appareil est monté, on fait coulé entre la plaque d'alumine et la plaque en verre le gel de séparation (Runing gel) à 8%. Après 30mn de polymérisation, on coule le gel de concentration (stacking gel) à 4.5%, on place alors rapidement le peigne et on laisse polymériser pendant 30mn. On remplit ensuite la cuve de tampon de migration (Runing Buffer) (Tab. 5), on enlève alors délicatement le peigne. Chaque dent correspond à une chambre de dépôt d'échantillon.

Tableau 5. Composition du tampon de migration (Runing buffer)

Produits	Runing buffer
Tris bac (g)	6,00
Glycine (g)	28,8
SDS (g)	1,00
Eau distillée (ml)	1000

#### -Dépôt des échantillons

Les échantillons sont déposés à raison de 10µl dans les chambres de dépôt en ayant soin de réserver la première chambre au marqueur dont le poids moléculaire est connu (Tab .6).

Le chapeau avec les électrodes reliées à un générateur est alors placé sur l'appareil. La tension électrique appliquée a été d'abord de 50 volts, ceci permettra l'alignement des protéines pendant 30mn, elle est ensuite ramenée à 100 volts pour faciliter la migration des protéines qui va durer environ 2h30mn.

Tableau 6. Poids moléculaire des protéines standard.

Proteins standards	PM (KDa)
B-Galactosidase	116
Phosphorylase b	97
Albumine	66
Glyceraldehyde	36
Trypsinogen	24

#### - Coloration et décoloration

Après migration des protéines, le gel est enlevé délicatement à l'aide d'une spatule et mis dans le colorant (Tab. 7) sous agitation pendant 24heures.

Avant de mettre le gel dans la solution de décoloration (Tab. 8) pendant 30mn, on effectue d'abord sous agitation 2 à 3 bains d'une heure chacun d'acide acétique à 2%. (Ce procédé prend fin lorsque l'acide acétique devient clair). À la fin le gel est conservé sous vide dans un sachet.

Tableau 7. Composition de la solution de coloration

Produits	Solution de coloration
Bleu Brillant de Comassie R250 (mg)	250
Méthanol absolu (ml)	125
Acide acétique 10% (ml)	25
Eau distillée (ml)	1000

Tableau 8. Composition de la solution décolorante

Produits	Solution de rinçage
Méthanol 4.5% (ml)	45
Glycérol 2.5% (ml)	25
Acide acétique 10% (ml)	100
Ethanol 10% (ml)	100
Eau distillée (ml)	1000

### 2.2.7 Dosage immuno-enzymatique des ecdysteroides

#### - Principe du dosage

Le dosage enzymo-immunologique (EIA) est une technique qui a été adaptée aux ecdystéroïdes par Porcheron *et al.* (1989) puis modifiée par De Reggi *et al.* (1992). Cette technique utilise comme traceur enzymatique le Peroxydase couplé à la 2-succinyle 20-hydroxyecdysone. Le traceur enzymatique est mis en compétition avec les ecdyétéroïdes des extraits biologiques pour les sites d'un anticorps anti-ecdysteroïdes 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 éliminer au cours d'un rinçage des plaques (Fig.7). 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'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6N), 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).

#### - Prélèvement des échantillons et extraction des hormones

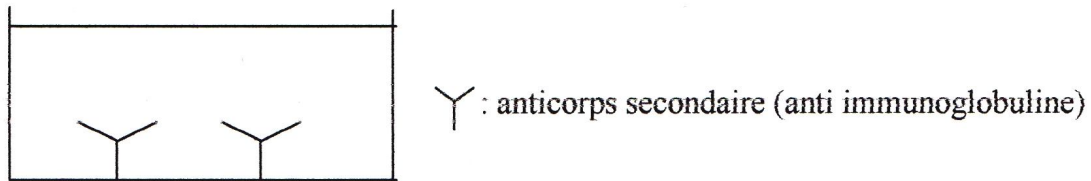
Un pool de dix paires de testicules d'adultes nouvellement exuvies prélevés à 0 jour des séries témoins et traitées *in vivo* a été extrait dans des tubes eppendorff contenant 500µl de méthanol à 95%. Après broyage aux ultrasons et centrifugation à 5000g/10min (2700 tours/ 10mn), le surnageant est prélevé et mis dans un tube eppendorf ensuite évaporé dans un bain sec réglé à 60°. Les extraits secs obtenus sont dissous dans 500 µl de tampon EIA (0,1 M ; pH= 7,4) et conservé au congélateur jusqu'au dosage.

#### - 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 plaque solide des microplaques, en distribuant 200µl d'une solution purifiée d'immunoglobuline anti-IgG (Sigma, Angleterre) dans chaque puits. Cette solution est préparée en rajoutant une quantité (200µl) de solution mère de tampon phosphate (0,05 NpH= 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 100µl dans chaque puits. Les plaques seront conservées à 4° et peuvent être utilisées 12 heures après la saturation.

\* Préparation de la courbe standard: Des solutions diluées ( $10^{-13}$  à  $10^{-7}$ M) sont obtenus à partir d'une hormone ecdystéroïdes standard utilisée dans ce dosage : l'ecdysone (E) de poids moléculaire de 464,6g.

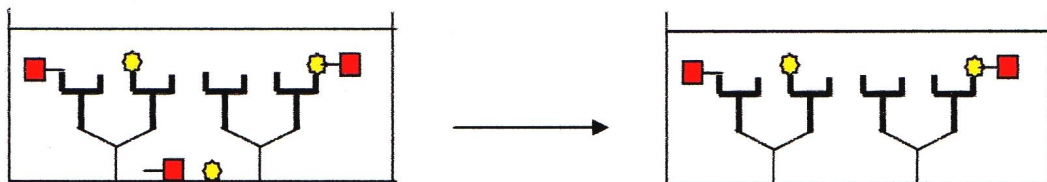
**Etape 1:** Coating (24 heures à température ambiante) et saturation (12 heures à 4°C)



**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 ⇒ forte dose d'ecdystéroïde

coloration forte ⇒ faible dose d'ecdystéroïde

Figure 7. Principe du dosage EIA (Pocheron *et al.*, 1989)

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

- Le p premier puits de la première colonne est réservé au témoin dans lequel on distribue 100µl du tampon EIA et 50µl du traceur enzymatique.
- Les puits restants de la première colonne sont réservés aux blancs (B<sub>0</sub>), en absence d'hormone, dans lesquels on distribue 50µl du tampon EIA, 50µl du traceur enzymatique et 50µl d'anticorps.
- Dans la deuxième et la troisième colonne, on distribue en double respectivement 50µl des différentes concentrations des solution standards (la gamme), 50µl du traceur enzymatique et 50µl d'anticorps.
- Tous les puits restants sont réservés aux échantillons à doser dans lesquels on distribue respectivement 50µl d'échantillon, 50µl du traceur et 50µl d'anticorps.

Le volume final dans chaque puits doit être de 150µl. Enfin la microplaque est mise sous agitation pendant trois heurs 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 optique: les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque à 630nm, puis à 450nm après addition d'acide sulfurique (6N) qui permet d'amplifier et de stabiliser la coloration. Elles sont exprimées sous forme d'un rapport:

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

B: absorbances de l'échantillon ou du standard.

B<sub>0</sub>: absorbances en absence d'hormone.

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

## 2.2.8 Microscopie électronique à transmission

La structure des testicules des séries témoins et traitées 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 poste fixation, la déshydratation et l'inclusion

### - Fixation, rinçage et post-fixation

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

### - 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 dans la composition est la suivante: 60ml de DDSA (dodecyl sulfate aldéhyde), 25ml d'épikote et 20ml d'araldite. Ce mélange est utilisé avec un accélérateur le DMP30 [(2,4, 6-tris (diméthylamino-méthyl phéno)] 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.

#### - Confection des coupes et coloration

Des coupes semi-fines sont réalisées au moyen d'un ultra microtome LKB 2088, en utilisant des couteaux en 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 minutes, puis examinées au microscope photonique.

### **2.3. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés statistiquement par la moyenne plus ou moins l'écart type ( $m \pm SD$ ). Les moyennes des différentes séries sont comparées deux à deux en utilisant le test  $t$  de Student avec un seuil de signification  $P \leq 0,05$ . Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel MINITAB (Version 16, PA State College, USA). Le nombre de chrysalides ou d'adultes testés ainsi que le nombre de répétitions sont précisés avec les résultats.

### 3. Résultats

#### 3.1. Effets du RH-2485 et RH-5992 sur le développement

##### 3.1.1. Effets sur la durée du développement nymphal

Durant le développement nymphal, l'insecte se métamorphose en une moyenne de dix à onze jours chez *E. kuehniella* dans les conditions expérimentales standardisées (Température 27°, humidité relative à 80%). L'application topique de deux insecticides séparément sur les chrysalides mâles à 0 jours n'a pas donné d'effet significatif ( $p > 0,05$ ) sur la durée du développement nymphal de cette espèce. Par contre, chez les chrysalides femelles le RH-2485 et le RH-5992 réduisent de manière significative ( $p < 0,001$ ) la durée du développement nymphal comparativement aux témoins. (Fig.8).

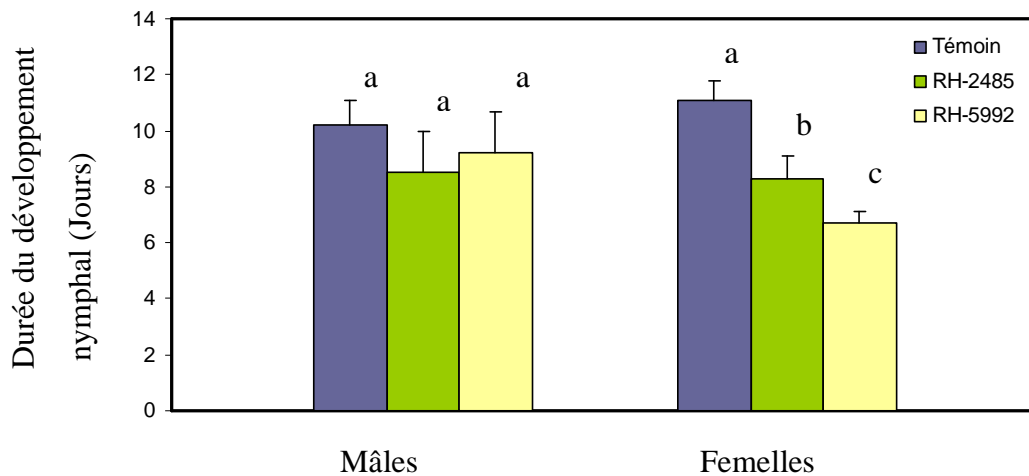


Figure 8. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles et femelles nouvellement exuviées, sur la durée (jours) du développement nymphal chez *E. kuehniella* ( $m \pm SD$ ,  $n = 20$ , les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

### 3.1.2. Répartition des différents types morphologiques induits après traitement

Après traitement des chrysalides à 0 jour, l'observation de perturbations morphologiques durant le stade nymphal a mis en évidence l'apparition de quatre différents types morphogénétiques aussi bien chez les mâles que chez les femelles d'*E. kuehniella* (Fig. 9, 10) :

- Type 1. Adultes normaux : le taux de formation d'adultes normaux après traitement avec le RH-5992 est estimé à 31,81 % contre 25 % sous l'effet du RH-2485 et 74 % chez les témoins (Fig. 9 et 10A).
- Type 2. Adultes malformés : les adultes subissent une exuviation adulte montrant un corps entier avec cependant des ailes malformées caractérisées soit par une petite taille soit par une courbure donnant l'aspect d'une aile brisée. L'application du RH-2485 révèle un taux de 6,25 % d'adultes malformés en comparaison des témoins 3 %, contre une absence de malformation avec le RH-5992 (Fig. 9 et 10B).
- Type 3. Émergence partielle : l'exuviation adulte est incomplète avec apparition d'une partie du corps adulte tandis que l'autre partie reste nymphale. Le taux d'émergence partielle est de 18,19% chez les traitées avec le RH-2485 contre 3% chez les témoins et 0% chez les traitées avec le RH-5992 (Fig. 9 et 10C).
- Type 4. Émergence bloquée : certaines chrysalides présentent un corps peu ou pas tanné alors que d'autres s'effritent au toucher. Ce type morphogénétique confirme que le RH-2485 avec 68,75 % d'émergence bloquée est plus toxique que le RH-5992 avec un taux de 50 %, par rapport aux témoins dont le taux est de 20 % (Fig. 9 et 10D)

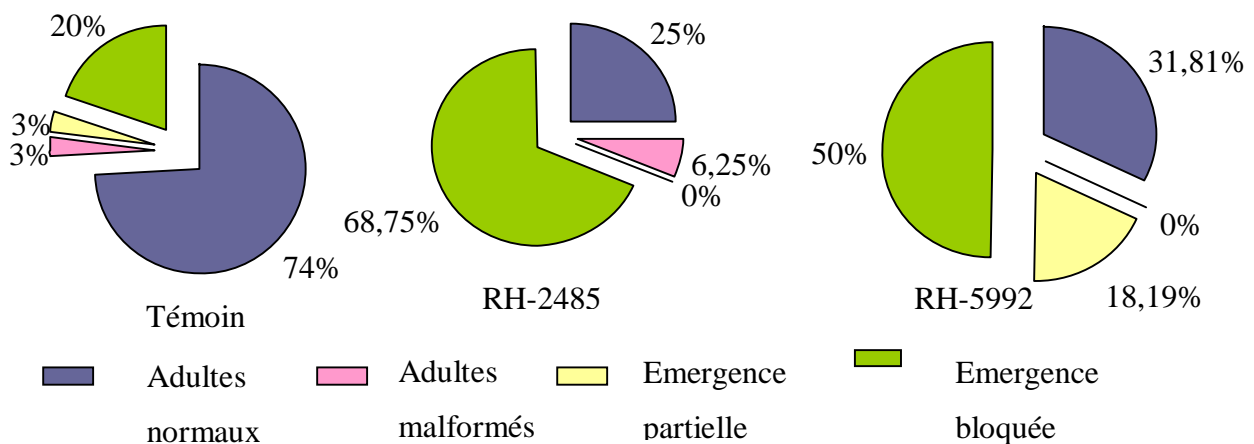


Figure 9. Répartition (%) des différents types morphogénétiques observés après traitement des mâles et des femelles par le méthoxyfénozide (RH-2485) et le tébufénozide (RH-5992) chez *E. kuehniella*. (n= 3) répétitions comportant chacune 20 chrysalides par série.

### 3.2. Effets du RH-2485 et RH-5992 sur la reproduction

#### 3.2.1. Effets sur la morphométrie des testicules

Les caractères morphologiques des testicules, longueur (L), largeur (l), volume (v) sont des paramètres morphométriques dont les variations dans le temps sont à étudier pour déterminer leur rapport avec la reproduction chez *E. kuehniella*.

Au 1<sup>er</sup> jour nymphal la taille enregistrée chez les témoins est de  $2008 \pm 328,71\mu\text{m}$  pour la longueur,  $1768 \pm 249,01\mu\text{m}$  pour la largeur et de  $3,2 \pm 0,00\text{mm}^3$  pour le volume. Ces valeurs évoluent de manière oscillatoire en subissant du jour 1 au jour 3 une diminution progressive puis ils augmentent progressivement jusqu'au jour 5. À partir de ce jour les valeurs tendent à diminuer jusqu'à l'émergence des adultes où ils atteignent une (L) de  $1393 \pm 49\mu\text{m}$  ; une (l) de  $1048 \pm 91\mu\text{m}$  ; et un (v) de  $0,7 \pm 0,01 \text{mm}^3$ . Après application topique du RH-2485 et du RH-5992 sur les chrysalides nouvellement exuviées, la taille des testicules paraît plus élevée chez les traitées que chez les témoins. Les valeurs les plus élevées sont enregistrées avec le RH-2485. Du jour 1 au jour 3 leur évolution suit le même profil que chez les témoins mais contrairement à ces derniers, les valeurs continuent à diminuer jusqu'au jour 7. A partir de ce stade une différence entre les traitées a été observée puisque une légère augmentation de la taille a été obtenue avec le RH-2485 du jour 7 au dernier jour nymphal comparativement au RH-5992 et aux témoins qui affichent plutôt une diminution. Cependant chez les adultes nouvellement émergés la même molécule entraîne une diminution de la taille comparativement au RH-5992. Toutefois au dernier jour nymphal et chez les adultes nouvellement émergés les deux molécules entraînent une augmentation très significative ( $p < 0,001$ ) de la taille des testicules (Tab.9, 10, 11) (Fig. 11,12, 13, 14).

Tableau 9. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la longueur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules d' *E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n = 10$ ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

Traitements/Jours	1	3	5	7	Dernier jour nymphal	Adulte Nouvellement émergé
Témoin	2008 $\pm$ 328,71a	1840 $\pm$ 283,74a	1936 $\pm$ 276,61a	1680 $\pm$ 257,95a	1528 $\pm$ 180,40a	1392 $\pm$ 49,00a
RH-2485	2160 $\pm$ 118,62a	1944 $\pm$ 290,73a	1768 $\pm$ 251,50a	1600 $\pm$ 237,33a	1624 $\pm$ 94,91a	1576 $\pm$ 140,01b
RH-5992	2104 $\pm$ 118,96a	1968 $\pm$ 215,26a	1784 $\pm$ 217,72a	1600 $\pm$ 327,91a	1408 $\pm$ 134,82a	1496 $\pm$ 67,10b

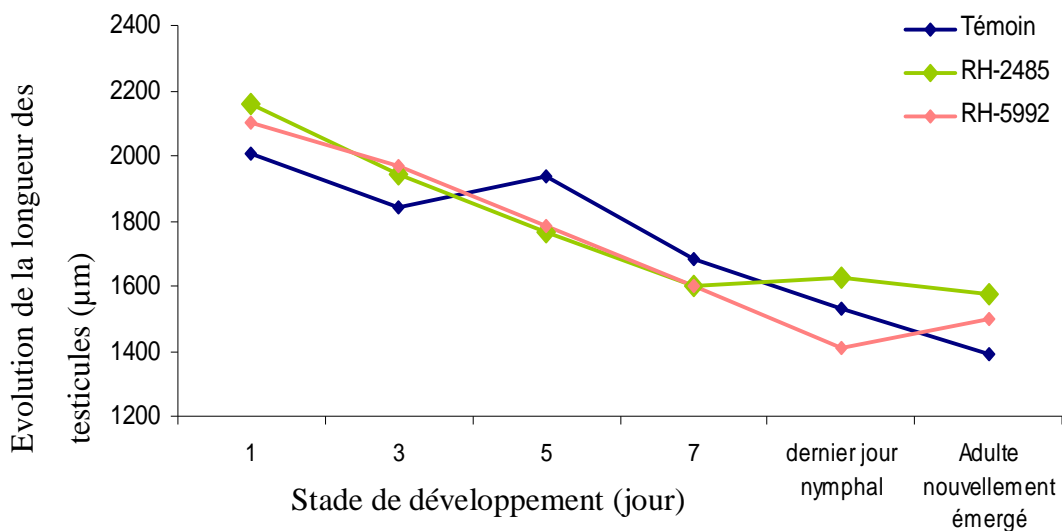


Figure 11. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la longueur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules d' *E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n = 10$ ).

Tableau 10. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la largeur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules d' *E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$ ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

Traitements/Jours	1	3	5	7	Dernier jour nymphal	Adulte Nouvellement émergé
Témoin	1768 $\pm$ 249,01a	1520 $\pm$ 286,22a	1648 $\pm$ 253,41a	1336 $\pm$ 186,00a	1128 $\pm$ 198,00a	1048 $\pm$ 91,01a
RH-2485	1904 $\pm$ 142,20a	1752 $\pm$ 296,00 a	1616 $\pm$ 225,72a	1416 $\pm$ 242,71a	1416 $\pm$ 92,82b	1288 $\pm$ 154,00b
RH-5992	1784 $\pm$ 175,42a	1728 $\pm$ 172,31a	1616 $\pm$ 150,91a	1312 $\pm$ 498,53a	1232 $\pm$ 144,01a	1268 $\pm$ 119,23b

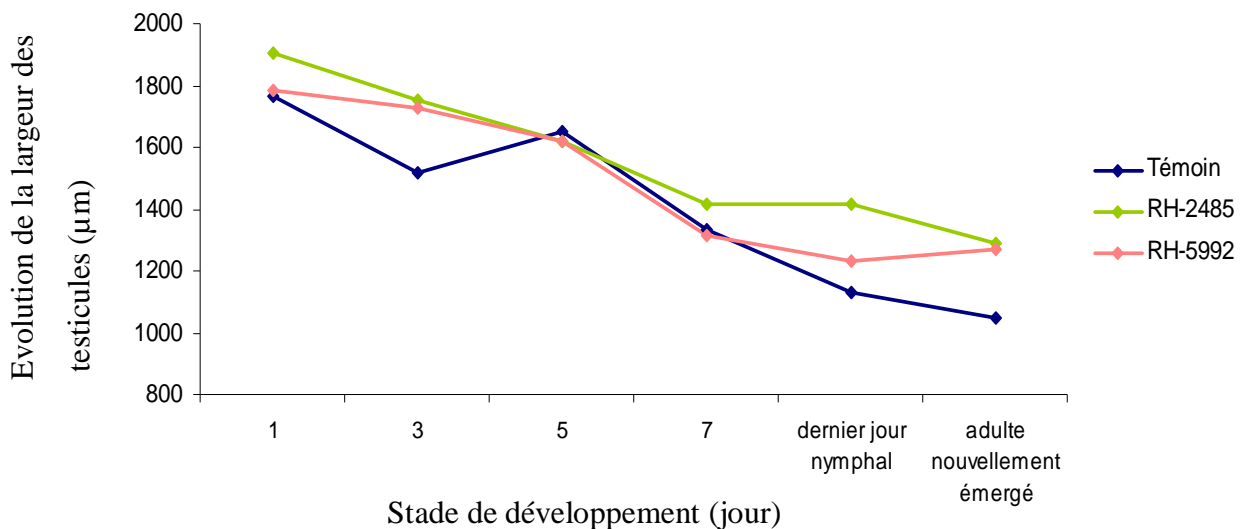


Figure 12. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur la largeur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules d' *E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$ ).

Tableau 11. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées sur le volume ( $\text{mm}^3$ ) des testicules d' *E. kuehniella* au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n = 10$ ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

Traitements/Jours	1	3	5	7	Dernier jour nymphal	Adulte nouvellement émergé
Témoin	3,26±0,00a	2,22±0,00a	2,74±0,00a	1,56±0,00a	1,01±0,00a	0,79±0,00a
RH-2485	4,08±0,00a	3,11± 0,00a	2,40±0,00a	1,67±0,00a	1,69±0,00b	1,35±0,00b
RH-5992	3,49±0,00a	3,05±0,00a	2,42±0,00a	1,43±0,00a	1,11±0,00a	1,24±0,00b

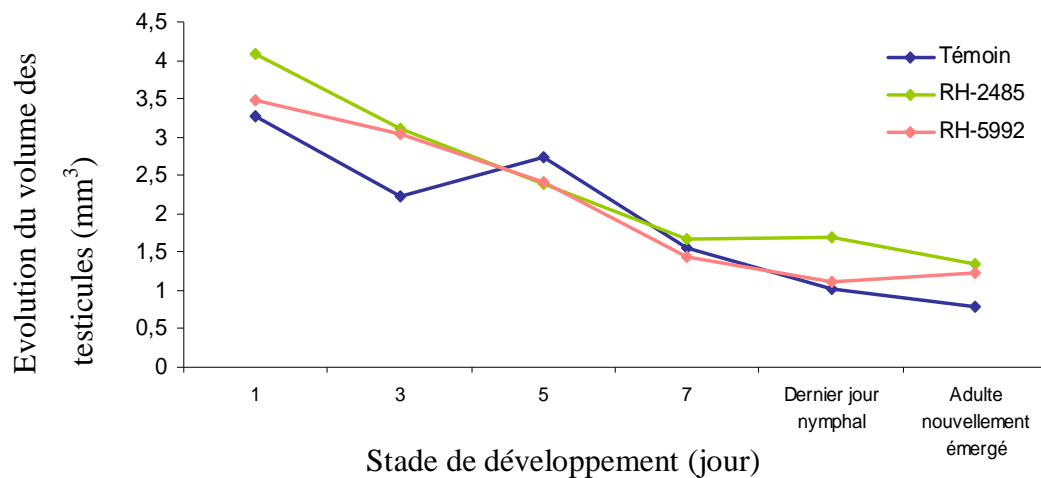


Figure 13. Effets du RH-2485 et RH-5992 après application topique à des chrysalides mâles d'*E. kuehniella* nouvellement exuviées, sur l'évolution du volume ( $\text{mm}^3$ ) des testicules au cours du temps durant le stade nymphal et chez les adultes nouvellement émergés ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n = 10$ ).

### 3.2.2. Effets sur le potentiel reproducteur

Après un suivi régulier des couples, les résultats des différents paramètres de la reproduction sont représentés dans les figures 15, 16, 17.

Dans nos conditions expérimentales (Température 27°C, humidité relative à 80%), la ponte chez *E. kuehniella*, débute à  $1,20 \pm 0,42$  jours après l'émergence des adultes et se poursuit jusqu'à  $3,10 \pm 0,33$  jours pour une production moyenne de  $125 \pm 22,20$  œuf /femelle. Le taux de la fertilité est de  $71, 81 \pm 22,20$  %. Ils révèlent que le traitement effectué sur les chrysalides mâles et femelles présente des effets différés sur les paramètres de la reproduction des adultes qui survivent. En effet, Le RH-5992 allonge la durée de la période de préoviposition mais sans effet significatif ( $p > 0,05$ ). Cependant, les deux insecticides réduisent de manière significative la durée de la période d'oviposition comparativement aux témoins (Fig. 15). On note également une différence significative entre les deux agonistes des ecdystéroïdes testés (témoin vs RH-2485  $p < 0,001$ , témoin vs RH-5992  $p < 0,05$  ; RH-2485 vs RH-5992  $p < 0,05$ ). La fécondité est significativement  $p < 0,001$  réduite (RH-2485 vs RH-5992  $p < 0,001$ ) (Fig. 16). La fertilité est significativement  $p < 0,001$  réduite dans le cas du RH-5992, tandis qu'après traitement avec le RH-2485 la fertilité des oeufs est nulle (RH-2485 vs RH-5992  $p < 0,001$ ) (Fig.17).

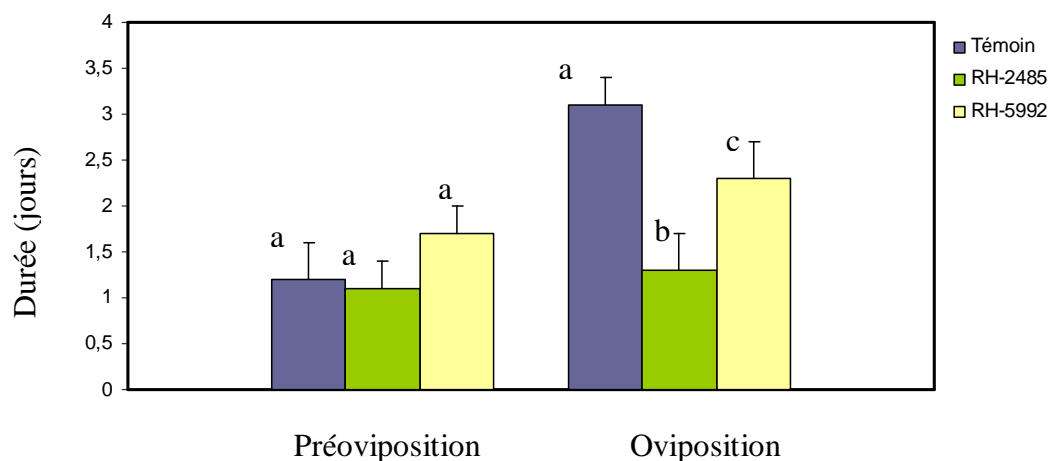


Figure 15. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) sur les périodes de préoviposition et d'oviposition des femelles adultes d'*E. kuehniella* après traitement des chrysalides mâles et femelles ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$  couples, pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

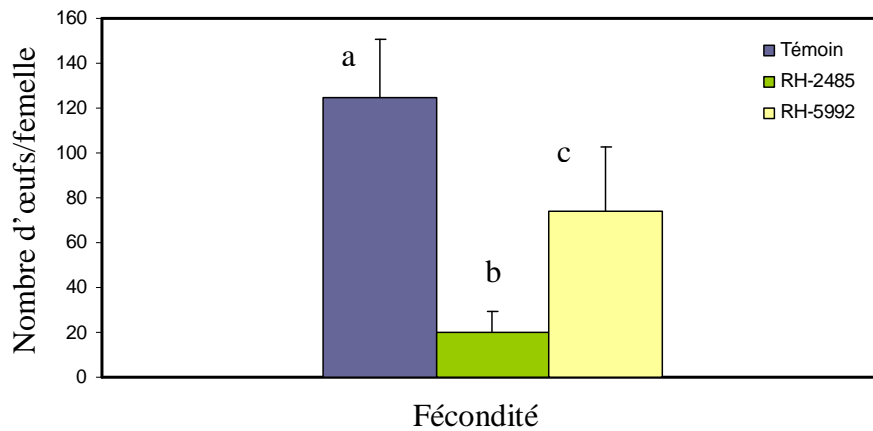


Figure 16. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) sur la fécondité des femelles adultes d'*E. kuehniella* après traitement des chrysalides mâles et femelles ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$  couples, pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

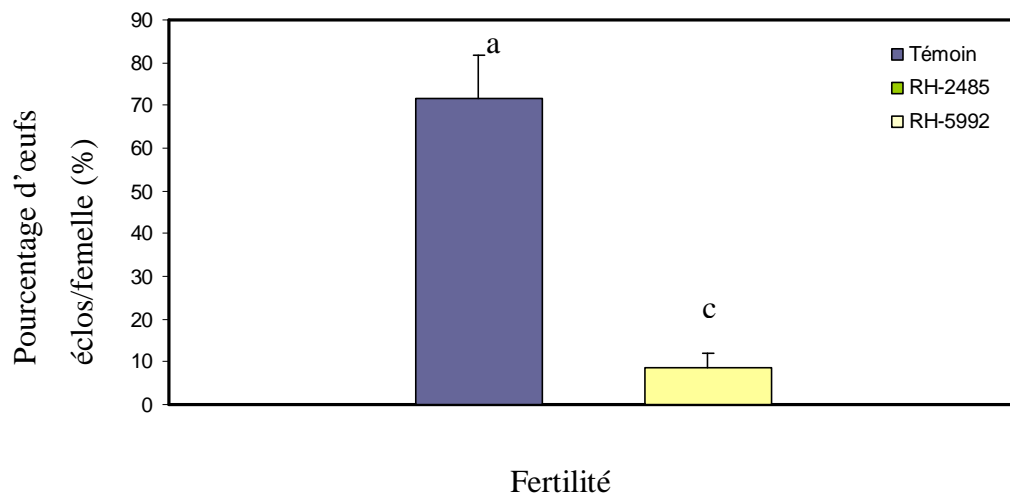


Figure 17. Effets du méthoxyfénozide (RH-2485) et du tébufénozide (RH-5992) sur la fertilité des oeufs des femelles adultes d'*E. kuehniella* après traitement des chrysalides mâles et femelles ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$  couples ; pour les oeufs :  $n = 4$  répétitions chacune comportant 10 oeufs ; pour chaque paramètre les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ )

### 3.2.3. Effets sur les protéines testiculaires

#### \* Effets sur la quantité des protéines

La teneur en protéines a été déterminée au niveau des testicules d'adultes d'*E.kuehniella* chez les témoins et chez les traitées. La quantification a été obtenue à partir d'une courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité des protéines (Tab. 12, Fig.18).

Tableau 12. Gamme d'étalonnage

Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbances	0	0,259	0,378	0,677	1,006	1,193

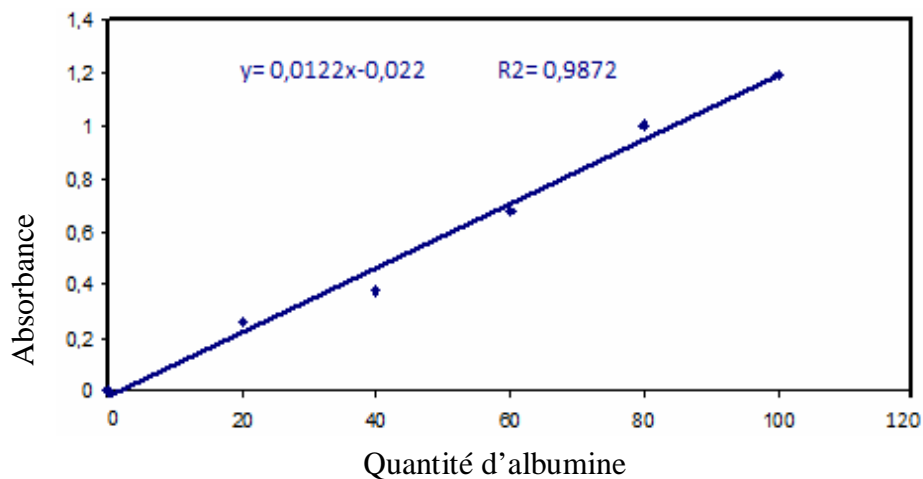
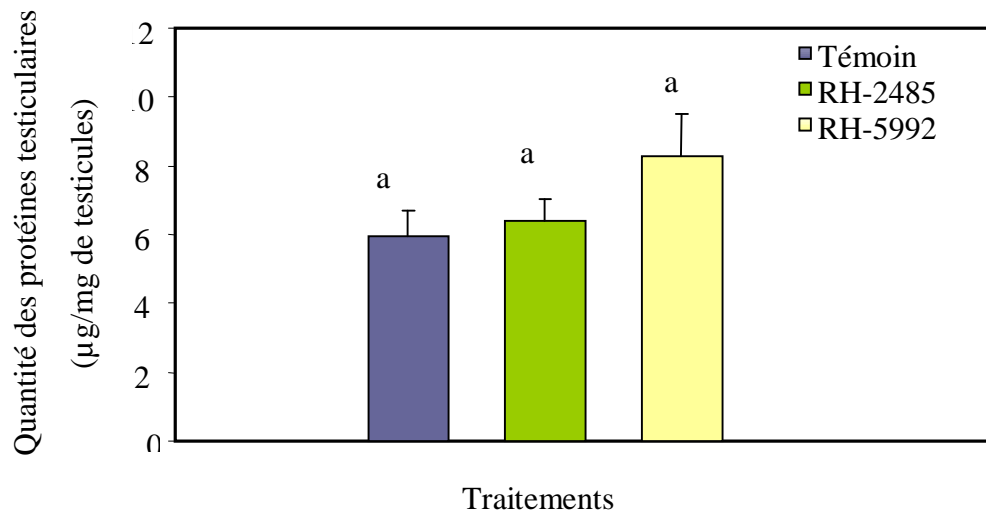


Figure 18. Courbe d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine

La quantité de protéine chez les témoins est en moyenne de  $59,73 \pm 7,43$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de testicules. L'application du RH-2485 et du RH-5992 sur les chrysalides mâles à 0 jour ne montre aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) entre le témoin et les séries traitées (Fig. 19).



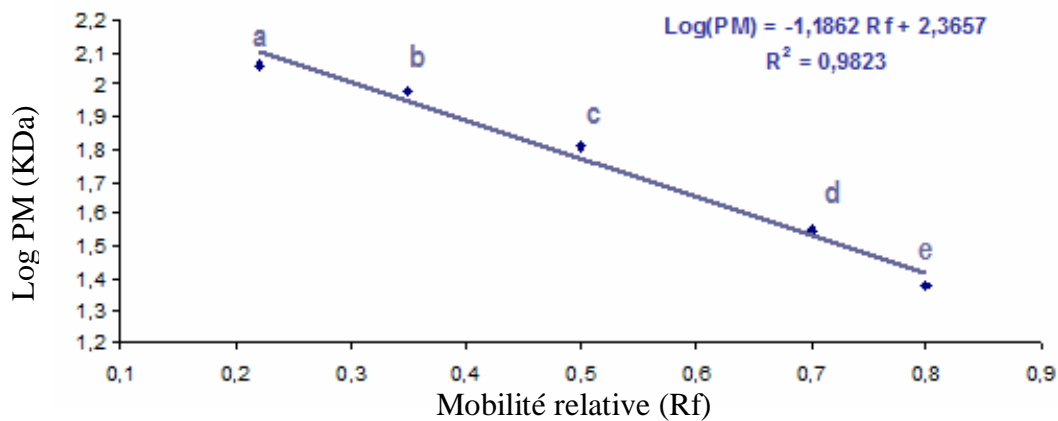
**Figure 19 :** Effets de deux agonistes des ecdystéroïdes (RH-2485, RH-5992) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur la quantité des protéines testiculaires ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de testicules) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n = 3$ ; les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

\* Effets sur la qualité des protéines

L'analyse électrophorétique sur PAGE-SDS des protéines a été réalisée sur les testicules d'adultes d'*E.kuehniella*. Les poids moléculaires des protéines de nos échantillons ont été déterminés d'après une courbe de référence exprimant le logarithme du poids moléculaires des protéines standards en fonction de leur mobilité relative (Rf). (Tab. 13; Fig. 20).

**Tableau 13.** Poids moléculaire et mobilités relatives des fractions protéiques des différentes protéines standards.

Protéines standards	PM (KDa)	Log PM	Rf
B-Galactosidase	116,000	2,06	0,22
Phosphorylase b	97, 000	1,98	0,35
Albumin, bovine serum	66,000	1,81	0,50
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	36,000	1,55	0,70
Trypsinogen	24,000	1,38	0,8

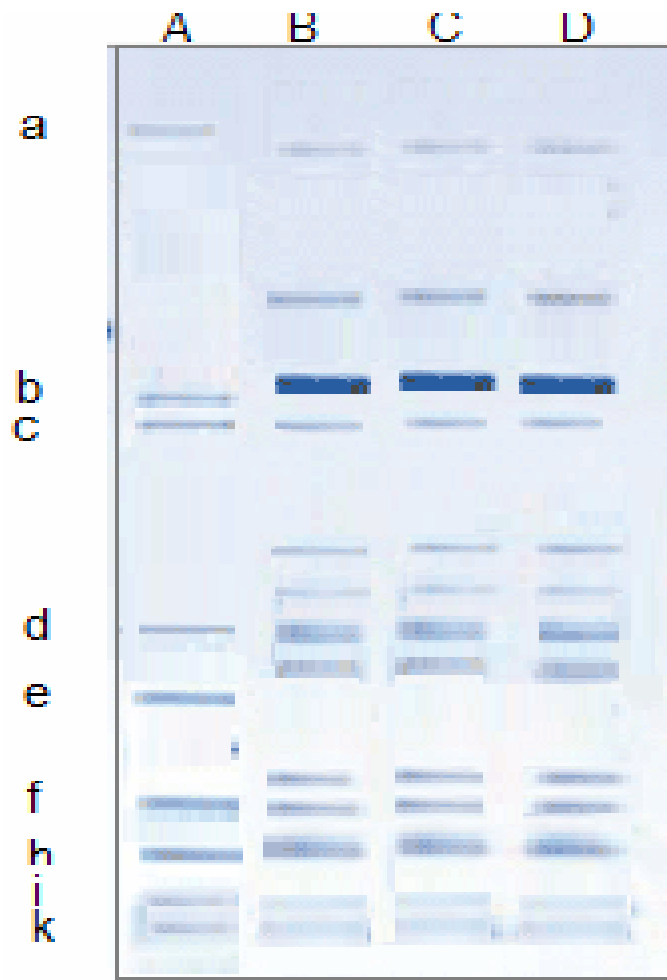


**Figure 20.** Courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (KDa) des protéines standards en fonctions de leurs mobilités relatives (**a** : B-Galactosidase ; **b** : Phosphorylase ; **c** : Albumin ; **d** : Glyceraldehyde ; **e**:Trypsinogen).

Chez *E. kuehniella* les testicules d'adultes non traités comprennent 13 fractions protéiques. Le même nombre a été décelé chez les adultes dont les chrysalides nouvellement exuviées ont été traitées aussi bien par le RH-2485 que par le RH-5992. Le poids moléculaire et la mobilité relative de chaque fraction protéique sont portés sur le tableau 14. Le nombre de fractions protéiques est traduit par la figure 21.

**Tableau 14.** Poids moléculaires et mobilités relatives des fractions protéiques dans les testicules d'adulte d' *E. kuehniella* chez les témoins et les traitées.

Nombres de fraction	Rf	PM (Da)
1	0,07	190,54
2	0,20	131,82
3	0,27	123,02
4	0,30	102,32
5	0,37	85,11
6	0,40	77,62
7	0,46	66,06
8	0,50	58,88
9	0,59	46,77
10	0,62	42,65
11	0,68	36,30
12	0,75	30,19
13	0,80	26,30



**Figure 21.** Profile électrophorétiques des protéines testiculaires d'*E. kuehniella*.

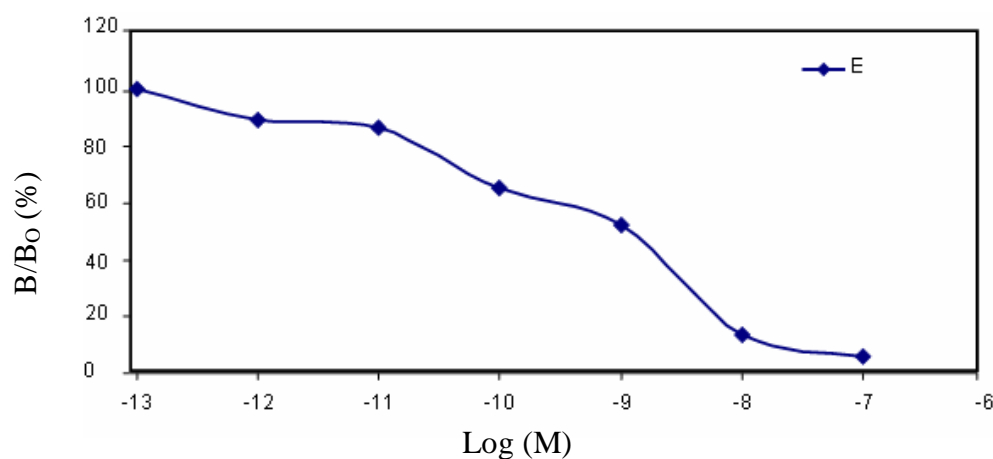
**A** : protéines standards ( **a** : Myosin ; **b** : B-Galactosidase ; **c** : Phosphorylase ;  
**d** : Albumin ; **e** : Glutamic dehydrogenase ; **f** : Ovalbumin ; **h** :Glyceraldehyde ;  
**i** : Carbonic anhydrase ; **k** : Trypsinigen) ; **B**: Témoin ; **C** : RH-2485 ; **D** : RH-5992.

### 3.2.4. Effets sur la production d'ecdystéroïdes testiculaires

Les ecdystéroïdes ont été quantifiés dans les testicules d'*E. kuehniella* à partir de la courbe de référence exprimant le rapport B/B<sub>0</sub> en fonction des logarithmes décimaux des concentrations molaires (M) de l'hormone standard l'ecdysone (Tab. 15, Fig.22).

**Tableau 15.** Analyse quantitative des ecdystéroïdes testiculaires d'*E.kuehniella*. Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) exprimant B/B<sub>0</sub> en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone.

Solution standard	Concentration (M)	B/B <sub>0</sub>
1	10 <sup>-13</sup>	100,2
2	10 <sup>-12</sup>	89,3
3	10 <sup>-11</sup>	87,0
4	10 <sup>-10</sup>	65,6
5	10 <sup>-9</sup>	52,4
6	10 <sup>-8</sup>	13,9
7	10 <sup>-7</sup>	6,2



**Figure 22.** Analyse quantitative des ecdystéroïdes testiculaires d'*E.kuehniella*. Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B<sub>0</sub> en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone.

D'après les résultats obtenus, la quantité d'ecdystéroïdes dans les testicules témoin d'*E. kuehniella* est de  $37,11 \pm 2,80$  pg/mg de testicules soit  $7,01 \pm 0,41$  pg/testicules. Comparativement à ce résultat (Tab. 16), le RH-2485 et le RH-5992 testés sur les chrysalides de cette espèce n'entraînent chez les adultes aucune modification de cette quantité ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 16.** Effets du méthoxyfénoside (RH-2485) et du tébufénoside (RH-5992) en application topique à des chrysalides mâles nouvellement exuviées, sur la quantité des ecdystéroïdes testiculaires ( $m \pm SD$  ;  $n = 4$ ) ; les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes,  $p > 0,05$ ).

Traitements	Quantités d'ecdystéroïdes (pg/mg)	Quantités d'ecdystéroïdes (pg/testicules)
<b>Témoin</b>	$37,11 \pm 2,80a$	$7,01 \pm 0,41a$
<b>RH-2485</b>	$38,83 \pm 5,30a$	$7,09 \pm 1,12a$
<b>RH-5992</b>	$38,64 \pm 8,32a$	$6,82 \pm 1,01a$

### 3.3. Effets du RH-2485 et RH-5992 sur la structure des testicules

L'observation au stéréomicroscope montre que chez les larves d'*E. kuehniella*, il y a une paire de testicules délimités par une membrane péritonéale. Chaque testicule est divisé en quatre follicules de forme sphérique entouré chacun d'une monocouche de cellules épithéliales et séparés les uns des autres par des cloisons épithéliales. Au moment de la maturité sexuelle, les quatre follicules de chaque testicule fusionnent formant un seul testicule (Fig.23 A, B). L'observation au microscope photonique des coupes semi fines réalisées à partir d'une coupe longitudinale sur les testicules d'adultes d'*E.kuehniella*, montre chez les témoins un follicule rempli de cystes jointifs présentant des formes polyédriques et allongées (Fig.24 A). Ces formes pourraient être liées à la maturation des cellules germinales. Au niveau des testicules d'adultes traités au stade nymphal avec le RH-2485 et le RH-5992, l'observation au microscope photonique révèle l'absence de cystes de forme allongée. Seuls les cystes de forme sphérique et quelques cystes de forme polyédrique sont présents de manière éparpillée. (Fig.24 B, C).

## 4. Discussion

### 4.1 Effets sur le développement nymphal

Les ecdystéroïdes exercent leurs effets sur les tissus cibles via l'interaction avec les récepteurs nucléaires EcR qui forment un hétérodimère avec la protéine ultraspiracle USP (Yao *et al.*, 1992 ; Bonneton *et al.*, 2003 ; Henrich, 2005). 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 (Chen *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2007) qui code pour la division des cellules épidermiques, la sécrétion du fluide exuvial, la digestion cuticulaire, la synthèse de la cuticule et l'épicuticule, la synthèse de l'hormone d'éclosion au niveau des cellules neurosécrétrices ventro-médiales ainsi que son stockage dans les nerfs proctodéales. Durant la phase descendante du pic de la 20E, une autre série de gènes « down regulated genes » s'exprime, permettant ainsi la libération de l'hormone d'éclosion et la sclérotisation (Retnakaran *et al.*, 2003) (Fig.25).

Une analyse quantitative des ecdystéroïdes au cours du stade nymphal a révélé la présence d'un pic situé au 5<sup>ème</sup> jour chez différents ordres d'insectes : *Ephestia kuehniella* (El Ouar *et al.*, 2010 ; Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011) ; *Zophobas atratus* (Aribi *et al.*, 1999) ; *Tenebrio molitor* ( Soltani *et al.*, 2002 ; Aribi *et al.*, 2006 ; Berghiche *et al.*, 2007) et qui coïncide avec la synthèse de la cuticule pré-exuviale adulte (Maamcha, 1997 ; Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011).

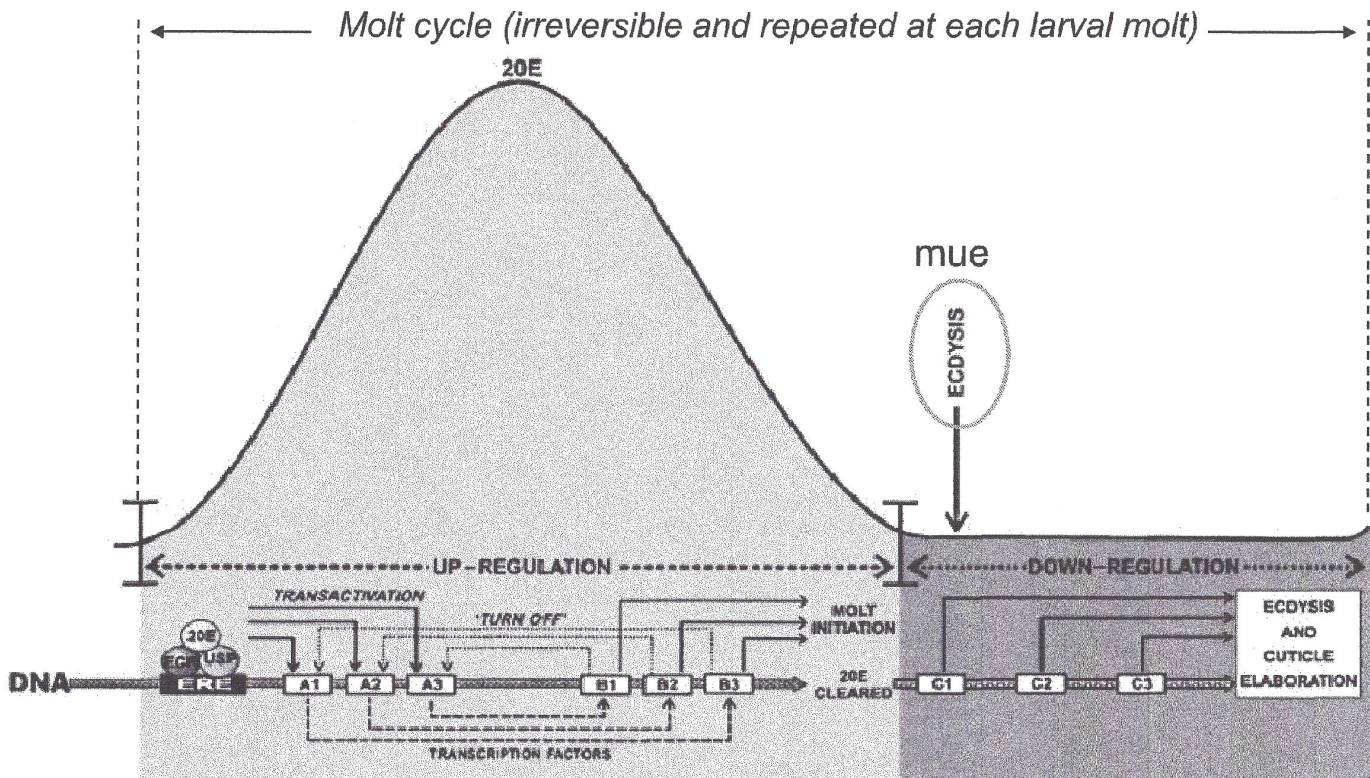
Plusieurs travaux ont démontré que l'administration des agonistes d' ecdystéroïdes chez des larves ou des chrysalides appartenant à différents ordres d'insectes induit des mues précoces et incomplètes (Hami *et al.*, 2005 ; Dhadialla *et al.*, 2005 ; Gelbic *et al.*, 2011). Le degré d'efficacité des agonistes d'ecdystéroïdes a été publié par Doucet *et al.* (2007). (Tab. 17)

Nos expérimentations sur *Ephestia kuehniella* ont mis en évidence une perturbation du développement nymphal par le RH-2485 et le RH-5992 avec une réduction de la durée du stade nymphal et l'induction de plusieurs types morphogénétiques. Les chrysalides

femelles d'*E. kuehniella* sont plus sensibles aux traitements que les chrysalides mâles avec une durée moyenne de  $8,3 \pm 0,8$  jours après traitement avec le RH-2485 et de  $6,7 \pm 0,4$  jours après traitement avec le RH-5992, comparativement aux témoins qui est de  $11,1 \pm 0,7$  jours. L'effet est plus marqué avec le RH-5992. Ceci confirme les observations antérieures faites sur *E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005) et chez d'autres lépidoptères (Dhadialla *et al.*, 2005 ; Hami *et al.*, 2005; Dhadialla & Ross, 2007). Cependant le traitement avec ces deux agonistes des ecdystéroïdes entraîne l'observation de quatre différents types morphogénétiques aussi bien chez les mâles que chez les femelles. La DL50 du RH-2485 et du RH-5992 déterminées précédemment par Soltani-Mazouni *et al.*, (2012) et Hami *et al.*, (2005) utilisées dans cette étude donne une émergence bloquée pour 68,75 % des chrysalides mâles traitées avec le RH-2485 et 50% d'émergence bloquée après traitement des chrysalides mâles avec le RH-5992. Ceci confirme que le RH-2485 est plus toxique que le RH-5992 (Smagghe *et al.*, 2002).

Des travaux antérieurs ont démontré que l'administration du RH-5992 Chez les larves du dernier stade de *Chrysodeixis chalcites*, a provoqué prématurément l'apolyse après 12h de traitement et l'induction de deux cuticules séparées par un espace ecdysial. (Smagghe *et al.*, 1997). Des effets similaires ont été observés chez les larves de *Cydia pomonella* 24h après traitement avec le RH-5992 (Smagghe *et al.*, 2004) et chez d'autres Lépidoptères (Dhadialla *et al.*, 1998; Smagghe *et al.*, 2003). Des travaux similaires montrent que chez les larves de *Seamia nonagrioides*, le traitement par le RH-2485 provoque l'induction de deux cuticules pendant l'apolyse et la mort de la larve par la suite (Eizaguirre *et al.*, 2007). Ainsi chez *Plodia interpunctella*, le RH-5849 et la 20E stimulent de façon similaire la synthèse de la chitine du disc imaginal (Silhacek *et al.*, 1990 ; Smagghe & Degheele, 1995; Smagghe *et al.*, 1996a,b).

Plusieurs études ont démontré que les changements morphologiques et structuraux induits par le tébufénozide dans les premières étapes de la mue sont identiques à ceux observés en présence d'ecdysone (Smagghe *et al.*, 1996b; Retnakaran *et al.*, 1997a; Smagghe *et al.*, 2004).



**Figure 25.** Schematic model of molt regulation by 20E (Retnakaran *et al.*, 2001).

**20E:** 20-hydroxyecdysone; **EcR:** Ecdysone receptor; **USP:** ultra spiracle; **ERE:** Edysone Response Element; **A1-3:** transcription factors; **B1-3:** genes activated by A1-3; **C1-3:** genes expressed in the absence of 20E.

Comme leur nom l'indique "Moulting Accelerating Compounds " le RH-2485 et le RH-5992 accélèrent l'activation des gènes codant pour des protéines cuticulaires et la mise en place de la nouvelle cuticule (Dhadialla *et al.*, 1998, 2005). Ce qui explique la réduction de la durée du développement nymphal chez les femelles et les mâles d'*E. kuehniella* qui ont survécu au traitement. Toutefois, les processus physiologiques nécessitant une chute d'ecdysone tels, la sclérotisation et l'ecdysse (Retnakaran *et al.*, 2003) sont clairement absents chez les chrysalides qui n'ont pas survécu au traitement. Les chrysalides sont alors partiellement exuvées ou bloquées avec un corps peu ou pas tanné et mortes par la suite. Des pupes létales et mal formées ont été aussi observées chez *Spodoptera frugiperda* après traitement par voie orale par le RH-2485 au 5<sup>e</sup> stade larvaire (Zarate *et al.*, 2011). L'observation au microscope électronique à balayage révèle l'absence de sclérotisation et du tannage de la nouvelle cuticule chez la larve de *C. pomonella* 24h après traitement avec le RH-5992 (Smaghe *et al.*, 2004). Il a été démontré que ce phénomène s'explique par la stabilité métabolique et la persistance du tébufénozide dans les tissus des larves chez plusieurs espèces (Smaghe & Degheele, 1994 ; Smaghe *et al.*, 2001). Selon Dhadialla *et al.* (1998) le tébufénozide maintient l'activation des gènes codant pour les événements précoces, empêchant ceux codant pour les étapes suivantes. Dans notre expérimentation, l'incapacité des chrysalides mâles et femelles d'*E. kuehniella* traitées avec le RH-5992 et le RH-2485 à s'exuvier pourrait être dû à l'inhibition de la libération de l'hormone d'éclosion par la persistance de ces agonistes de l'hormone de mue dans l'organisme de ces derniers.

Parmi les perturbations morphologiques induites par le traitement dans la présente étude, le RH-2485 induit des adultes malformés avec des malformations alaires. Les mêmes effets ont été observés après traitement avec le RH-2485 et le RH-5992 chez différents ordres d'insectes : *Heliothis zea* (Chandler *et al.*, 1992), *Diatraea grandiosella* (Trisyono & Chippendale 1998), *Spodoptera exigua* (Carton *et al.*, 1998), *S. littoralis* (Pineda *et al.*, 2004). Ces malformations ont été observées chez *Choristoneura fumiferana* avec une incapacité d'accouplement et de ponte après injection du RH-5992 aux chrysalides (Sundaram *et al.*, 2002). Les mêmes effets ont été observés au 1<sup>er</sup> et 3<sup>e</sup> stade larvaire chez *Platynota idaeusalis* traité avec le RH-5992 (Biddinger *et al.*, 2006). Cependant, l'efficacité du RH-5992 varie selon le moment d'administration par voie orale chez les larves de *C. fumiferana* (Dhadialla *et al.*, 1998). En effet, quand le RH-5992 est administré aux larves du cinquième et sixième stade avant le pic d'ecdystéroïdes initiant la mue, il induit 100 % de mues létales et, quand il est ingéré plus tard après le pic, on obtient

90 % de mues normales qui seront suivies par d'autres mues incomplètes et létales. Sundaram *et al.* (2004) ont rapporté que l'injection du RH-5992 directement dans la chrysalide diminue le pouvoir fécondant des femelles lorsque ces dernières avaient des malformations importantes. Les adultes qui survivent au traitement peuvent ainsi être stériles (Sundaram *et al.* 2002) ou posséder des organes génitaux anormalement développés, ce qui entrave le processus de l'accouplement ou la capacité de produire une descendance fertile (Tunaz & Uygun, 2004).

#### **4.2 Effets sur la morphométrie des testicules**

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 (Smagghe & Degheele, 1994 ; Soltani *et al.*, 1998 ; Farinos *et al.*, 1999 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2001 ; Dallaire *et al.*, 2004 ; Lafont *et al.*, 2005 ; Sridhara *et al.*, 2013) . Cependant l'étude des testicules a fait l'objet de quelques travaux : (Perveen, 2000 ; Mathew & Thanuja, 2008 ; Özyurt *et al.*, 2013).

Des travaux réalisés sur les femelles d'*E. kuehniella* montrent que les agonistes des ecdystéroïdes : le RH-2485, le RH-5992 et le RH-0345 diminuent le poids des ovaires, l'épaisseur du chorion, le nombre, la taille et le volume de l'ovocyte basal (Hami *et al.*, 2005, Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). Cependant l'évaluation des effets des agonistes d'ecdystéroïdes sur la morphométrie des testicules d'*E. kuehniella* n'a pas été étudiée.

Dans notre travail l'étude de la morphométrie des testicules d'*E. kuehniella* chez les témoins et chez les traités avec le RH-2485 et le RH-5992 a apportée des informations supplémentaires sur l'efficacité de ces agonistes de l'hormone de mue.

La morphométrie des testicules au cours du temps a été déterminée durant le stade nymphal et à l'âge adulte. La taille testiculaire chez les témoins est élevée au début du stade nymphal (chrysalides de 1 jour : 24h précisément après exuviation nymphale) ; elle est approximativement d'une longueur (L) de  $2008 \pm 328,7 \mu\text{m}$  ; une largeur (l) de  $1768 \pm 249,0 \mu\text{m}$  et un volume (v) de  $3.2 \pm 0.0 \text{ mm}^3$ . Cette élévation de taille correspond à la fusion des testicules juste au moment de l'exuviation. Ce résultat est en accord avec ceux des travaux réalisés précédemment sur *E. kuehniella* (Nowock, 1973). En effet la fusion

des testicules est sous la dépendance de l'hormone ecdystéroïde. Chez *S.littura* elle coïncide avec l'augmentation des ecdystéroïdes testiculaires (Perveen *et al.*, 2011). La taille des testicules tend à diminuer légèrement jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour, elle augmente ensuite jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour pour diminuer progressivement jusqu'à l'émergence des adultes. Ce profile de taille évoluant de manière oscillatoire coïncide avec un profile ecdystéroïde enregistré dans le corps entier d'*E. kuehniella* (Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011) et dans les testicules d'autres Lépidoptères (Fugo *et al.*, 1996 ; Perveen *et al.*, 2011 ; Polanska *et al.*, 2009 ; Iga & Smagghe, 2010 ; Iga *et al.*, 2013) montrant que la quantité d'ecdystéroïde dans l' hémolymph et dans les testicules augmente dès le 3<sup>ème</sup> jour nymphal pour atteindre un pic au 5<sup>ème</sup> jour, elle diminue progressivement par la suite. Il a été rapporté que l'augmentation d'ecdystéroïdes est corrélée à une intensification de la spermatogenèse (Witalis & Godulat, 1993) et simultanément à l'augmentation de la taille des testicules (Perveen *et al.*, 2011).

L'application de l'agoniste d'ecdystéroïde le RH-2485 et le RH-5992 sur les chrysalides mâles d'*E. kuehniella* nouvellement exuviées ne manifeste aucune modification significative sur la fusion et la taille des testicules au jour 1 par rapport aux témoins. La taille est supérieure à celle des témoins mais non significative. Il a été démontré que l'injection du RH-5992 entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> segment larvaire à abdomen isolé de la glande prothoracique stimule la fusion des testicules chez *Cydia pomonella* (Friedlander & Brown, 1995). La taille des testicules chez les chrysalides traitées avec le RH-2485 et le RH-5992 suit du jour 1 au jour 3 le même profile que chez les témoins. Au jour 5, une différence non significative marquée par une absence d'une augmentation de taille est ensuite observée chez les deux traitées par rapport aux témoins. En effet, leur taille testiculaire continue de diminuer du jour 1 jusqu'au jour 7. Chez *S.littura* la diminution de la taille des testicules avec le chlorfluazuron (un inhibiteur de la synthèse de la chitine) résulterait de la diminution de la quantité d'ADN testiculaire durant le stade nymphal (Perveen, 2000b). Dans notre travail la diminution de la taille des testicules au jour 5 chez les traités serait due à une à une réduction de la spermatogenèse. A partir du jour 7, une différence statistiquement non significative a été notée entre les deux traitées. En effet avec le RH-2485 la taille augmente légèrement du jour 7 au dernier jour nymphal, elle diminue ensuite à l'age adulte, alors qu'avec le RH-5992 la taille continue à diminuer jusqu'au dernier jour nymphal, pour augmenter par la suite à l'age adulte. La taille des testicules chez les deux traités est significativement supérieures ( $p < 0,001$ ) à celle des témoins. Cette

différence pourrait s'expliquer par le fait que chez *E. kuehniella* l'émission des spermatozoïdes du testicule vers le canal déférent arriverait deux jours avant l'émergence adulte dans un rythme journalier (Riemann *et al.*, 1974). Ce rythme a été observé chez *S. littoralis* (Giebultowiz *et al.*, 1999 ; Giebultowize & Bebas, 2005 ; Polanska *et al.*, 2009). Polanska *et al.* (2009) a rapporté que ce rythme est contrôlé par un facteur oscillateur endogène circadien localisé dans les testicules et, est essentiel pour la fertilité des mâles. Les mêmes auteurs ont rapportés également qu'un jour avant l'émission des spermatozoïdes, les ecdystéroïdes hémolymphatiques et testiculaires commencent à osciller dans un style circadien. Au moment de la diminution de cette hormone, l'émission des spermatozoïdes est stimulée. Il a été révélé ainsi que l'injection de la 20E dans la pupa de *S. littoralis* avant l'initiation de l'émission des spermatozoïdes, retarde celle-ci. Selon Seth *et al.* (2004), le traitement par RH-5992 et RH-5849 des larves de *S. littura* retarde l'émission des spermatozoïdes vers le canal déférent et perturbe le transfert des spermatozoïdes vers la vésicule séminale. Aussi, l'application du chlorfluazuron au cinquième stade larvaire chez *S. littura* diminue significativement le transfert des spermatozoïdes du testicule via le canal déférent vers la vésicule séminale traduisant ainsi une augmentation de la quantité d'ADN testiculaire (Perveen *et al.*, 2011). Il a été rapporté que chez *E. kuehniella*, l'injection de la 20E ou son analogue inhibe l'émission des spermatozoïdes du testicule vers le canal déférent (Thomson & Riemann, 1982). Chez la même espèce l'application topique du RH-2485 et du RH-5992 sur les chrysalides mâles nouvellement exuviées diminue et augmente respectivement la quantité d'ADN testiculaire chez les adultes (Bouzeraa, 2010). Dans notre travail il se peut que le RH-2485 ait bloqué la libération des spermatozoïdes des testicules vers le canal déférent du jour 7 au dernier jour nymphal entraînant alors l'augmentation de la taille des testicules par rapport aux témoins, et que la libération des spermatozoïdes se fera à l'émergence des adultes. Alors que le RH-5992 aurait inhibé la libération des spermatozoïdes plus tard à l'émergence des adultes, expliquant l'absence d'effet sur la fertilité des œufs (Bouzeraa, 2010).

Le traitement par le RH-2485 appliqué au sixième stade larvaire et aux chrysalides nouvellement exuviées chez *Spodoptera mauritia* ne provoque par contre aucun changement de la taille des testicules chez les adultes (Mathew & Thanuja, 2008).

Récemment, un changement de la taille des testicules d'adultes chez *Graphosoma lineatum* après traitement avec le pyriproxyfen a été observé (Özyurt *et al.*, 2013).

### 4.3 Effets sur le potentiel reproducteur

La reproduction dépend de la physiologie des animaux, de la quantité de la nourriture et de divers autres facteurs de l'environnement. Elle met en jeu de nombreux mécanismes physiologiques qui permettent la localisation, la reconnaissance du partenaire sexuel et l'accouplement entre deux individus de la même espèce afin d'engendrer des descendances viables et fertiles (Weaver Mc Farlane, 1990). Un choix judicieux du partenaire sexuel est donc une étape cruciale dans la mesure où un mauvais choix peut entraîner une baisse du potentiel reproducteur de la femelle et la production d'une descendance aux faibles potentialités biotiques.

Plusieurs facteurs abiotiques peuvent affecter le succès de la reproduction tels que l'humidité relative (Webster & Cardé, 1982; Royer & McNeil, 1991), la température (Landolt & Curtis, 1982; Delisle & McNeil, 1987; Delisle, 1992) et l'absorption d'hormones exogènes ou d'analogues de synthèse (Dallaire *et al.*, 2004; Dhadialla *et al.*, 2005 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009).

Les effets des analogues de l'hormone de mue sur la reproduction proprement dite ont été largement étudiés. Ils se sont avérés très variables suivant le stade de développement, le moment du traitement ou la méthode de traitement utilisée (Dallaire *et al.*, 2004).

Il est important de mentionner que les analogues de l'hormone de mue affectent le potentiel reproducteur des deux sexes. En effet, des études réalisées chez plusieurs espèces appartenant à différentes familles (Crambidae, Noctuidae, Pyralidae et Tortricidae) ont démontré que le RH-2485 et le RH-5992 réduisent la fécondité (nombre d'oeufs pondus) (Smagghe *et al.*, 1996c; Biddinger & Hull, 1999; Knight, 2000; Rodriguez *et al.*, 2001 ; Hami, 2005 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012), ainsi que la fertilité tant chez les femelles (Charmillot *et al.*, 1994; Smagghe & Degheele, 1994; Knight, 2000, Soltani-Mazouni *et al.*, 2012) que chez les mâles (Carpenter & Chandler, 1994; Sun *et al.*, 2000 ; Bouzeraa, 2010 ; Meskache & Soltani-Mazouni, 2013).

Dans notre étude le traitement à la fois des chrysalides mâles et femelles avec les deux insecticides affecte les paramètres de la reproduction d'*E. kuehniella*. Le RH-2485

provoque des effets significativement plus marqués sur la durée de la période d'oviposition, la fécondité et la fertilité, comparativement au RH-5992. De plus le RH-2485 cause la létalité de tous les œufs.

Des travaux antérieurs ont montré que le traitement des chrysalides femelles seules d'*E. kuehniella* avec le RH-2485 et le RH-5992 affecte la période d'oviposition, la fécondité et la fertilité (Hami, 2005 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012 ). Chez *S. litura*, le traitement par voie orale avec le RH-2485 au 2<sup>ème</sup> (L2) et 5<sup>ème</sup> (L5) stade larvaire réduit significativement la fécondité et la fertilité des femelles (Shahouti *et al.*, 2011). L'effet est similaire chez *C. pomonella* (Sun & Baret, 1999), *S. littoralis* (Pineada *et al.*, 2009) ; *Lobesia botrana* (Saenz-de-Cabezón *et al.*, 2005). Pineada *et al.* (2007) ont rapporté que le RH-2485 réduit d'une manière dose-dépendante, la fécondité et la fertilité des femelles de *S. littoralis*. Christian-Luis *et al.* (2010) montrent seulement une diminution de la fertilité chez *S. exigua*. Chez *C. pomonella*, l'application du RH-2485 juste avant la ponte réduit la fécondité (Bylemans *et al.*, 2003). Par ailleurs , les travaux menés par Rodriguez *et al.* (2010) sur les femelles de *S. littoralis* montrent que l'administration du RH-2485 (DL-25) par ingestion aux larves du troisième stade provoque une réduction importante de la fertilité des œufs. Selon Charmillot, (2001), le RH-2485 exerce un effet ovicide et serait responsable de la diminution de la fertilité (Trisyano & Chippendale, 1997; 1998).

Chez les insectes adultes, les ecdystéroïdes sont synthétisés par les cellules folliculaires (Delbecq *et al.*, 1990 ; Telfer, 2009) et jouent un rôle dans le développement des ovaires, l'ovogenèse et la vitellogénèse (Nijhout, 1994). En effet l'augmentation des ecdystéroïdes libres dans les ovaires d'*E. kuehniella* après traitement avec le RH-2485 (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012) suggère une réduction de la fécondité via une interférence de l'insecticide avec la vitellogénèse et son contrôle endocrine d'où une diminution du nombre des ovocytes après traitement avec le RH-5992 et RH-2485 par rapport aux témoins. Smagghe & Degheele (1994) et Smagghe *et al.* (1996a) ont rapporté que ces agonistes d'ecdysone peuvent avoir un effet chémostérilisateur sur l'oviposition et sur l'ovulation, causant une réabsorption des ovarioles (Salem *et al.*, 1997). Egalement, Smagghe & Degheele (1994c) ont suggéré que les analogues de l'ecdysone affectaient le processus de l'ovulation en bloquant la libération de l'hormone d'ovulation myotropique (myotropic ovulation hormone) par les cellules neurosécrétrices qui sont normalement activées par un déclin du titre des ecdystéroïdes (Hagedorn, 1985).

Récemment d'autres expérimentations ont été réalisées avec d'autres régulateurs de croissance, analogues de l'hormone juvénile chez *Mustica domestica*. En effet, le traitement par le Diofenolan a provoqué une réduction de leur fécondité et de la fertilité de leurs œufs (Pezzi & Leis, 2011). Les mêmes auteurs ont démontré que la réduction est plus élevée pendant le deuxième et le troisième cycle gonadotrophique. En effet l'observation microscopique montre une dégénérescence des cellules folliculaires secondaires et tertiaires, ainsi qu'une diminution du contenu en ecdystéroïdes ovarien. De plus dans ces conditions les femelles apparaissent avec un abdomen anormal de forme enfilée et un ovipositeur allongé, comparativement aux témoins.

Une réduction de la fécondité et de la fertilité a été aussi observée après traitement avec le neem (une formulation commerciale d'extrait de neem) chez *B. cucurbitae* et *B. dorsalis* (Khan *et al.*, 2007). Le traitement avec le lufenuron (inhibiteur de la synthèse de la chitine) cause une létalité de tous les œufs chez *B. oleae* et *C. capitata*. (Sanchez-Ramos *et al.*, 2011)

Concernant le traitement seul des chrysalides mâles d'*E. kuehniella*, le RH-2485 a provoqué une diminution de la fertilité (Bouzeraa, 2010). Sun & Barrett (1999) ont montré une diminution de la fécondité chez *C. pomonella* lorsque les mâles sont traités avec le RH-2485. En plus de la persistance du RH-2485 dans les œufs de la femelle traitée, le RH-2485 affecte également les spermatozoïdes d'où l'absence d'œufs fertiles (Carpenter & Chandler, 1994). Selon Hewa-Kapuge *et al.* (2003) le RH-2485 augmente la stérilité des œufs après traitement des mâles de *Trichogramma brassicae*. Dans d'autres travaux le RH-5992 semble avoir un effet similaire, il diminue la fécondité chez différentes espèces : *Platynota idaeusalis* (Biddinger *et al.*, 2006), *C. rosaceana* (Dallaire *et al.*, 2004), *C. funefurana* (Sundaram *et al.*, 2002) ; *S. littoralis* (Gelbic *et al.*, 2011).

Chez les Lépidoptères, les ecdystéroïdes régulent la production de deux types de spermatozoïdes, les eupyrènes nucléés qui fertilisent l'œuf et les apyrènes anucléés qui jouent un rôle d'assistance (Osanai *et al.*, 1987 ; Friedlander, 1997). Sur les mâles de *C. rosaceana*, l'injection de l'agoniste d'ecdystéroïdes le RH-5992 dans le 5<sup>ème</sup> stade larvaire réduit la masse du spermatophore, son contenu en eupyrènes ainsi que le nombre d'eupyrènes dans la spermathèque des femelles (Dallaire *et al.*, 2004). Selon Seth *et al.*, (2004) le traitement des larves de *S. littura* avec le RH-5849 et le RH-5992 retarde

l'initiation de l'émission des spermatozoïdes, diminue le nombre des spermatozoïdes et interfère dans le transfert des spermatozoïdes vers la vésicule séminale. Carpenter et Chandler (1994) ont également rapporté que le RH-5992 prévenait le transfert des spermatozoïdes eupyrènes lors de la copulation chez *H. zea*. Selon Smagghe *et al.* (2004), l'oviposition et la fertilité des oeufs sont moins affectés quand les mâles de *C. pomonella* sont traités avec le RH-5992.

Par ailleurs il a été rapporté que chez *E. kuehniella*, le RH-5992 prolonge la période de préoviposition après traitement des mâles (Bouzeraa, 2010) sans aucune répercussion sur le succès d'accouplement. Des résultats similaires montrent que l'oviposition et la fertilité n'ont pas été affectées quand les mâles de *C. funefurana* sont traités avec le RH-5992 (Dallaire *et al.*, 2004). L'exposition des mâles de *C. pomonella* et de *Grapholita molesta* au RH-2485 réduit leur capacité à répondre à l'appel des femelles (Hoelscher & Barrett, 2003; Reinke & Barrett, 2007; Barrett, 2008). Selon Barrett (2003), la capacité des mâles à répondre à l'appel des femelles est plus affectée après traitement des femelles avec un agoniste des ecdystéroïdes, par inhibition de son activité locomotrice. Alors que le traitement des femelles d'*E. kuehniella* avec le RH-5992 diminue la période d'oviposition, la fécondité et la fertilité des œufs après un prolongement de la période de préoviposition (Hami, 2005). A cet égard, des effets neurotoxiques des agonistes des ecdystéroïdes ont été rapportés (Saldago, 1992) et sont à l'origine du retard observé sur le comportement d'appel des femelles et sur la capacité des mâles à répondre à l'appel (Dallaire *et al.*, 2004). Dans le présent travail, le traitement à la fois des chrysalides mâles et femelles avec le RH-5992 prolonge légèrement mais non significativement la période de préoviposition.

Ces résultats confirment largement que les agonistes de l'hormone de mue affectent le système reproducteur mâle et femelle. Ainsi l'application simultanée du RH-2485 aux chrysalides males et femelle d'*E. kuehniella* donne une réduction plus importante de la fécondité et la létalité de tous les œufs comparativement aux résultats des travaux réalisés par Soltani-Mazouni *et al.* (2012) et Bouzeraa (2010) respectivement sur les femelles et les mâles de la même espèce traités séparément.

#### 4.4 Effets sur les ecdystéroïdes testiculaires

Chez les insectes, les testicules peuvent agir comme une glande endocrine en libérant les ecdystéroïdes durant le stade larvaire, pupal et adulte (Polanska *et al.*, 2009). Chez *Heliothis virescens* les ecdystéroïdes sont synthétisés dans la gaine testiculaire (Loeb, 1986). Il a été rapporté que la synthèse et la libération des ecdystéroïdes par les testicules sont stimulées par des neurohormones, ecdysiotropine et ecdystéroïdes de la glande prothoracique et des testicules (Loeb *et al.* 1984, 1988).

Les ecdystéroïdes testiculaires sont importants dans le développement et la maturation du système reproducteur et jouent un rôle important dans la spermatogenèse. Plusieurs travaux ont montré que l'ecdystéroïde le plus commun synthétisé dans les testicules des insectes est la 20-hydroxyecdysone (20E). Il a été ainsi rapporté chez *Lymantria dispar* (Loeb *et al.*, 1988) ; *Mamestra brassicae* (Shimizu *et al.*, 1985) ; *H. virescens* (Loeb *et al.*, 1982, 1984) ; *Bombyx mori* (Fugo *et al.*, 1996) ; *Rhodnius prolixus* (Vafopoulou & Steel, 2005) ; *S. littoralis* (Polanska *et al.*, 2009, Masatoshi *et al.*, 2013). La 20-hydroxyecdysone est considérée comme nécessaire pour les mitoses, le développement des spermatozoïdes, la fusion des testicules et la maturation du tractus génital chez les lépidoptères (Nowock, 1972, 1973).

Chez *E. kuehniella* la quantification des ecdystéroïdes synthétisés par les testicules d'adultes témoins et traités avec le RH-2485 et le RH-5992 montre que la présence des agonistes d'ecdystéroïdes dans le corps d'*E. kuehniella* n'a pas perturbé significativement la quantité d'ecdystéroïdes produite par les testicules, ceci malgré une légère augmentation chez la série traitée avec le RH-2485. Récemment chez la même espèce, l'application d'enalapril (un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) aux chrysalides mâles nouvellement exuviées a diminué la quantité d'ecdystéroïdes dans les testicules d'adultes (Bensalem & Soltani-Mazouni, 2013). Chez les mâles de *S. littura* le chlorfluazuron (un inhibiteur de la synthèse de la chitine) il a diminué également la quantité d'ecdystéroïde dans les testicules d'adulte (Perveen *et al.*, 2011). Selon Perveen *et al.* (2000b) cette réduction a été responsable de la réduction des différents paramètres de la spermatogenèse et du développement testiculaire.

Les travaux réalisés sur les femelles d'*E. kuehniella* montrent que la quantité d'ecdystéroïde dans les ovaires est augmentée après traitement avec le RH-2485 (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012) et le RH-5992 (Hami *et al.*, 2005). Des travaux antérieurs faits avec d'autres régulateurs de croissance signalent le même effet chez les femelles d'*E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005) et *Tenebrio molitor* (Soltani *et al.*, 2002 ; Taibi *et al.*, 2003). Des expérimentations réalisées *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 chez les témoins et chez les traités après administration du halofenozide (RH-0345). Cependant l'enalapril n'a pas affecté la quantité d'ecdystéroïde dans les ovaires de la même espèce (Bensalem & Soltani-Mazouni, 2013).

Chez les Lépidoptères, la compétence des glandes accessoires à produire des protéines chez l'adulte nécessite une hausse des titres des ecdystéroïdes au stade pupal (Sridevi *et al.*, 1988; Shinbo & Happ, 1989). Selon Tozetto *et al.* (2007) la quantité des protéines dans les testicules d'abeille augmente en parallèle avec l'augmentation des ecdystéroïdes durant le stade pupal, ensuite elle diminue juste avant l'exuviation adulte parallèlement à la diminution de la quantité d'ecdystéroïde qui coïncide avec le transfert des spermatozoïdes vers la vésicule séminale.

#### **4.5 Effets sur les protéines testiculaires**

La maturation des testicules des insectes dépend également, entre autre, des matériaux absorbés à partir de l'hémolymphe et ceux synthétisés par les testicules *in situ*. Ces matériaux comprennent des protéines, des lipides et des glucides qui sont tous requis pour le développement de l'appareil génital ( Kunkel & Nordin , 1985 ; Kanost *et al.*, 1990). L'activité des spermatozoïdes est assurée par ces constituants biochimiques en tant que source d'énergie (Charniaux & Payne, 1988).

Les protéines jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'organisme, les divisions cellulaires et la catalyse biochimique (Mahler & Cordes, 1969 ; Hassan, 2002). Elles assurent également la régulation hormonale et peuvent être intégrées dans les cellules comme composant structuraux tels que les lipides et les sucres (Cohen, 2010 ; Sugumaran, 2010). Il a été rapporté que des changements marqués dans la teneur en protéines sont notés dans le développement des testicules et la spermiogénèse au cours de la croissance des

insectes (Perveen *et al.*, 2011). Des études ultrastructurales suggèrent que des glycoprotéines sont impliquées dans la maturation des spermatozoïdes chez les insectes. L'une des protéines précurseurs de la vitelline chez les femelles de *S. littoralis* est produite dans les testicules puis libérée dans le liquide séminal où elle interagit avec les spermatozoïdes (Bebas *et al.*, 2008 ; Kotwica *et al.*, 2011). Enfin selon Dudash (1979) les quantités de protéines dépendent de l'état morpho-fonctionnel de l'organisme.

L'électrophorèse est une des meilleures techniques pour évaluer la variation de la qualité des métabolites dans les insectes. Bien que l'étude de protéines individuelles facilite l'investigation de la nature chimique et les fonctions physiologiques de chaque protéine, la mesure des protéines totales révèle le résultat net de la biosynthèse et l'utilisation des protéines (Mohammed & Hafez, 2000).

Dans la présente étude l'évaluation des effets du RH-2485 et du RH-5992 sur la quantité et la qualité des protéines dans les testicules d'adultes d'*E.kuehniella* montre que la quantité des protéines testiculaires présente une légère augmentation non significative après traitement avec les deux molécules testées. Le nombre de fractions protéiques est le même, on note 13 bandes aussi bien chez les témoins que chez les deux séries traitées. Chez *S.littura*, le chlorfluazuron diminue la quantité des protéines testiculaires, ce qui suggère une interférence avec la spermatogenèse et le manque de protéines dans l'hémolymphe (Perveen *et al.*, 2011).

Il a été rapporté dans plusieurs travaux que les IGRs sont des inhibiteurs de protéines hémolymphe chez diverses espèces d'insectes : *S. littura* (Perveen & Meyata, 2000) ; *T. molitor* (Hami *et al.*, 2004) ; *S. littoralis* (Zohry, 2006) ; *Bombyx mori* (Etebari *et al.*, 2007) ; *Collosobruchus maculatus* (Kelluche & Soltani, 2006) ; *Eurgaster integnceps* (Zibae *et al.*, 2011) ; *Schistocera gregaria* (Ghoneim *et al.*, 2012) . Plusieurs IGRs et différents pesticides ont été rapportés comme des inhibiteurs du contenu en protéines ovariennes et testiculaires chez *Aedes aegypti* ( Ahmed & Naqvi, 1985) et *S. littura* (Perveen, 2012). Selon Padmaje & Rao (2000) l'inhibition du contenu en protéines après traitement des nymphes avec les agonistes d'ecdystéroïdes pourrait être dû à l'inhibition de la synthèse d'ADN, suggérant l'interférence de ces molécules dans la synthèse des protéines. Egalement Perveen *et al.* (2011) ont rapporté que la diminution de la quantité des protéines testiculaires après traitement avec le chlorfluazuron suggère une interférence avec la spermatogenèse et le manque de protéine dans l'hémolymphe. Par

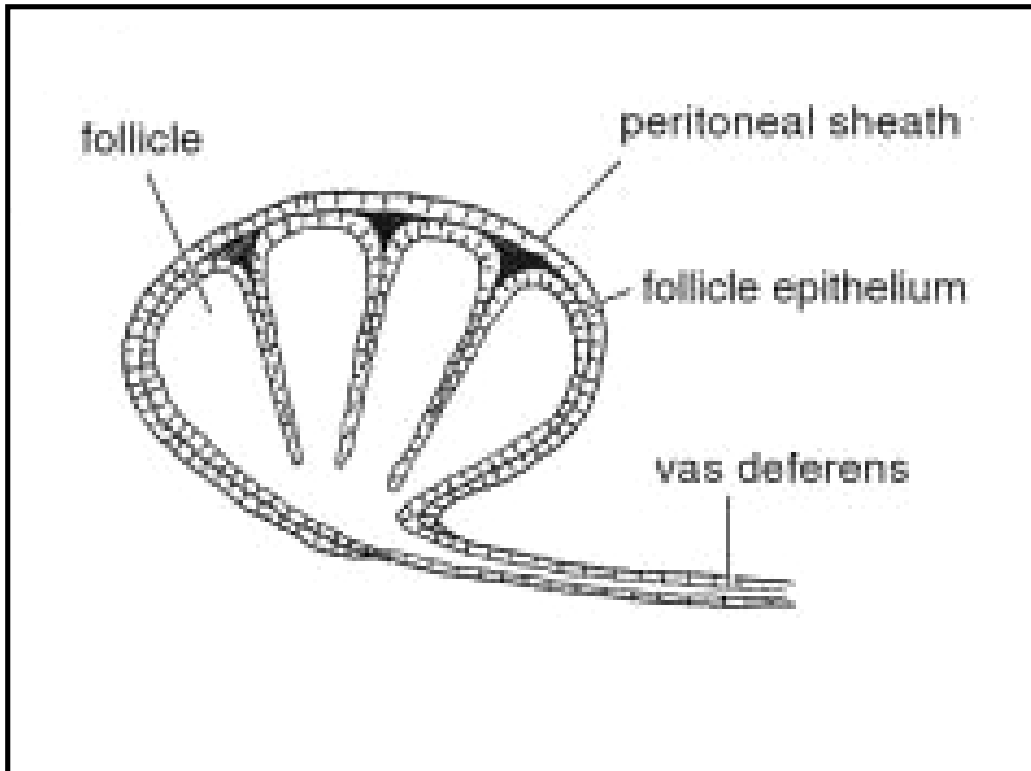
ailleurs plusieurs auteurs ont souligné que la perturbation de la croissance, du développement, de la morphogénèse, de la reproduction et les anomalies histologiques survenues chez *S. gregaria* sont dus à l'inhibition des protéines par les IGRs (Ghoneim *et al.*, 2007 ; Ali Dali *et al.*, 2008 ; Bakr *et al.*, 2008, 2010 ; Ghoneim *et al.*, 2009).

Dans notre travail l'absence d'effet de deux régulateurs de croissance sur la quantité de protéines dans les testicules d'*E. kuehniella* peut être due aux modes de traitements et à la sélectivité des IGRs envers différentes espèces. De plus chez la même espèce l'application topique d'enalapril sur les chrysalides mâles a diminué la quantité de protéines testiculaires (Bensalem & Soltani-Mazouni, 2013). Cependant chez les femelles d'*E. kuehniella* une augmentation significative dans le contenu en protéines des ovaires a été observée après traitement avec enalapril (Bensalem & Soltani-Mazouni, 2013), méthoxyfenozide et pyriproxifen (Solatni-Mazouni *et al.*, 2012). Bien que l'action des IGRs diffère d'une espèce à une autre, elle diffère également d'un sexe à un autre au sein de la même espèce.

#### **4.6. Effets sur la structure des testicules**

Chez les Lépidoptères, chaque testicule renferme un certain nombre de follicules délimité chacun par un épithélium et connecté indépendamment dans le conduit génital (Fig. 26). Le nombre et la forme de chaque follicule diffèrent largement d'un groupe d'insectes à un autre (Imms, 1948 ; Wigglesworth, 1953 ; Ross, 1961 ; Gonçalves *et al.*, 1987 ; Nijhout, 1994 ; Chapman, 1998 ; Lemos, 2006 ; Chapman *et al.*, 2013).

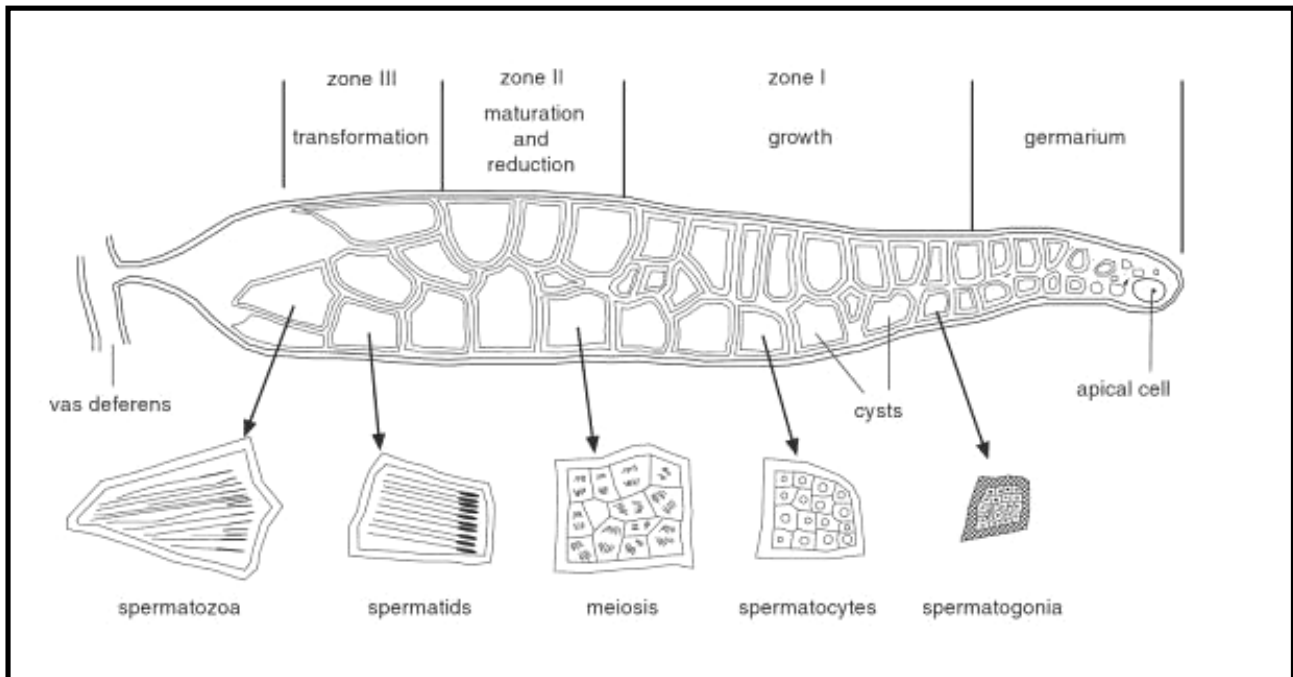
Les follicules contiennent chacun de nombreux cystes regroupés, formés par des cellules germinales (Baccetti & Bairati, 1964 ; Cantacuzene, 1968). Ainsi dans les testicules formés de follicules sphériques comme chez les citadelles, plusieurs coléoptères et lépidoptères, les cystes sont organisés dans l'ordre de la maturité des cellules de la périphérie au centre des testicules. Trois zones de développement sont alors représentées dans chaque follicule : une zone de croissance, une zone de maturation et une zone de différenciation (Snodgrass, 1935; Wigglesworth, 1972 et Chapman, 1973) (fig. 27).



**Figure 26.** Diagrammatic section through a testis in Lepidoptera (Snodgrass, 1935).

Les cystes formés de spermatogonies, de spermatocytes et de spermatides sont généralement sphériques ou polyhédriques (fig. 27) (Phillips, 1970). Le même auteur a rapporté que lorsque les cellules germinales s'allongent, les cystes s'allongent parallèlement. Chez la majorité des espèces d'insectes, les divisions mitotiques donnant des spermatocytes se font au stade larvaire et les divisions méiotiques formant les spermatides ont lieu au stade nymphal (Phillips, 1970 ; Carcupino *et al.*, 1997). Cependant chez les insectes à durée de vie adulte courte, tels que les éphémères (Needham *et al.*, 1935, Carcupino *et al.*, 1997) et les trichoptères (Ross, 1944), les testicules d'adultes contiennent uniquement des spermatozoïdes. Chez les espèces à durée de vie adulte longue telles que les libellules, les divisions méiotiques se produisent dans le stade imaginal (Phillips, 1970). Selon Reinkal *et al.* (2005) les divisions mitotiques des spermatogonies chez *Rhodnius prolixus* ont lieu au dernier stade larvaire au moment de la diminution de l'hormone juvénile et l'augmentation de l'hormone de mue.

Comme chez les insectes à durée de vie adulte courte, la spermatogenèse chez *E. kuehniella* débute au stade larvaire et s'arrête durant le stade nymphal (Riemann & Thorson, 1971). Au stade imaginal, les testicules sont composés de cellules germinales matures regroupées en cystes jointifs de formes polyédrique et allongée. Le traitement par RH-2485 et RH-5992 provoque des anomalies histologiques. Elles se traduisent chez les deux traités par une désorganisation cellulaire se manifestant par l'absence de cystes de forme allongée et l'apparition de cystes de forme sphérique normalement absente chez les adultes.



**Figure 27.** Diagram of a testis follicle showing the sequence of stages of development of the sperm (Wigglesworth, 1965).

Des travaux antérieurs ont démontré que le traitement, par application topique, au sixième stade larvaire avec le pyriproxifène à différentes doses : 0,01µg, 5µg et 10µg, retarde le développement des spermatogonies, des spermatocytes et des spermatides chez *S. mauritia*, (Mathew & Thanuja, 2008). En effet l'observation au microscope électronique a montré des masses de cystes désintégrés et limitants de grands espaces. Cependant les mêmes auteurs ont montré que le traitement par le méthoxyfénoside (0,01µg) au 6<sup>ème</sup> stade larvaire et aux chrysalides nouvellement exuviées, accélère la spermatogenèse. Contrairement à ces travaux, le méthoxyfénoside semble retarder la spermatogénèse chez *E. kueniella*. En effet la présence des cystes de forme sphérique dans les testicules des adultes traités au stade nymphal refléterait la présence de spermatogonie retardée. L'observation histopathologique des testicules d'adultes de *S. gregaria* après traitement avec Hexaflumuron (DL50, inhibiteur de la synthèse de la chitine) au 5<sup>ème</sup> stade nymphal a montré une désintégration des cystes dans la zone de maturation et de différenciation (Bakr *et al.*, 2010) reflétant ainsi une dégénérescence et une nécrose des spermatides et des spermatozoïdes. Le traitement par un mélange de fénoxycarbe, carbamate et lufenuron (DL50) testé sur cet insecte a provoqué une dégénérescence des cellules germinales à tous les stades de développement.

Des résultats similaires ont été aussi démontrés chez *Earias insulana* après traitement avec pyriproxifène (Hussein *et al.*, 1993) et chez plusieurs insectes en utilisant d'autres insecticides : *Locusta migratoria* , *Spathosternum prasiniferum* après traitement avec Apholat (Saxen & Aditya, 1969 ; Sheikher & Mittal, 1986); *L. migratoria* après traitement avec Hempa (Nath *et al.*, 1976); *Heteracris litoralis* après traitement avec Azadirachtin (Ghazawi *et al.*, 2007).

## 5. Conclusion et perspectives

L'activité biologique du méthoxyfénoside (RH-2485) et du tébufénoside (RH-5992) a démontré l'énorme potentiel de ces deux régulateurs de croissance, agonistes de l'hormone de mue, sur le développement et la reproduction d' *Ephesia kuehniella* après leur application sur des chrysalides. Ces deux molécules provoquent une perturbation du développement nymphal aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Ils induisent des mues adultes précoces et létales et des adultes malformés. Aussi les deux molécules provoquent des perturbations dans le développement des testicules durant le stade nymphal en agissant sur l'évolution normale de leurs tailles. Ce résultat suggère une réduction de la spermatogenèse et un blocage du transfert des spermatozoïdes des testicules vers la vésicule séminale. En effet, ces anomalies ont eu une répercussion sur le potentiel reproducteur d'*E. kuehniella* avec des effets plus marqués avec le RH-2485 sur la durée de la période d'oviposition, la fécondité et la létalité de tous les œufs. Cependant aucune modification n'a été enregistrée dans la quantité d'ecdystéroïdes ainsi que dans l'aspect quantitatif et qualitatif des protéines testiculaires chez les adultes. Des anomalies histologiques se traduisant par un retard de la spermatogenèse chez les adultes et une désorganisation des cystes se sont également manifestées. Cette dernière est plus marquée avec le RH-2485.

A l'issue de cette étude, les résultats obtenus sont en accord avec des résultats antérieurs. Ils confirment largement l'utilité de ces agonistes de l'hormone de mue dans le programme de lutte contre les insectes nuisibles notamment chez *E. kuehniella* et chez différents ordres d'insectes.

Les travaux envisagés sur la structure ultra fine des testicules, la numération des spermatozoïdes avant accouplement et dans la spermathèque des femelles chez les adultes pourraient apporter des informations complémentaires sur le mécanisme d'action de ces RCIs sur la reproduction d'*E. kuehniella*.

## Résumé

L'étude menée *in vivo* a permis d'évaluer l'action de deux molécules sélectives parmi les régulateurs de croissance des insectes, principalement les agonistes non stéroïdiens des ecdystéroïdes, le méthoxyfénoside (RH-2485) et le tébufénoside (RH-5992), sur le développement nymphal et la reproduction d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae).

Le traitement a été réalisé par application topique de leur DL50 (méthoxyfénoside : 0,01 µg, tébufénoside : 0,005 µg/insecte, témoin : 2 µL d'acétone seule) sur des chrysalides mâles et femelles nouvellement exuviées, dans des conditions expérimentales (Température : 27° et Humidité : 80%).

Les deux molécules réduisent la durée du développement nymphal avec un effet plus marqué avec le tébufénoside. Ils provoquent également l'apparition de différents types morphogénétiques avec des chrysalides présentant plus de 50% d'émergence bloquée, une émergence partielle et des adultes malformés.

L'étude morphométrique des testicules chez les chrysalides traitées avec le méthoxyfénoside et le tébufénoside met en évidence l'effet toxique de ces deux molécules sur l'évolution de la taille testiculaire. Ils diminuent la taille des testicules au jour 5 du stade nymphal comparativement aux témoins. Le méthoxyfénoside est plus actif durant les derniers jours nymphal où il augmente la taille des testicules.

Sur les adultes qui survivent au traitement des chrysalides, divers paramètres de la reproduction (pré-oviposition, oviposition, fécondité, fertilité des oeufs) ont été mesurés. Les résultats montrent que les deux insecticides n'affectent pas significativement la période de préoviposition malgré une légère augmentation avec le tébufénoside mais provoquent une diminution significative de la période d'oviposition, de la fécondité et de la fertilité des oeufs. L'effet est plus marqué avec le méthoxyfénoside qui exerce un effet léthal sur le nombre d'oeufs pondus.

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes a été déterminée par la méthode enzymo-immunologique (EIA). Les résultats obtenus indiquent que la quantité d'ecdystéroïdes dans les testicules d'adultes traités n'a pas été perturbée. Aussi malgré une légère augmentation de la quantité des protéines testiculaires avec le RH-5992, l'absence d'effet significatif a été observé. De plus l'analyse électrophorétique des protéines sur PAGE-SDS réalisée sur les testicules d'adultes d'*E.kuehniella* détecte 13 fractions protéiques chez les non traités. Le même nombre a été décelé chez les adultes dont les chrysalides nouvellement exuviées ont été traitées aussi bien par le RH-2485 que par le RH-5992.

Enfin, La structure des testicules d'adultes d'*E. kuehniella* des séries témoins et traitées a été déterminée sur des coupes semi-fines préparées selon la technique de microscopie électronique à transmission. L'étude montre une désorganisation tissulaire des cystes dans les testicules de la série traitée. Les cystes sont dispersés et se présentent sous forme sphérique traduisant la présence de spermatogonie retardée.

**Mots clés :** Régulateurs de croissance des insectes, Méthoxyfénoside, Tébufénoside, toxicité, environnement, *Ephestia kuehniella*, développement, reproduction, testicules.

## Abstract

Current *in vivo* study has permitted the evaluation of two selective molecules action, among Insect Growth Regulator, a non-steroidal ecdysteroid agonist, methoxyfenozide (RH-2485) and tebufenozide (RH-5992) on pupal development and reproduction of the pest of stored product *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae).

The compounds have been applied topically to newly emerged male and female pupae at their LD50 (methoxyfenozide : 0,01 µg/pupae, tebufenozide : 0,005 µg/pupae, control : 2 µL acetone alone), under laboratory conditions (Temperature : 27°C, moisture : 80%).

The two molecules induced precocious molt with a higher effect in tebufenozide treated compared to methoxyfenozide ones. Likewise, they caused different morphogenetics types represented by 50% of blocked molt, partially ecdysed and malformed adults.

Morphometric study of the testes in methoxyfenozide and tebufenozide treated emphasizes a toxic effect of these two molecules on the evolution of the testes size. In fact, they reduce the size in day 5 of pupal stage, compared to controls. Methoxyfenozide is more active during the last pupal days, increasing the testes size.

Different reproductive event parameters (preoviposition and oviposition period, fecundity, egg fertility) were determined on the adults that survived from treated pupae. Despite of a slight increase in the preoviposition period in tebufenozide treated, the difference is not significant compared to the control. However, the results showed a decrease in oviposition period, fecundity and egg fertility. Moreover, methoxyfenozide had a lethal effect on the number of egg laid.

The quantitative analysis of ecdysteroids in the testes of the newly emerged adult, were determined by an enzyme-immunoassay (EIA). The results indicated any effect on the amounts of the tests ecdysteroids and protein in the newly emerged adult. Furthermore, proteins electrophoretic analysis on SDS- page revealed 13 protein fractions in no treated pupae. The same number was determined in the testes of the two treated.

Finally, the testes structure of *E. kuehniella* adult from treated series, were determined on semi-thin sections prepared by transmission electron microscopy method. The study showed a disorganization of the cysts tissue in the testes of the treated series. The cysts are dispersed and are in spherical form reflecting the presence of delayed spermatogonia.

**Key words :** Insect Growth Regulator, Methoxyfenozide, Tebufenozide, toxicity, environment, *Ephestia kuehniella*, development, reproduction, testicles.

## ملخص

تمت هذه الدراسة في الجسم الحي ( *IN VIVO* ) لمعاينة تأثير نوعين من منظمات النمو ، Steroidiens ، الغير ، Tébufenozide RH- 5992 و Méthoxyfenozide RH-2485 ، على تطور الشرائق و تكاثر الحشرة الفتاكة للمنتجات المخزنة ، *Ephestia kuehniella* ، (Pyralidae) ، قشريات الجناح).

تم إستخدام منظمات النمو بطريقة الدمج الموضعي بجرعة نصف قاتلة من إل DL50 RH-2485 (حشرة / 0,01µg ) و من إل RH-5992 (حشرة / 0,005µg ) على الشرائق ذكور والإناث جديدي الانسلاخ ( 0 ) يوم ، تحت الظروف التجريبية ( درجة حرارة ٢٥ ، رطوبة ٨٠ ).

المعالجات سببت الظهور المبكر للبالغين مع تأثير أكثر وضوحا مع .tebufenozide كما أنها تتسبب في ظهور أنواع مختلفة مع التخلق الشرائق مع أكثر من 50 % انسلاخ متوقف ، انسلاخ جزئي وتشوهات عند البالغين .

الدراسة المورفومترية للخصيتين للبالغين عند المعالجات ب methoxyfenozide و tebufenozide بسطت الضوء على التأثير السام ل هذه العوامل على تطور حجم الخصية . أنها تقلل من حجم الخصيتين في يوم 5 من مرحلة العذراء مقارنة مع الشاهد . methoxyfenozide أكثر نشاطا خلال الايام الاخيرة للشرائق كما أنه يزيد من حجم الخصيتين.

على البالغين الذين نجو من المعالجة بعض المعايير التكاثرية تم قياسها . وضحت النتائج نقص في فترة وضع البيض و القدرة التكاثرية و كذلك في نسبة البيض المفقس مقارنة مع الشاهد و مع إل RH-5992 . التأثير كان أكثر وضوحا مع methoxyfenozide الذي لديه تأثير فتاك على عدد البيض الذي تضعه.

تم تحديد التحليل الكمي لهرمون الانسلاخ إل ecdysteroïde من خلال طريقة المعايرة المناعية للأنزيم . ( EIA ) وتشير النتائج إلى أن كمية من ecdysteroïds في الخصيتين للبالغين لم تضطرب . أيضا ، على الرغم من زيادة طفيفة في كمية البروتين الخصية مع RH- 5992 ، لم يلاحظ أي تأثير كبير . وعلاوة على ذلك ، فإن التحليل الكهربائي للبروتينات على SDS -PAGE التي أجريت على الخصيتين من البالغين بينت وجود ١٣ حزمة بروتينية عند البالغين غير معالجات . تم العثور على نفس العدد في البالغين المعالجات ب إل RH-2485 و إل RH-5992 بطريقة منفصلة على الشرائق الذكور جديدة الانسلاخ .

أخيرا ، بنية الخصية للبالغين المعالجة تم تحديدها على أقسام شبه رقيقة بواسطة تقنية نقل الإلكترون المجهرية . تظهر الدراسة تشوش في النظام النسيجي للاكياس . الاكياس مشتتة وتكون في شكل كروي يعكس وجود تأخير spermatogonie

الكلمات المفتاحية : منظمات النمو ، RH-2485 ، RH-5992 ، التسمم ، المحيط ، *Ephestia kuehniella* ، التطور ، التكاثر ، الخصية

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, T. S., Dillwith, J. W. & Blomquist, G. J. 1984.** The role of 20-hydroxyecdysone in housefly sex pheromone biosynthesis. *J. Insect Physiol.*, 30, 287-294.
- Adams, T.S. 2001.** Morphology of the internal reproductive system of the male and female two-spotted stink bug, *Perillus bioculatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) and the transfer of products during mating. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 39(1):45-53.
- Ahmed, S. O. & Naqvi, S. N. H. 1985.** Toxicity and effects of dimilin on the protein pattern of *Aedes aegypti* (PCSIR strain). *Proc. Entomol. Soc. Karachi.*, 14 (15): 121–132.
- Al-Dali, A.G., Ghoneim, K.S., Bakr, R.F., Bream, A.S. & Tanani, M.A. 2008.** Egg productivity of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) as affected by the non-steroidal ecdysone agonist Tebufenozide (RH- 5992). *J. Egypt. Acad. Soc. Environ. Develop.*, 9 (10): 27-38.
- Aribi, N., Quenedey, A., Soltani, N. & Delbecque, J.P. 1999.** L'initiation de la métamorphose chez *Zophabas atratus* (Coleoptera : Tenebrionidae) : effets des ligatures et des régulateurs de croissance, *ANN. Soc. Entomol. FR.* (NS 35), 59-64.
- 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*, *Pesticides biochemistry and physiology.*, 84: 55-62.
- Arioli, C.J., Botton, M. & Carvalho, G.A. 2004.** Chemical control of *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) in peach orchards. *Ciencia Rural.*, 34: 1695-1700.
- Asahina, M., Fugo, H. & Takeda, S. 1994.** Ecdysteroids synthesis in dissociated cells of the prothoracic glands of the silkworm *Bombyx mori*: *Zool. Sci.*, 11(1): 107-111.
- Baccetti, B ., & Bairatti, A. 1964 .** Indagini sull'ultrastruttura delle cellule germinali maschili in *Dacus cleae*. *Geml. Redia.*, 49 :1 .
- Bakr, R.F., Ghoneim, K.S., Al-Dali, A.G., Tanani, M.A.& Bream, A.S. 2008.** Efficiency of the chitin synthesis inhibitor lufenuron (CGA-184699) on growth, development and morphogenesis of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Egypt.Acad.J.Biol.Sci.*, 1(1): 41-57.
- Bakr Reda, F.A., Mohammed Mona I., El-Gammal Abd Elazeem M., Mahdy Noura M. 2010.** Histopathological change in the testis of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) induced by the IGR Consult and Lufox. *Egypt. Acad. J. biolog. Sci.*, 1 (1): 23-28.
- Baltaev, U.A., & Shangaraeva, G.S. 2000.** Zooecdysteroids: distribution and role in arthropod life cycles. *Chem. Nat. Compd.*, 36(6): 543-559

**Barett, B.A.,** Jennifer, A., Hoelscher. 2003. Effects of methoxyfenozide-treated surfaces on the attractiveness and responsiveness of adult codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J.Econom. Entomol.*, 96, 623-628

**Barett, B.A. 2008.** Assessment of methoxyfenozide exposure on the sexual attractiveness and responsiveness of adult codling moth, *Cydia pomonella* L., in small orchard blocks. *Pest Management Science*, 64:916-922.

**Barth, R. H. & Lester, L. J. 1973.** Neuro-hormonal control of sexual behavior in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 18, 445-472.

**Bebas, P., Kotwica, J., Joachimiak, E., & Giebultowicz, J.M. 2008.** Yolk protein is expressed in the insect testis and interacts with sperm. *BMC Dev. Biol.*, 8, 64.

**Beckage, N.E., Marion, K.M, Walton, W.E, Wirth, M.C & Tan, F.F. 2004.** Comparative larvicidal toxicities of three ecdysone agonists on the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles gambiae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 57:111–122.

**Bellés, X. 2005.** Vitellogenesis directed by juvenile hormone. In: *Reproductive Biology of invertebrates, Progress in vitellogenesis*, A. S. Raikhel (ed), Science Publishers, Enfield, USA/Plymouth, UK, pp. 12 (B):157-197.

**Bensalem, F., & Soltani-Mazouni, N. 2013.** Effect of Two Inhibitors of the Angiotensin Converting Enzyme in the Mediterranean Flour Moth: Biochemical Composition and Ecdysteroid Amount of Gonads. *European J. Sci. Res.*107 (2) : 186-194.

**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., Van De Velde, S., Soltani, N., & Smagghe, G. 2008.** Effect of two insect growth regulators on the ecdysteroid contents in eggs of the mealworm. *Belgian J.Zool.* 138:140–145.

**Biddinger, D. J., & Hull, L. A., 1995.** Effects of several types of insecticides on the mite predator, *Stethorus punctum* (Coleoptera: Coccinellidae), including insect growth regulators and abamectin. *J. Econ. Entomol.*, 88: 358-366.

**Biddinger, D. J., & Hull, L. A. 1999.** Sublethal effects of selected insecticides on the growth and reproduction of a laboratory susceptible strain of tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econom. Entomol.*, 92: 314-324 .

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

**Blachowsky, A.S, 1972.** *Entom appliquée à l'agriculture tome 1 lépidoptère* E.D.masson, PP.1234-1235.

**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-PXR. *Mol. Biol. Evol.*, 20 (4) : 551-553.

**Bouzeraa, H. 2010.** Impact de deux mimétiques de l'hormone de mue (RH-2485) et (RH-5992) sur le devenir des oeufs d'un lépidoptère, ravageur des denrées stockées: *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae) après traitement des mâles. Mémoire de Magister Physiologie Animale. Université d'Annaba. Algérie.

**Bouzeraa, H., & Soltani-Mazouni, N. 2012.** Effets du méthoxyfénoside et du tébufénoside sur le développement et quelques paramètres de la reproduction d'*Ephestia kuehniella* après traitement des mâles et des femelles. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 137(1-4) : 157-167.

**Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

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

**Bylemans, D., Janssen, C., Latet, G., Meesters, P., Peusens, G., Pitsioudis, G. & Wagelmans, G., 2003.** Pest control by means of natural enemies in raspberry and red currants under plastic tunnel. Dans: S. C. Gordon and J. V. Cross Book (eds). IOBC/WPRS Bulletin. Dundee, Scotland. 26 (2): 37-44.

**Cadogan, B.L., Scharbach, R.D., Knowles, K.R. & Krause, R.E. 2005.** Efficacy evaluation of a reduced dosage of tebufenozide applied aerially to control spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). *Crop Protection.* 24: 557-563.

**Cantacuzene, A. M. 1968.** Recherches morphologiques et physiologiques sur les glandes annexes males des orthopteres 111. Modes d'association des spermatozoides d'Orthopteres, *Z- Zellforsch.*, 113-126.

**Carcupino M., Kathirithamby J., & Mazzini M. 1997.** Testis morphology and spermatogenesis in two species of ELENCHUS (Strepsiptera : Elenchidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryo.*, 21 ( I): 9-19.

**Carlson, G.R., Dhadialla, T.S., Hunter, R., Jansson, R.K., Jany, C.S., & Libert, Z. 2001.** the chemical and biological properties of methoxyfénoside, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *Pest Manag. Sc.*, 57: 115-119.

**Carpenter, J.E., & Chandler, L.D. 1994.** Effects of sublethal doses of two insect growth regulators on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rep. J. Entomol. Sci.*, 29, 428-435.

**Carton, B., Smaghe, G, Mourad, K, & Tirry, L. 1998.** Effects of RH-2485 on larvae and pupae of *Spodoptera exigua* (Hübner). *Meded Fac Landbouwkd Toegep Biol. Wet. Univ. Gent*, 63: 537-545.

**Carton, B., Heirman, A., Smaghe, G., & Tirry, L. 2000.** Relationship between toxicity, kinetics and *in vitro* binding of nonsteroidal ecdysone agonists in the cotton leafworm and the Colorado potato beetle. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent. 65: 311-322.

**Chandler, L.D., Pair, S.D., & Harrison, W.E. 1992. RH- 5992.** a new insect growth regulator active against corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Ent., 85, 1099-1103.

**Chapman, R. F. 1973.** The insect structure and Function. The English universities press LTD. pp. 270

**Chapman, R. F. 1998.** The insects: structure and function, 4th edition. Cambridge University press. Cambridge, UK, p770.

**Chapman, R.F., Simpson, S.J., & Douglas, A.E. 2013.** The Insects Structure & Function. 5th edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK, p283.

**Charmillot, P.J., Pasquier, D, & Alipaz, N.J. 1994.** Le tebufénozide, un nouveau produit selectif de lutte contre le carpocapse *Cydia pomonella* L. et la tordeuse de la pelure *Adoxophyes orana* F.v.R. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic., 26:123–29

**Charmillot, P.J., Gourmelon, Fabre, & Pasquier, D. 2001.** Ovicidal and larvicidal effectiveness of several insect growth inhibitors and regulators on the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). J. App. Entomol., 125 ( 3) : 147–153.

**Charmillot, P.J., Pasquier, D. & Verneau, S. 2003.** Effectiveness of different insecticides incorporated into artificial diets on larvae of the grapevine moth *Lobesia botrana* and the grape berry moth *Eupoecilia ambiguella*. Bulletin OILB/SROP, 26: 1-5.

**Charniaux-Cotton, H. & Payen, G. 1988.** Crustacean reproduction. In Endocrinology of Selected Invertebrate. Types 2 editors. Laufer, H. and Downer, R. G. H. New York: Alan Liss. pp. 279-303.

**Chen, P.S. 1984.** The functional morphology and histochemistry of insect male accessory glands and their secretion. Ann. Rev. Entomol., 29, 233-255.

**Chen, L., Zhu, J., Sun, G., & Raikhel, A.S. 2004.** The early gene Broad is involved in the ecdysteroides hierarchi governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. J. Mol. Endocrinol. 33, 743-761.

**Christian-Luis, R., & Pineda, S., 2010.** Toxicity and sublethal effects of methoxyfenozide on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) J. Econom. Entomol., 103: 662-667.

**Cohen, E. 2010.** Chitin biochemistry: Synthesis, hydrolysis and inhibition. Adv. Insect Physiol. 38: 5-74.

**Collins, D.A. 2006.** A review of alternatives to organophosphorus compounds for the control of storage mites, J. Stor.Prod. Res. 42: 395–426.

**Dallaire, R., Labrecque, A., Marcotte, M., Bauce, B. & Delisle, J. 2004.** The sublethal effects of tebufenozide on the precopulatory and copulatory activities of *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana*. Ent. Exp. Appl., 112 (3): 169-181.

**Davey, K.G. 1985.** The male reproductive tract. pp 1-14 In: Kerkut, G.A and L.I Gilbert (Eds)., Comprehensive insect physiolo., Biochem. Pharmacol., Vol.1, 487, Pergamon Press, Oxford.

**De Groot Inge. 2004.** Protection des céréales et des légumineuses stockées. Agrodok 18. deuxième édition.

**De Reggi, M.L., Pitoizet, N., Gharib, B., & Delbecque, J.P. 1992.** New enzyme immunoassay for ecdysteroids using peroxydase enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies, Xth ecdysone Workshop, Liverpool, 6-7th April. Abstract, 9.

**Dees, W. H., Sonenshine, D. E. & Breidling, E. 1985.** Ecdysteroids in the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari : Ixodidae), and comparison with sex pheromone activity. J. Med. Entomol. 22, 22-27.

**Delbecque, J.P., Weidner, K. & Hoffman, K.L. 1990.** Alternative sites of ecdysteroid production in insects. Invert. Reprod. Develop. 18: 29-42.

**Delisle, J., & McNeil, J.N., 1987.** Calling behaviour and pheromone titre of the true armyworm *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae) under different temperature and photoperiodic conditions. J. Insect Physiol. 33, 315-324.

**Delisle, J., 1992.** Age related changes in the calling behavior and the attractiveness of obliquebanded leafroller virgin females, *Choristoneura rosaceana* , under different constant and fluctuating temperature conditions. Entomol. Exper. App. 63, 55-62.

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

**Dhadialla, T.S., Retnakaran, A. & Smagghe, G. 2005.** Insect growth- and development disturbing insecticides. In: Comprehensive Insect Molecular Science (Gilbert, L.I., Kostas, I. & Gill, S., eds.). Pergamon Press. 6, 55-116. (ISBN 0-44-451526-7).

**Dhadialla, T.S. & Ross, R. 2007.** Bisacylhydrazines: novel chemistry for insect control. In: Modern crop Protection Compounds.W. Kramer & U. Schirmer (eds), Wiley-VCH, Weinheim,773-796.

**Dhadialla, T.S., A. Retnakaran, G. Smagghe, 2010.** Insect growth- and developmental-disturbing insecticides. In: L.I. Gilbert, and S.S Gill (eds.). Insect Control. Elsevier, New York, 121-184.

**Dinan, L., Whiting, P., Bourne, P., & Coll, J. 2001.** bib03758-O-Acetylharpagide is not an ecdysteroid agonist. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 1077–1082.

**Doucet, D., Cusson, M., & Retnakaran, A. 2007.** Insect endocrinology and hormone-based pest control products in IPM. University of Minnesota. Radcliffe's IPM World Textbook.

**Dudash, A.U. 1979.** The content of protein and nucleic acid in the fat body of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Zür. Zoo. 58: 655–658.

**Ebaid, G.H. 2004.** Effects of various insecticide groups on the European corn borer and some natural enemies. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 14: 331-338.

**Eizaguirre, M., López, C., Schafellner, Ch., & Sehna, 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.

**El Ouar, I., Aribi, N., & Soltani-Mazouni, N. 2010.** Dosage des ecdystéroïdes chez *Ephestia kuehniella*. Travaux de l'Institut Scientifique, Serie Zoologie, Rabat.47(1):137–140.

**Elek, J.A., Steinbauer, M.J., Beveridge, N., & Ebner, P. 2003.** The efficacy of high and low volume spray applications of MimicReg. (tebufenozide) for managing autumn gum moth larvae *Mnesampela privata* (Lepidoptera: Geometridae) in eucalypt plantations. Agri. Forest Entomol. 5: 325-332.

**Etebari, K., Bizhannia, A.R., Sorati, R. & Matindoost, L. 2007.** Biochemical changes in haemolymph of silkworm larvae due to pyriproxyfen residue. Pesticide Biochem. Physiol., 88: 14–19.

**Farinos, G.P., Smagghe, G., Tirry, L., & Castanera, P. 1999.** Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeonymus mariaefranciscae* and *Leptinotarsa decemlineata*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 41:201–213.

**Friedlander, M. & Brown J.J. 1995.** Tebufenozide (Mimic), a non –steroidal ecdysone agonist, induces spermatogenesis in isolated abdomens of diapausing codling moth larvae (*Cydia pomonella*). J. Insect Physiol. 41 : 403-411.

**Friedlander, M. 1997.** Control of eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. J. Insect. Physiol., 43, 1085-1092.

**Friend, D.S., & Farquhar H.E. 1967.** Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens, J. Cell. Biol., 35, 357-376.

**Fugo, H., Yamauchi, M., Dedos, S.G. 1996.** Testicular ecdysteroids in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan Acad. 72(B):34–37.

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

- Gelbic, I., Adel, M.M., & Hussein, H.M. 2011.** Effects of nonsteroidal ecdysone agonist RH-5992 and chitin biosynthesis inhibitor lufenuron on *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833). Central European Journal of Biology. 6- 5.
- Ghazawi, A. N., El-Shranoubi, E. D., El-Shazly, m. M., & Abd El-Rahman, A. 2007.** Effects of Azadriachtinon mortality and reproductive system of the grasshopper, *Heteracris littoralis* Rambo. (Orthoptera : Acrididae). J. Orthoptera Res., 16 (1): 57-65.
- Ghoneim, K.S., Al-Dali, A.G., Bakr, R.F., Tanani, M.A. & Bream, A.S. 2007.** Histopathological and ultrastructural changes in some tissues of the desert locust *Schistocerca gregaria* by the juvenoid Pyriproxyfen. Al-Azhar Bull. Sci., 18(2): 83-98.
- Ghoneim, K.S., Al-Dali, A.G., Bakr, R.F., Tanani, M.A. & Bream, A.S. 2007.** Developmental and morphogenic responses of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) to the juvenoid Pyriproxyfen (S-31183). Al-Azhar Bull. Sci., 18(2): 50-81.
- Ghoneim, K. S., Tanani, M. A. & Basiouny, A. L. 2009.** Influenced survival and development of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Acrididae) by the wild plant *Fagonia bruguieri* (Zygophyllaceae). Egypt. Acad. J. biolog. Sci., 2 (2): 147-164.
- Ghoneim, K.S.; Hamadah, Kh.Sh.; & Tanani, M.A. 2012.** Protein Disturbance in the Haemolymph and Fat Body of the Desert Locust *Schistocerca Gregaria* as a Response to Certain Insect Growth Regulators. Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci. 1 (7): 73-83.
- Giebultowicz, J. M., Blackburn, M. B., Thomas-Laemont, P. A. & Raina, A. K. 1993.** Sterilization of the gypsy moth by disruption of sperm release from testes. Dans ACS Conference Proceedings: Series on pest management: biological based technology. Lumsden, R. D. and Vaughn, J. L. (eds), ACS, Washington, D.C. p. 114-116.
- Giebultowicz, J.M., 1999.** Insect circadian rhythms: is it all in their heads?. J. Insect Physiol., 45, 791-800.
- Giebultowicz, J.M. & Bebas, P., 2005.** Functions of biological clocks in insect physiology and reproduction: practical aspects. Pestycydy/Pesticides, 4, 77-90.
- Gilbert, M.W., & Rybczynski, R. 2002.** Control and Biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. Annu. Rev. Entomol., 47, 883-916.
- Gilbert, L.I.& 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.
- Gilbert, L.I. & Gill, S.S. 2010.** Insect Control: Biological and Synthetic Agents. Academic Press.
- Gonçalves, T.C.M., Lent, H., & Almeida, J.R. 1987.** Estudo anatômico e morfométrico dos folículos testiculares de algumas espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82:543-550.

**Guèye, M.T., Seck D., Wathelet J-P. & Lognay G. 2011.** Lutte contre les ravageurs des stocks de céréales et de légumineuses au Sénégal et en Afrique occidentale : synthèse bibliographique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(1): 183-194.

**Gurr, G. M., Thwaite, W. G., & Nicol, H. I. 1999.** Field evaluation of the effects of the insect growth regulator tebufenozide on entomophagous arthropods and pests of apples. *Aust. J. Entomol.*, 38: 135-140.

**Hagedorn, H. H., Shapiro, J. P. & Hanaoka, K. 1979.** Ovarian ecdysone secretion is controlled by brain hormone in an adult mosquito. *Nature* 282: 92 – 94.

**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, 8, 205-262.

**Hami, M., Taibi, 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., Taibi, F., Smaghe, G. & Soltani-Mazouni, N. 2005.** Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides against the Mediterranean flour moth. *Comm. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 70 (4): 767-773.

**Happ, G.M. 1992.** Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annu. Rev. Entomol.*, 37, 303-20.

**Hassan, H. A. 2002.** Biological and biochemical studies on the effects of some botanical extracts on cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). Unpublished M. Sc. Thesis, Fac. Sci., Ain Shams Univ., Egypt.

**Hewa-Kapuge, S., Mcdougall, S., & Hoffmann, A.A. 2003.** Effects of methoxyfenozide, indoxacarb, and other insecticides on the beneficial egg parasitoid *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under laboratory and field conditions. *J. econ. Ent.*, 96: 1083–1090.

**Hoelscher, A.J., Barret, A.B. 2003.** Effects of methoxyfenozide-treated surfaces on the attractiveness and responsiveness of adult leafrollers. *Entomol. Exp. Appl.* 107: 133-140.

**Hsu, A.C.-T. 1991.** 1,2-Diacyl-1-alkyl-hydrazines; a novel class of insect growth regulators. In: *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*, D.R. Baker, J.G. Fenyes, & W.K. Moberg, Eds. II. ACS Symposium Series, American Chem. Soc., 443, 478-490.

**Hu, Z.Z., Mani, I., Hermoso, V., Liu, H., Cathy H. Wu. 2004.** iProLINK: an integrated protein resource for literature mining. *Comput. Biol. Chem.*, 28, 409–416.

**Huang, X., Warren, J.T., & Gilbert, L.I. 2008.** New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J. Genet. Genomics*, 35, 1-10.

**Hussein, N. M., Enan, R. A. & Mohamed, M. I. 1993.** Effects of the juvenoid

pyriproxyten on gonad development in male. *Earias insulana* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae). AI-Azhar .I. Agric. Res., 17, 129-140.

**Iga, M., Smagghe, G. 2010.** Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. Peptides 31, 456–467.

**Iga, M., Blais, C., Smagghe, G. 2013.** Study on ecdysteroid levels and gene expression of enzymes related to ecdysteroid biosynthesis in the larval testis of *Spodoptera littoralis*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 82 (1): 14–28.

**Imms, A . D. 1948 .** A General Textbook of Entomology Including the Anatomy, Physiology, Development and Classification of Insects . E . P. Dutton & Company Inc., New York .7<sup>th</sup> ed., P.727.

**Isaacs, R., Mason, K.S., & Maxwell, E. 2005.** Stage-specific control of grape berry moth, *Endopiza viteana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae), by selective and broad-spectrum insecticides. J. Econ. Entomol. 98: 415-422.

**Ishaaya, I., Kontsedalov, S., & Horowitz, A.R. 2005.** Biorational insecticides: mechanism and cross-resistance. Arch. Insect Biochem. Physiol. 58, 192-199.

**Ito, Y., Yasuda, A., & Sonobe H. 2008.** Synthesis and phosphorylation of ecdysteroids during ovarian development in the silkworm, *Bombyx mori*. Zool. Sci., 25, 721–727.

**Jacob, T.A. & Cox, P.D. 1976.** The influence of temperature and humidity on the life cycle of *E.kuehniella*.Z (Lepidoptera: Pyralidae).J.Srored. Pro. Res.13, 107-118.

**Khater, H.F. 2011.** Biorational Insecticides for integrated pest management. Benha Veterinary Medical Journal, In press.

**Karnovsky, M.J. 1965.** A formaldehyde glutaraldehyde fixation of high osmolarity for use electron microscopy. J. Cell. Biol., 27, p1374.

**Kawamura, N., Sahara, K & Fugo, H. 2003.** Glucose and ecdysteroid increase apyrene sperm production in *in vitro* cultivation of spermatocysts of *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 49, 25- 30.

**Kelluche, A. & Soltani, N. 2006.** Impact of hexaflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on growth, development and reproductive performance of the progeny in *Callosobruchus maculatus* after adult treatments. Afr. J. Agric.Res.1(3):57–64.

**Kelly, T.J., Maesler, E.P., Thigaraga, B.S., Bell, A. & Imberski R.B. 1992.** Development of *in vitro* assay for prothoracicotropic hormone of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L) following studies on identification, titers and synthesis of ecdysteroids in last instar females. Comp. Physiol., 162 (B): 581-587.

**Khan, M., Hossain, M.A., & Islam, M.S. 2007.** Effects of neem leaf dust and a commercial formulation of a neem compound on the longevity, fecundity and ovarian development of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). J. Biol. Sci. 10, 3656–3661.

**Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P., Smagghe, G., & Soltani, N. 2009.** Halofenozide affects sexual behavior, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). Belg. J. Zool., 139(2):147–155.

**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. Econom. Entomol., 93, 1760-1767.

**Koslova, T.Y. & Thummel, C.S. 2003.** Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. Science. 301, 911-914.

**Koopmaqshap, A.B., & De kort, C.A.D. 1991.** A juvenile hormone analogue affects the protein pattern of hemolymph in last instar larvae of *locusta migratoria*. J. insect physiol., 37(2) : 87-93.

**Kotwica, J., Joachimiak, E., Polanska, M.A., Majewska, M.M., Giebultowicz, J.M., & Bebas, P. 2011.** Diurnal rhythm in expression and release of yolk protein in the testis of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 41(4):264-72.

**Kouakou, C.K., 2004.** Diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé (*Vigna unguiculata* (L.)Walp. au Sénégal .DEA de Biologie végétale à l'Université cheikh Anta Diop de Dakar, 50p.

**Kunkel, J. G. & Nordin, J. H. 1985.** Yolk proteins. In: “Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology” (edited by G. A. Kerkut and L. I. Gilbert) 1, 83–111. Pergamon Press, Oxford.

**Laemmli, V.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 227- 680.

**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. 2005.** Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Comprehensive Molecular Insect Science, L.I., Gilbert, K. Iatrou & S.K. Gill, eds, Elsevier, Oxford, 3, 125-195.

**Lambreas, C.L., Galante, F., & Mena, L. 1991.** Ovarian condition as an indicator of the phenology of *Babas bubas* (Coleoptera: Scarabeidae). Ann. Entomol. Soc. America, 84, 190-194.

**Landolt, P. J. & Curtis, C. E. 1982.** Interspecific sexual attraction between *Pyrallis farinalis* L. and *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). J. Kansas Entomol. Soci. 55, 248–252.

**Laverdure, A.M., 1972.** L'évolution de l'ovaire chez la femelle adulte de *Tenebrio molitor*: la vitellogenèse. J. Insect. Physiol. 18, 1369–1385.

**Lemoine, A. 1980.** Les protéines cuticulaire de *Tenebrio molitor* et quelques méthodes de quantification et d'identification. Rapport DEA et Entomologie. Université de Dijon.

**Lemos, W.P., Serrao, J.E., Ramalho, F.S., Cola-Zanuncio, J.C., & Lacerda, M.C. 2006.** Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). Braz. J. Biol., 65(1):91-96.

**Lévêque, C., & Mounolou, J. C. 2001.** Biodiversité. Dynamique biologique et conservation. Dunod, Masson. Sciences, Paris, 248 p.

**Loeb, M.J., Woods, C.W., Brandt, E.P., & Boakovec, A.B. 1982.** Larval testes of the tobacco budworm: a new source of insect ecdysteroids. Science. 218, 896–898.

**Loeb, M.J., Brandt, E.P., & Birnbaum, M.J. 1984.** Ecdysteroid production by testes of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, from last larval instar to adult. J. Insect Physiol. 30, 375–381.

**Loeb, M.J. 1986.** Ecdysteroids in testis sheaths of *Heliothis virescens* larvae: an immunocytological study. Arch. Insect Biochem. Physiol. 3, 173–180.

**Loeb, M.J., Brandt, E.P., Woods, C.W., & Bell, R.A. 1988.** Secretion of ecdysteroid by sheaths of testes of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and its regulation by testis ecdysiotropin. J. Exp. Zool. 248, 94–100.

**Loeb, M. J. & Hakim, R. S. 1991.** Development of genital imaginal discs of *Heliothis virescens* culture *in vitro* with 20-hydroxyecdysone and fat body or testis sheaths. Invert. Reprod. Dev. 20, 181-191.

**Loeb, M.J. 1994.** Genital tract growth factors from a moth, the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *In Vitro Cell. Deve. Biol.* 30(A) : 702-708.

Loeb, M.J., De loof, A., Gelman, D.B., Hakim, R.S., Jaffe, H., Koshansky, J.P., Meola, S.M., Shoofs, L., Vafopoulou, X., Wagner, R.M. & Woods, C.W. 2001. Testis ecdysiotropin, an insect gonadotropin that induces synthesis of ecdysteroid. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 181-188.

**Loriatti, C., Charmillot, P.J., Forno, F., Mattedi, L., Pasquier, D. & Rizzi, C. 2005.** Control of codling moth *Cydia pomonella* L. using insecticides: relationship between susceptibility and efficacy in the field. Bulletin OILB/SROP. 28, 259-264.

**Mahler, H.R., & Cordes, E.H. 1969.** Biological Chemistry. Harper and Row, New York.

**Mannion, C.M., McLane, W., Klein, M.G., Moysenko, J., Oliver, J.B. & Cowan, D. 2001.** Management of early-instar Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in field-grown nursery crops. J. Econ. Entomol. 94, 1151-1161.

**Mansfield, S., Withers, T.M., Gous, S.F., Potter, K.J.B., Kriticos, D.J., Watson, M.C. & Kimberley, M.O. 2006.** Potential of selective insecticides for managing *Uraba lugens* (Lepidoptera: Nolidae) on eucalypts. J. Econ. Entomol. 99, 780-789.

**Mathew, M.Sc., Thanuja A., & Phil, M. 2008.** Studies on the accessory sex glands of *Spodoptera Mauritia* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae). Thesis submitted to the University of Calicut in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Zoology. University of Calicut Kerala, INDIA

**Mauchamp B. 1990.** Insecte et culture. Adalia, 14, 1-6.

**Mebarkia, A. & Guechi, A. 2004.** Protection Phytosanitaire Contre les Ravageurs des Céréales Stockées. Laboratoire de Microbiologie et de phytopathologie , Faculté des Sciences, UFA-Sétif.

**Mohamed, M.I., and Hafez, S.E. 2000.** Biochemical studies on the Protein content of fat body and hemolymph of fourth larval instar of *Musca domestica* L: adult hemolymph and gonads, both emerging from reciprocal crosses after treatment with an organophosphorus pesticide. J. Union. Arab. Biol., Cairo, 13(A): 33-51.

**Nakagawa, Y., Minakuchi, C., Takahashi, K., & Ueno, T., 2002.** Inhibition of [3H]ponasterone A binding by ecdysone agonists in the intact Kc cell line. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 175–180.

**Nakagawa, Y. 2005.** Nonsteroidal ecdysone agonists. Vitam Horm. 73, 131–173.

**Nakagawa, Y., Sakai, A., Magata, F., Ogura, T., Miyashita, M., Miyagawa, H. 2007.** Molecular cloning of the ecdysone receptor and the retinoid X receptor from the scorpion *Liocheles australasiae*. FEBS J. 274 (23): 6191-6203.

**Naqvi, S. N. H. 1991.** Determination of toxicity of methoprene (ZR-515) against *Halys dentatus* Fabr. and *H. qadri* Abbasi and Ahmad and its effect on protein pattern. Pak. J. Entomol. 6, 63–71.

Nath, V., Mittal, P. K., & Sheikher, C. 1976. Effects of hempa on the gonads of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). Bull. Entomol. Res., 66 (2): 313-315.

**Needham, J . G., J . R . Traver, & Yin-Chi Hosu . 1935.** The Biology of Mayflies . Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York .

**Neubueser, D., Warren, J.T., Gilbert, L.I., Cohen, S.M. 2005.** Molting defective in required for ecdysone biosynthesis. Devp. Biol, 280 (2): 362-372.

**Nijhout, H.F. 1994.** Insect hormones. Chapter 5. pp89-141. princeton University Press . New jersey. U.S.A.

**Nowock, J. 1973.** Growth and metamorphosis in the testes of *Ephestia kuehniella*. J.Insect Physiol. 19, 941–949.

**Nowock, J. 1972.** Induction of imaginal differentiation by ecdysone in the testes of *Ephestia kuehniella*. J. Insect Physiol. 8, 1699–1704.

- Osanai, M., Kusaga, H. & Aigaki, T. 1987.** Physiological role of apyrene spermatozoa of *Bombyx mori*. *Experientia*. 43, 593-596.
- Özyurt, N., Candan, S., Suludere, Z., & Amutkan, D. 2013.** Morphology and Histology of the Male Reproductive System in *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) Based on Optical and Scanning Electron Microscopy. *J. Entomol. Zool. Studies*, 1 (4): 40-46
- Paul, A., Harrington, L.C., & Scott, J.G. 2006.** Evaluation of novel insecticides for control dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med. Entomol.* 43, 55–60.
- Payene, N.D. & Retnakaran, A. 1966.** The differential effects of environmental factors Upon Micibraco hebetor and its most *Ephestia kuehniella*. *Boil. Bull. Mar. Biol. Lab.*
- Perveen, F. & Miyata, T. 2000.** Effects of sublethal dose of chlorfluazuron on ovarian development and oogenesis in the common cutworm, *Spodoptera litura* (F.) Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soci. Amer.* 93, 1131–1137.
- Perveen, F. 2000b.** Effects of sublethal dose of chlorfluazuron on testicular development and spermatogenesis in the common cutworm, *Spodoptera litura* (F.) Lepidoptera: Noctuidae). *Physiol. Entomol.* 25, 315–323.
- Perveen, F. 2011.** Effects of Sublethal Doses of Chlorfluazuron on Ovarioles in the Common Cutworm, *Spodoptera Litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Life Sci.*, 5, 609-613.
- Perveen, F. 2012.** Biochemical Analyses of Action of Chlorfluazuron as Reproductive Inhibitor in *Spodoptera litura*. *Insecticides – Advances in Integrated Pest Management:* 293-326.
- Philip, M.M., Orr, D.B., & Hain, F.P. 2005.** Evaluation of biological and biorational control tactics for suppression of Nantucket pine tip moth damage in *Virginia pine* christmas trees. *J. Econ. Entomol.* 98, 409-414.
- Phillips, D. M. 1970.** Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell. Biol.* 44,243-271.
- Pineda, S., Budia, F., Schneider, M.I., Gobbi, A., Viñuela, E., Valle, J., & Del Estal, P. 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., Schneider, M.I., Smaghe, G., Martinez, A.M., Del Estal, P., Vinuela, E., Valle, J., & Budia, F. 2007.** Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econom. Entomol.* 100(3):773–780.
- Pineda, S., Martinez, A. M., Figueroa, J.I., Schneider, M.I., Del Estal, P., Vinuela, E., Gomez, B., Smaghe, G. & Budia, F. 2009.-** Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 102 (4): 1490-1496.

**Pineda, S., Martinez, A.M., Schneider, M.I., Figueroa, J.A., & Zaleta, O. 2011.** Los agonistas de la hormona de la muda de los insectos: Una nueva clase de reguladores del crecimiento de los insectos. *Folia Entomologica Mexicana* (in press).

**Polanska, M.A., Maksimiuk-Ramirez, E., Ciuk, M.A., Kotwica, J., & Bebas, P. 2009.** Clock-controlled rhythm of ecdysteroid levels in the haemolymph and testes, and its relation to sperm release in the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* 55, 426–434.

**Porcheron, P., Moriniere, M., Grassi, J., & Pradelles, P. 1989.** Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochem.* 19, 117–122.

**Raina, A.K., Park, Y.I. & Hruska, Z. 2003.** Ecdysone agonist halofenozide affects corpora allata and reproductive physiology of the *Formosan subterranean* termite, *Coptotermes formosanus*. *J. Insect Physiol.* 49, 677-683.

**Rees, D.A., Giles, P., Lewis, M.D., & Ham, J. 2010.** Adenosine regulates thrombomodulin and endothelial protein C receptor expression in folliculo stellate cells of the pituitary gland. *Purinergic signal.*, 6, 19-29.

**Reinke, M., B. & Barrett, B. 2007a.** Fecundity, fertility and longevity reductions in adult oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonists tebufenozide and methoxyfenozide. *J. Entomol. Sci.*, 42, 457–466.

**Regnault-Roger, C. 2002.** De nouveaux phyto-insecticides pour le troisième millénaire ? , 18-39, in « Biopesticides d'origine végétale » , C.Regnault Roger, BJR Philogène et C.Vincent (Eds), Tec et Doc Lavoisier, Paris.

**Reshma, J. , Rashmi P.A., & Linu, M. 2013.** Biological Effects of Ecdysteroids and Their Non Steroidal Agonist Bisacylhydrazines. A Review.

**Retnakaran, A., & Oberlander, H., 1993.** Control of chitin biosynthesis in insects. In: Muzzarelli, R.A.A. (Ed.), *Chitin Enzymology*. European Chit. Soci., pp. 89–99.

**Retnakaran, A., Hiruma, K., Palli, S. R. & Riddiford, L. M. 1995.** Molecular analysis of the mode of action of RH-5992, a lepidopteran-specific, non-steroidal ecdysteroid agonist. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 109-117.

**Retnakaran, A., Macdonald, A., Tomkins, W.L., Davis, C.N., & Brownright, A.J.1997.** Ultrastructural effects of a non-steroidal agonist, RH-5992, on the sixth instar larvae of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Insect Physiol.* 43, 55–68.

**Retnakaran, A., Gelbic, I., Sundaram, M., & Tomkins, W.L. 2001.** Mode of action of the ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992), and an exclusion mechanism to explain resistance to it. *Pest. Mgt. P. Sci.* 57, 951-957.

**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., & Gilbert, L.I. 2006a.** Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysone biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 188–199.

**Rewitz, K.F., Rybczynski, R., Warren, J.T., & Gilbert, L.I. 2006b.** Developmental expression of *Manduca shade*, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 247, 166–174

**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: Gilbert L.I., Tata J.R. and Atkinson B.G. (eds): *Metamorphosis*. Academic Press, Inc. 6, 223-243.

**Riddiford, L.M., Cherbas, P. & Truman, J.W. 2000.** Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitamins and Hormones-Advances in Research and Applications*. 60, 1-73.

**Riemann, J.G., & Thorson B.J. 1971.** Sperm maturation in the male and female genital tracts of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: pyralidae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.* 1(1): 11-19.

**Riemann, J.G. 1972.** Ultrastructure of sperm in F1 progeny of irradiated males of the Mediterranean flour moth, *Anagosta kuehniella*. *Ann. Entomol. Soci. America.* 66, 147-153.

**Riemann, J. G., & Thorson, B.J. 1976.** Ultrastructure of the ductus ejaculatorius duplex of the Mediterranean flour moth *Anagasta kuhniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryo.*, 5, 227-240.

**Riemann, J.G., & Thorson B.J. 1979.** Ultrastructure of the accessory glands of the Mediterranean flour moth. *J. morphol.*, 159, 355-392.

**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.

**Rodriguez Enriquez, C.L., Pineda, S., Figueroa, J.I., Schneider, M.I. & Martinez, A.M. 2010.** Toxicity and sublethal effects of methoxyfenozide on *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 103 (3): 662-667.

- Ross, H. H . 1944.** The caddis flies or Trichoptera of Illinois . Illinois Nat. Hist. Surv . Bull . 23(1) :1 .
- Ross, H. H . 1961 .** A Textbook of Entomology . John Wiley & Sons Inc ., New York .
- Royer, L., & McNeil, J.N., 1991.** Changes in calling behaviour and mating success in the European corn borer ( *Ostrinia nubilalis*), caused by relative humidity. Entomol. Exper. Appl. 61, 131-138.
- Rybczynski, R., 2005.** Prothoracicotropic hormone, Gilbert, L.I.& Iatrou, K.& Gill, S.S. (Eds.), Comp. Mol. Insect Sci., 7 (3): 61-123.
- Sáenz-de-Cabezón, I.F.J., Marco, V., Zalom, F.G., & Pérez-Moreno, I. 2005.** Effects of methoxyfenozide on *Lobesia botrana* Den & Schiff (Lepidoptera: Tortricidae) egg, larval and adult stages. Pest Management Science. 61 (11) : 1133–1137.
- Saldago, V.L. 1992.** Block of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in insect muscle by the ciaylhydrazine insecticide RH-5849, 4-aminopyridine, and quinidine. Arch. Insect Biochem. Physiol., 21, 239-252.
- Salem, H., Smaghe, G., & Degheele, D. 1997.** Effects of tebufenozide on oocyte growth in *Plodia interpunctella*. Medical. Faculty. Landbouww.Gent University, 62(1): 9-13.
- Sanchez-Ramos, I., Gonzalez-Nunez, M., & Pascual, S. 2011.** Efecto de reguladores del crecimiento de insectos (RCI) sobre la reproduccion y la longevidaddelamosca del olivo, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada, Baeza, Spain.
- Saxena, S. C. & Aditya, V. 1969.** Histopathology and histochemistry of the insects treated with chemosterilants. I. On the observations in active tests grasshopper, *Spathosternum prasiniferum* Walker. Envir. Ecol., 11 (1): 123- 124.
- Sheikher, C. & Mittal, P. K. 1986.** Cytochemical changes induced by apholate. tepla and hempa in the testes of *Locusta migratoria* (L.). Indian J. Entomol., 48 (3): 289-291.
- Seth, R. K., Rao, D. K. & Reynolds, S. E. 2002.** Movement of spermatozoa in the reproductive tract of adult male *Spodoptera litura*: daily rhythm of sperm descent and the effect of light regime on male reproduction. J. Insect Physiol. 48, 119-131.
- Seth, R. K., Kaur, J. J., Rao, D.K., & Reynolds, S. E., 2004.** Effects of larval exposure to sublethal concentrations of the ecdysteroid agonists RH-5849 and tebufenozide (RH-5992) on male reproductive physiology in *Spodoptera litura*. J. Insect Physiol., 50, 505–517.
- Shahouti, H.A., XU, J.X., Qiao, J., & Jia, Q.D. 2011.** Sublethal Effects of Methoxyfenozide, in comparison to Chlorfluzuron and Beta-Cypermethrin, on the Reproductive Characteristics of common cutworm *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Entomol. Res. Soc., 13(3): 53-63.

**Shimizu, T., Moribayashi, A., & Agui, N. 1985.** *In vitro* analysis of spermiogenesis and testicular ecdysteroids in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. Appl. Entomol Zool. 20:56–61.

**Shinbo, H., & Happ, G.M. 1989.** Effects of Ecdysteroids on the growth of the post-testicular reproductive organs in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 35, 855-864.

**Schneider, M.I, Smagghe, G., Pineda, S., & Vinuela, E. 2008.** The ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hymemoptera: Ichneumonidae) pharmacokinetics approach. Ecotox. 17, 181–188.

**Sieglauff, D.H., Duncan, K.A., & Brown, M.R. 2005.** Expression of genes encoding proteins involved in ecdysteroidogenesis in the female mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol., 35, 471–490.

**Silhacek, L., Oberlander, H., & Porcheron, P. 1990.** Action of RH-5849, a non-steroidal ecdysteroid mimic on *Plodia interpunctella* (Hübner) *in vivo* and *in vitro*. Arch. Insect. Biochem. Physiol., 15, 201-212.

**Smagghe, G. & Degheel, D. 1992.** Effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist, RH-5849 on reproduction of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Parasitica, 48, 23-29.

**Smagghe, G., & Degheele D., 1994.** Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. J. Pest. Sci., 42, 85-92.

**Smagghe, G. & Degheele, D. 1994.** The significance of pharmacokinetics and metabolism to the biological activity of RH-5992 (tebufenozide) in *Spodoptera exempta*, *Spodoptera exigua*, and *Leptinotarsa decemlineata*. Pest. Biochem. Physiol. 49, 224-234.

**Smagghe, G., Böhm, G.A., Richter, K., & Degheele, D. 1995.** Effect of nonsteroidal ecdysteroid agonists on ecdysteroid titer in *Spodoptera exigu* and *Leptinotarsa decemlineata*. J. Insect Physiol. 41, 971–974.

**Smagghe, G., Salem, H., & Degheele, D. 1996a.** Tebufenozide: effects of no steroidal ecdysteroid agonist on cuticle formation in Indian meal moth, *Plodia interpunctella* larvae. Parasitica. 52, 143-149.

**Smagghe, G., H. Salem, L. Tirry, L., & Degheele, D. 1996b.** Action of a novel insect growth regulator tebufenozide against different developmental stages of four stored product insects. Parasitica. 52, 61-69.

**Smagghe, G., Viñuela, E., Budia, F., & Degheele, D. 1996c.** *In vivo* and *in vitro* effects on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: an ultrastructural approach. Arch. Insect Biochem. Physiol. 32, 121–134.

**Smagghe, G., & Degheele, D. 1997.** Comparative toxicity and tolerance for the ecdysteroid mimic tebufenozide in a laboratory and field strain of cotton leafworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 90, 278–282.

**Smagghe, G., Carton, B., Decombel, L., & Tirry, L. 2001.** Significance of absorption, oxidation and binding to toxicity of four ecdysone agonists in multi-resistant cotton leafworm. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46, 127-139.

**Smagghe, G., Decombel, L., Carton, B., Voigt, B., Adam, G., & Tirry, L. 2002.** Action of brassinosteroids in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 199–204.

**Smagghe, G., Dhadialla, T.S., & Lezzi, M. 2002.** Comparative toxicity and ecdysone receptor affinity of non-steroidal ecdysone agonists and 20-hydroxyecdysone in *Chironomus tentans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 187-192.

**Smagghe, G., Pineda, S., Carton, B., Del Estal, P., Budia, F., & Vinuela, E. 2003.** Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science.* 59, 1203-1209.

**Smagghe, G., Bylemans, D., Medna, P., Budia, F., Avilla, J. & Vinuela, E. 2004.** Tebufenozide distorted codling moth larval growth and reproduction, and controlled field populations. Laboratory of Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent Univ, Coupure Links, Belgium. *ANN. appl. Biol*, 145: 291-298. printed in UK.

Smagghe, G., L.E. Gomez & T.S. Dhadialla, 2012. **Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. Advances in Insect Physiology. 43 Burlington: Academic Press, 43: 163-249.**

**Snodgrass, R.E. 1936.** Morphology of the insect abdomen. Part III. The male genitalia (including arthropods other than insects). *Smithsonian Inst. Misc. Collect.* 95, 1-96.

**Soltani, N., Khebbeb, M.E. H & Delachambre, J. 1997.** Lipid metabolism during the sexual maturation of the meal worm (*Tenebrio molitor*) effect of ingested diflubenzuron. *Pest .Biochem .Physiol.*, 58, 209-217.

**Soltani, N., Smagghe, G., & Soltani-Mazouni, N. 1998.** Evaluation of the ecdysteroid agonist RH-0345 on the hormonal production by integumental explants and ovaries in mealworms. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 63 (2b), 547–554.

**Soltani-Mazouni, N., Taibi, F., Berghiche, H., Smagghe, 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, N., Aribi, N., Berghiche, H., Lakbarc, Smagghe, G. 2002.** Activity of RH -0345 on ecdysteroid production and cuticule secretion in *Tenebrio molitor* pupae *in vivo* and *in vitro*. *Pastic. Biochem .Physiol.*, 72, 83-90 .

**Soltani-Mazouni, N., Hami, M. & Gramdi, H. 2012.** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella* Zeller. *Inv. Rep. Dev.*, 56 (2): 157-163.

**Spindler, K.P. & Spindler barth, M. 1991.** Ecdysteroid production and metabolism by an epithelial cell line from *Chironomus tentaus*. *Natur wisenchaften*. 78 (2): 78-79.

**Sridevi, R., Gupta, A.D., & Ramamurty, P.S. 1989a.** Spermatogenesis in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomon*. 14, 01– 09.

**Sridevi, R., Bajaj, P., & Gupta, A.D. 1989b.** Hormonal regulation of macromolecular synthesis in testes and accessory reproductive glands of *Spodoptera litura* during post embryonic and adult development. *Ind. J. Exp. Biol.* 27, 699– 703.

**Sridhara, S. & Lee Vaughan, H. 2013 .** Tebufenozide disrupts ovarian development and function in silkmoths. *Insect Biochem. Mol. Biology.* 43 (12) :1087-1099.

**Stay, B, & Weedhead, A. 1993.** Neuropeptid regulators of insect corpora allata . *Amer .Zool.* 33, 357-364 .

**Sugumaran, M. 2010.** Chemistry of cuticular sclerotization. *Adv. insect Physiol.* 39, 151-209.

**Sun, X., & Barrett, B.A. 1999.** Fecundity and fertility changes in adult codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to surfaces treated with tebufenozide and methoxyfenozide. *J. Econom. Entomol.* 92, 1039-1044.

**Sun, X., Barrett, B.A. & Biddinger, D.J. 2000.** Fecundity and fertility reductions in adult leafrollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonists tebufenozide and methoxyfenozide. *Ent. Exp. Appl.*, 94, 75-83.

Sundaram, M., Palli, S.R., Smagghe, G., Ishaaya, I., Feng, Q.L., Primavera, M., Tomkin S , P.J., Krell, W.L. & Retnakaran, A. 2002. Effect of RH-5992 on adult development in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 225-231.

**Taibi, F. , Smagghe, G., Amrani, L. , & Soltani-Mazouni, N. 2003.** Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol.* 135 (C) : 257–267.

**Taibi, F. 2007.** Etude comparée du développement et de la reproduction chez deux ravageurs des denrées stockées *Ephesia kuehniella* et *Tenebrio molitor* : Aspect endocrinien en rapport avec l'impact d'un mimétique de l'hormone de mue RH-0345. thèse de Doctorat en Biologie et Physiologie animale, Université d'Annaba, Algérie.

**Taylor, M.Z. 2001.** Recent Developments in Ectoparasiticides, *The Veterinary Journal* 161(3):253-268.

**Telfer, W. H. 2009.** Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect Sci.*, 9, 1-21.

- Thomson, B.J. & Riemann, J.G. 1982.** Effects of 20-hydroxyecdysone on sperm release from the testes of the Mediterranean flour moth, *Anagosta kuehniella*. J. Insect Physiol. 28, 1013-1019.
- Timothy, C. & Marss. 2012.** Mammalian toxicology of insecticides. 12, 221-222.
- Tozetto De Oliveira, S., Bitondi, M.M., Dallacqua, R.P., & Simoes, Z.L.P. 2007.** Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. Apidologie. 38, 1-11
- Trisyono, A., & Chippendale, M., 1997.** Effect of the nonsteroidal ecdysone agonists, methoxyfenozide, and tebufenozide, on the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econom. Entomol., 90, 1486-1492.
- Trisyono, A., & Chippendale, M., 1998.** Effect of the ecdysone agonists, RH-2485 and tebufenozide, on the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. J. Pest. Sci., 53, 177-185.
- Truman, J. & Riddiford, L. 1999.** The origins of insect metamorphosis. Nature. 401, 447-452.
- Tunaz, H. & Uygun, N. 2004.** Insect growth regulators for insect pest control. Turk. J. Agric. For., 28, 377-387.
- Vafopoulou, X., & Steel, C.G. 2005.** Testis ecdysiotropic peptides in *Rhodnius prolixus*: biological activity and distribution in the nervous system and testis. J. Insect Physiol. 51, 1227-1239.
- Ware, G.W. & Whitacre, D.M. 2004.** The Pesticide Book, 6th Ed. P. 496. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.
- Warren, J.T., Petryk, A., Marques, G., Parvy, J.P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li Y, O'Connor, M.B., Dauphin-Villeman, C., & Gilbert, L.I. 2004.** Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. Insect Biochem. Mol. Biol. 34, 991-1010.
- Wawrzyniak, M. 2004.** Influence of methoxyfenozide on feeding and development of large cabbage white butterfly (*Pieris brassicae* L.). Pestycydy 3/4: 63-68.
- Weaver, D.K. & Farlane, J.E. 1990.** The effects of larval density on growth and development of *Tenebrio molitor*. J. Insect Physiol. 36, 531-536.
- Webster, R.P., & Cardé, R.T. 1982.** Influence of relative humidity on calling behaviour of the female European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). Entomol. Exper. Appl. 32, 181-185.
- Wigglesworth, V.B. 1936.** The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius protixus* (Hemiptera). Quart. J. Micr. Sci., 79, 91-120.

- Wigglesworth, V. B . 1953.** The Principles of Insect Physiology . 5<sup>th</sup> ed. Methuen & Co . Ltd ., London .
- Wigglesworth, V.B. 1972.** The principles of insect physiology. Chapman and Hall Ltd. pp 700.
- Williams, C.M. 1956.** The juvenile hormone of insects. Nature. 178, 212-213.
- Wing, K.D. 1988.** RH-5849, a non steroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. Sciences. 241, 464-469.
- Witalis, J.& Godula, J., 1993.** Postemryonal development of the testes in cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Noctuidae, Lepidoptera), Acta. Biologica. Hungarica, 44, 281-295.
- Xue, L., & Noll, M. 2000.** *Drosophila* female sexual behavior induced by sterile males showing copulation complementation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97, 3272-3275.
- Yanagi, M., Tsukamoto Y., Watanabe, T. & Kawagishi, A. 2006.** Development of a novel lepidopteran insect control agent, chromafenozide. J. Pestic. Sci. 31, 163–164.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M., & Evans, R.M. 1992.** *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. Cell. 71, 63-72.
- Yezli-Touiker, S., & Soltani-Mazouni, N. 2011.** Profil des ecdysteroides durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae). Synthèse. 22, 49–55.
- Zarate, N., Diaz, O., Martinez, A.M., Figueroa, J.I., Schneider, M.I., Smagghe, G., Vinuela, E., Pudia, F., & Pineda, S. 2011.** Lethal and Sublethal Effects of Methoxyfenozide on the Development, Survival and Reproduction on of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 40(1): 129-137.
- Zhao-Xiao, F., Li-Zhao, M., Wang-Jin, X., Wang-Jia B., Wang-Sheng, L. & Blankespoor, H.D. 2003.** Efficacy of RH-2485, a new non-steroidal ecdysone agonist, against the cotton boll worm; *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae) in the laboratory and field. Crop Protection. 22, 959-965.
- Zibae, A., Zibae, I. & Sendi, J.J. 2011.** A juvenile hormone analog, pyriproxyfen, affects some biochemical components in the hemolymph and fat bodies of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). Pesticide Biochem.Physiol., 100 (3): 289-298.
- Zohry, N. M. H. 2006.** Aberration of some insecticides on some biological aspects of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lpidoptera: Noctuidae). Unpublished Ph.D. Thesis, Fac. Sci., South Valley Univ., Egypt.

**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.

## ANNEXES

### Publication Internationale:

1. **BOUZERAA, H., & SOLTANI-MAZOUNI, N.** 2012. Effets du méthoxyfénozide et du tébufénozide sur le développement et quelques paramètres de la reproduction d'*Ephestia kuehniella* après traitement des mâles et des femelles. Bull. Soc. zool. Fr., 137(1-4) : 157-167.
2. **H. BOUZERAA & N. SOLTANI-MAZOUNI.** Comparative effects of two Moulting Hormone Agonists (methoxyfenozide and tebufenozide) on the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* zeller (Lepidoptera: pyralidae): ecdysteroids amounts of testes and reproductive events. World Appl. Scien. J., (11): 1903- 1910. 2014

### Communications Internationales

1. **BOUZERAA hayette & N.SOLTANI-MAZOUNI.** Evaluation de deux insecticides de nouvelle génération preservant l'environnement (méthoxyfénozide et tébufénozide) sur *Ephestia kuehniella*. Le 1<sup>er</sup> Colloque International sur la Préservation de l'Environnement des Régions Semi-arides. Tébessa, Algérie, 2013
2. **BOUZERAA H ; MESKACHE R & SOLTANI-MAZOUNI N.** Les effets des insecticides de troisième génération sur le pouvoir reproducteur d'un ravageur des denrées stockées : *Ephestia kuehniella*. Séminaire International Protection Phytosanitaire : situation et perspectives. Batna, Algérie, 2013.
3. **Hayette BOUZERAA & N.SOLTANI-MAZOUNI.** Evaluation de deux analogues de l'hormone de mue chez *Ephestia kuehniella* : morphométrie, taux d'ecdystéroïdes et structure des testicules. 3<sup>ème</sup> Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie et d'Ichtyologie, Marrakech, Maroc, .2012
4. **Hayette BOUZERAA & N.SOLTANI-MAZOUNI.** Activité comparée de deux insecticides sélectifs sur le potentiel reproducteur d'*Ephestia kuehniella*. Le 1<sup>er</sup> Congrès international sur l'aide à l'Agriculture Algérienne. Annaba, Algérie, 2011.
5. **Hayette BOUZERAA, R.MESKACHE, G.SMAGGE & N. SOLTANI-MAZOUNI.** Sublethal effects of tebufenozide and methoxyfenozide on reproductive events and testes in the Mediterranean flour moth. 63<sup>rd</sup> International Symposium of Crop Protection. Ghent, Belgique, 2011.
6. **Hayette BOUZERAA & N.SOLTANI-MAZOUNI.** Effets du méthoxyfénozide et du tébufénozide sur la reproduction d'*Ephestia kuehniella* après traitement des mâles et des femelles. Congrès de la Société Zoologique de France. Nice, France, 2011.

**7. Hayette BOUZERAA & N.SOLTANI-MAZOUNI.** Efficacité comparée de deux insecticides sélectifs mimétiques de l'hormone de mue sur un insecte des denrées stockées *Ephestia kuehniella*. Le 2<sup>ème</sup> Congrès Franco-Maghrebin de Zoologie et les 4<sup>èmes</sup> Journées Franco-Tunisiennes de Zoologie. Zarzis, Tunis, 2010.

-



