



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Spécialité : Biologie Animale Environnementale

Option : Reproduction et Développement

Intitulé de la thèse

Interaction de la 20 hydroxyecdysone et de l'insuline chez un modèle biologique *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera-Pyralidae): reproduction et pouvoir antioxydant

Présentée par M^{me} DELHOUM FELLAH Hadia

Membres du Jury

Mme Ouided DAAS	Pr.,	Présidente	UBMA
Mme Nadia ARIBI	Pr.,	Directeur de thèse	UBMA
Mme Leila ALLAL-BENFEKIH	Pr.,	Examinatrice	U. Blida
Mme Hinda BERGHICHE	Dr.,	Examinatrice	UBMA
Mme Farida KHAMMAR	Pr.,	Examinatrice	USTHB

Année Universitaire: 2015-2016.

REMERCIEMENTS

*Je remercie infiniment **Mme le Professeure Ouided DAAS** pour avoir accepté d'être présidente de jury. Qu'il me soit permis de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.*

*Je souhaiterais exprimer également ma gratitude à ma Directrice de thèse, **Mme le Professeure Nadia ARIBI**, 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 son humanisme et sa gentillesse, Merci!*

*Mes remerciements sincères et respectueux vont également à **Mesdames les Professeures Farida Khammar** (USTHB) et **Leïla ALLAL-BENFEKIH** (Université de Blida) pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'y consacrer leur temps ; leur présence dans ce jury est un honneur.*

*Je suis très reconnaissante envers **Mme le Dr. Hinda BERGHICHE**, Maître de Conférences (Université d'Annaba) pour avoir accepté de juger cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à exprimer à **M. le Professeur Nouredine SOLTANI** mes sincères remerciements pour son accueil bienveillant au sein du laboratoire et ses encouragements mais aussi pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée.*

Que toute l'équipe du laboratoire de Biologie Animale appliquée trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour leur soutien. En outre, je tiens, aussi à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse, et tout particulièrement

Mme le Professeure Samira Kilani-Morakchi.

Mes remerciements vont également à mon mari, pour m'avoir soutenu et encouragé pendant ces années de travail mais aussi pour sa patience, ses multiples conseils et le soutien moral qu'il m'a apporté.

Ma reconnaissance va à ma fille, mes sœurs et mon frère qui ont, particulièrement, assuré le soutien affectif de ce travail.

A mes parents

Pour eux ... et grâce à eux ...

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	9
1. Présentation du matériel biologique	9
2. Elevage en laboratoire	11
3. Présentation des hormones	11
4. Traitement	11
4. 1. Traitement simple	12
4. 2. Traitement combiné	12
5. Extraction et dosage des métabolites dans le corps gras	13
6. Dosage des ecdystéroïdes ovariens	18
7. Extraction et dosage des vitellogenines et des vitellines	21
8. Détermination du potentiel reproducteur	22
9. Dosage de la catalase	22
10. Analyse statistique	23
RESULTATS	24
1. Effets de l'insuline et de la 20E sur la biochimie du corps gras	24
1. 1 Contenu en carbohydrates	24
1. 1. 1. Effets de l'Insuline	24
1. 1. 2. Effets de la 20E	26
1. 1. 3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en carbohydrates	27
1. 2. Contenu en glycogène	30
1. 2. 1. Effets de l'Insuline	30
1. 2. 2. Effets de la 20E	31
1. 2. 3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en glycogène	33
1. 3. Contenu en protéines	35
1. 3. 1. Effets de l'Insuline	35
1. 3. 2. Effets de la 20E	36

1. 3. 3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en protéines	38
1. 4. Contenu en lipides	40
1. 4. 1. Effets de l'Insuline	40
1. 4. 2. Effets de la 20E	41
1. 4. 3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en lipides	43
2. Effets de l'insuline et de la 20E sur la reproduction	45
2.1. Effets de la 20E et de l'insuline en traitement simple sur les vitéllogénines dans le corps gras	45
2. 1. 1. Effets de l'insuline	45
2. 1. 2. Effets de la 20E	47
2. 1. 3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur les vitellogenines	48
2. 2. Effets de la 20E et l'insuline en traitement combiné sur les Vitellogénines	50
2. 3. Effets de la 20E et de l'insuline en traitement simple sur les vitellines dans les ovaires	54
2. 3. 1. Effets de l'insuline	54
2. 3. 2. Effets de la 20E	54
2. 3. 3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en vitellines dans les ovaires	55
2. 4. Effets de la 20E et de l'insuline en traitement combiné sur les vitellines ovariennes	57
2. 5. Effets de l'insuline et de la 20E sur les ecdystéroïdes ovariens	58
2. 5. 1. Effets de l'insuline	58
2. 5. 2. Effets de la 20E	59
2. 5. 3. La comparaison des effets de l'insuline et la 20E sur les ecdystéroïdes ovariens	60
2. 6. Potentiel reproducteur	61
2. 6. 1. Effets de l'insuline et de la 20 E sur la période de Préoviposition	61
2. 6. 2. Effets de l'insuline et de la 20 E sur la période d'oviposition	62
2. 6. 3. Effets de l'insuline et de la 20 E sur la fécondité	63

2. 6. 4. Effets de l'insuline et de la 20 E sur le pourcentage d'éclosion	64
2. 6. 5. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le potentiel reproducteur	65
<i>Périoded'oviposition</i>	65
<i>Fécondité</i>	66
<i>Fertilité</i>	68
3. Effets de l'insuline et de la 20E sur le stress oxydatif chez les mâles et les femellesd'E. Kuehniella	69
3. 1. Effets de l'insuline chez les femelles	69
3. 2. Effets de la 20E chez les femelles	71
3. 3. Comparaison de l'effet de l'insuline et de la 20E sur le stress oxydatif chez les femelles	73
3. 4. Effets de l'insuline chez les mâles	76
3. 5. Effets de la 20E chez les mâles	76
3. 6. Comparaison de l'effet de l'insuline et de la 20E sur l'activité spécifique de la catalase chez les mâles	79
DISCUSSION	81
1. Effets de l'insuline et de la 20E sur les principaux constituants biochimiques du corps gras	81
2. Effets de l'insuline et de la 20E sur la reproduction	83
3. Effets de l'insuline et de la 20E sur l'activité de la catalase	88
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	90
RESUMES	92
Français	92
Anglais	93
Arabe	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	95
ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE (publication et communications)	

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

N°	Titres	Page
01	La biosynthèse de l'ecdysone (Gilbert & Rewitz, 2009)	3
02	Endocrinologie chez l'insecte : (a) schéma classique et (b) nouveau schéma de Yamanaka <i>et al.</i> , (2013)	4
03	Voies de signalisation régulant l'ecdystéroïdogénèse dans la glande prothoracique chez <i>D. melanogaster</i> .(Yamanaka <i>et al.</i> , 2013).	8
04	Cycle de développement d' <i>E. kuehniella</i> à 25°C.	10
05	Structure chimique de l'insuline humaine.	12
06	Structure chimique de la 20-hydroxyecdysone.	13
07	Principales étapes d'extraction des carbohydrates, glycogène protéines, glucides et lipides (Shibko <i>et al.</i> , 1966 ; Van Handel, 1964) et dosages.	15
08	Dosage du glycogène dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glycogène (µg) (R ² : coefficient de détermination)	17
09	Dosage des glucides dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose (µg).	17
10	Dosage des protéines dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).	18
11	Dosage des lipides dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table (µg).	18
12	Analyse quantitative des ecdystéroïdes ovariens chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> traitées à l'insuline (5, 10µg) et à la 20E (5, 10µg) : courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de 20-hydroxyecdysone (20E).	20
13	Dosage des vitellogenines dans le corps gras et des vitellines ovariens : droite étalon exprimant l'absorbances à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).	21
14	Effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg) séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates dans le corps gras (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8).	28
15	Effet de l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg), séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène (µg/mg de tissu) dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8).	33
16	Effets l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg), séparément par application topique le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8).	38

17	Effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg), séparément par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en lipides (µg/mg de tissu) dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8).	43
18	Effets de l'insuline et de la 20E administrées (5, 10 µg), séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	49
19	Effets de la 20E et de l'insuline administrées (5, 10 µg), en traitement combiné, par application topique sur le contenu en vitellogénines (µg/mg de corps gras) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	51
20	Effets de l'insuline et de la 20E administrées (5, 10 µg), séparément, par application topique le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellines ovariennes, (µg/mg) à l'émergence chez les adultes femelles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 4-6).	55
21	Effets de la 20E et de l'insuline administrées en traitement combiné, par application topique sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg e) à l'émergence des femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	57
22	Effets de la 20E et de l'insuline, administrées (5, 10 µg), séparément, par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv E) à l'émergence des adultes femelles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	60
23	Effets de l'insuline et de la 20E (5, 10 µg) administrées séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée de la période de préoviposition (jours) des adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> . (m ± S.D, n = 6-8).	62
24	Effets de la 20E et de l'insuline, administrées séparément (5, 10 µg), par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée des périodes d'oviposition (jours) chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> . (m ± S.D, n = 6-8).	66
25	Effets de la 20E et de l'insuline, administrées (5, 10 µg), séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur la fécondité (nombre d'œufs pondus) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	67
26	Effets de la 20E et de l'insuline, administrées (5, 10 µg), séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale sur la fertilité (%) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	68
27	Effets de la 20E et de l'insuline administrées (5, 10 µg), séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	74
28	Effets de la 20E et de l'insuline (5µg, 10µg), administrées séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les mâles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	79

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
01	Dosage du glycogène dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.	16
02	Dosage des glucides dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.	16
03	Dosage des protéines dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.	16
04	Dosage des lipides dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.	17
05	Analyse quantitative des ecdystéroïdes ovariens chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> traitées à l'insuline (5, 10µg) et à la 20E (5, 10µg) : courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de 20-hydroxyecdysone (20E).	20
06	Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu des carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8).	25
07	Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.	25
08	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8).	26
09	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8) : ANOVA à deux critères de classification.	27
10	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées, séparément, par application topique, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	29
11	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8).	30
12	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène dans le corps gras (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	31

13	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm S.D$, n= 6-8).	32
14	Effets de la 20E administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	32
15	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées, séparément, par application topique, sur le contenu en glycogène, dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	34
16	Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm S.D$, n= 6-8).	35
17	Effets de l'insuline administrée par application topique (5 et 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	36
18	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm S.D$, n= 6-8).	37
19	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	37
20	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale sur les protéines, dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	39
21	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm S.D$, n= 6-8).	40
22	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	41
23	Effets de la 20E administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm S.D$, n= 6-8).	42
24	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides (µg/mg de corps gras) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	42

25	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur le contenu en lipides dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	44
26	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	46
27	Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogenines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.	46
28	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	47
29	Effets de la 20E administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogenines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal des femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification	48
30	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	50
31	Comparaison des effets de la combinaison de la 20E (5, 10 µg) et de l'insuline aux deux doses (5, 10 µg) sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	53
32	Effets de l'insuline, administrée, par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg), chez les adultes femelles d' <i>E.kuehniella</i> à l'émergence (m ± S.D, n = 4-6).	54
33	Effets de la 20 E, administrée, par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg d'ovaire), dans les ovaires chez les adultes femelles d' <i>E.kuehniella</i> à l'émergence (m ± S.D, n = 4-6).	55
34	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur le contenu en vitellines ovariennes à l'émergence chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	56
35	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées en traitement combiné par application topique, sur le contenu en vitellines ovariennes chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> à l'émergence: Classement par test le HSD de Tukey.	58

36	Effets de l'insuline, administrée par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv 20E) à l'émergence chez les adultes femelles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	59
37	Effets de la 20E, administrée par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv 20E) à l'émergence chez les adultes femelles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	59
38	Comparaison des effets de la 20E (5, 10 µg) et de l'insuline (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv 20E) à l'émergence chez les adultes femelles d' <i>E.kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	61
39	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée de la période d'oviposition (jours) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> . (m ± S.D, n = 6-8).	62
40	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée de la période d'oviposition (jours) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> . (m ± S.D, n = 6-8).	63
41	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la fécondité (nombre d'œufs pondus) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> . (m ± S.D, n = 6-8).	63
42	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la fécondité (nombre d'œufs pondus) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> . (m ± S.D, n = 6-8).	64
43	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la fertilité (%) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	64
44	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la fertilité (%) chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> . (m ± S.D, n = 6-8).	65
45	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la période d'oviposition chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	66
46	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la fécondité chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	68
47	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20 E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la fertilité chez les adultes femelles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	69
48	Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	70

49	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	71
50	Effets de la 20E, administrée, par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	72
51	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	73
52	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal des femelles d' <i>E.kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	75
53	Effets de l'insuline, administrée par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal des mâles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	76
54	Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase au cours du stade nymphal chez les mâles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	77
55	Effets de la 20E, administrée par application topique le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les mâles d' <i>E.kuehniella</i> (m ± S.D, n = 6-8).	78
56	Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase au cours du stade nymphal chez les mâles d' <i>E. kuehniella</i> : ANOVA à deux critères de classification.	78
57	Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg) sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les mâles d' <i>E. kuehniella</i> : Classement par le test HSD de Tukey.	80

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le développement et la reproduction chez les insectes sont contrôlés par deux principales hormones qui sont l'hormone juvénile (HJ) et les ecdystéroïdes (Belles & Piulachs 2015); les ecdystéroïdes sont des stéroïdes polyhydroxylés qui sont impliqués dans le contrôle de processus essentiels comme l'embryogenèse, le développement post embryonnaire (Kozlova & thummel, 2003) mais aussi la reproduction (Baltaev & Shangaraeva, 2000).

Les ecdystéroïdes proviennent du cholestérol dont l'apport est exclusivement exogène (Lafont *et al.*, 2002; Neubueser *et al.*, 2005 ; Brown *et al.*, 2009) mais la biosynthèse de l'ecdysone reste complexe à ce jour (Fig. 1). Les cellules neurosécrétrices du cerveau sécrètent une neurohormone ou hormone prothoracicotrope (PTTH) qui agit sur les glandes prothoraciques (GP) pour la synthèse de l'ecdysone (E) *via* des enzymes codés par une famille de gènes « Halloween » incluant plusieurs cytochromes P450s (Gäde et Hoffman, 2005 ; Niwa *et al.*, 2010; Rewitz *et al.*, 2013). L'E, libérée dans l'hémolymphe, est ensuite convertie en 20-hydroxyecdysone (20E) dans les différents organes périphériques (Yoshiyama-Yanagawa *et al.*, 2011) ; cette conversion est réalisée par une mono-oxygénase P450 provenant du gène « Shade » (Petryk *et al.*, 2003 ; Niwa *et al.*, 2010). Chez certaines espèces où les G.P sont transitoires et dégènèrent à la mue adulte (Glitho *et al.*, 1979), la production des ecdystéroïdes est assurée par des sources alternatives comme l'épithélium folliculaire ovarien (Brown *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2002), les testicules (Loeb *et al.*, 1982; 1984), les oenocytes (Delbeque *et al.*,1990; Spindler *et al.*, 1991) ou encore l'épiderme (Soltani *et al.*, 1997). Les ecdysteroïdes exercent leurs effets sur les tissus cibles *via* l'interaction avec leurs récepteurs nucléaires « EcR ». L'EcR se lie ensuite à un partenaire de liaison ou Ultraspiracle « USP » formant ensemble un complexe hétérodimère (Yao *et al.*, 1992; Bonneton *et al.*, 2003; Henrich, 2005). L'activation de ce complexe initie diverses

cascades d'expression des gènes, qui conduisent à des changements physiologiques, morphologiques et comportementaux (Brown *et al.*, 2009; Quinn *et al.*, 2012).

Cependant, ce schéma classique de la synthèse des ecdystéroïdes (Fig. 2a) est, depuis peu, modifié du fait de la mise en évidence de l'intervention de nouveaux éléments entrant dans l'ecdystéroïdogénèse (Fig. 2b); ainsi, la synthèse d'ecdysone par les G.P est aussi déclenchée par une autre hormone, l'insuline ou insuline-like peptides (ILPs) (Yamanaka *et al.*, 2013) dont le rôle majeur est la régulation de la nutrition et du métabolisme glucidique et énergétique (Puig & Mattila, 2011; Hua, 2010). Les signaux nutritionnels, reflétant l'état métabolique général de l'insecte, agissent directement sur les G.P, en collaboration avec d'autres co-facteurs (TOR signaling, protéines kinases et l'oxyde nitrique) (Yamanaka *et al.*, 2013) (Fig. 3). L'élément TOR semble ne pas être le principal médiateur de la détection de la nutrition dans la GP, mais interagit avec la PTTH (Gu *et al.*, 2012; Song & Gilbert, 1994, 1995; Yamanaka *et al.*, 2013). Les protéines kinases MAPK (mitogen-activated protein kinase ou MAPK signaling) et TOR contrôlent la phosphorylation et l'activité du facteur d'initiation de la traduction (Ruvinsky & Meyuhass, 2006; Shahbazian *et al.*, 2006; Yamanaka *et al.*, 2013). L'oxyde nitrique (O.N) est directement relié au fonctionnement de certains récepteurs nucléaires (E75 et β FTZ-F1), exprimés dans la PG et nécessaires à l'ecdystéroïdogénèse (Bialecki *et al.*, 2002; Parvy *et al.*, 2005; Yamanaka *et al.*, 2013); en effet, l'O.N se lie à son récepteur E75 (Reinking *et al.*, 2005) pour induire l'expression de β FTZ-F1, qui à son tour régule l'expression des enzymes qui contrôlent la synthèse d'ecdysone (Yamanaka *et al.*, 2013). Ainsi, similairement aux vertébrés, les ILPs des insectes semblent contrôler d'autres fonctions comme le développement, la longévité, le métabolisme et la reproduction (Wu & Brown, 2006 ; Tatar *et al.*, 2003 ; Puig & Mattila, 2011; Antonova *et al.*, 2012; Hou *et al.* 2012).

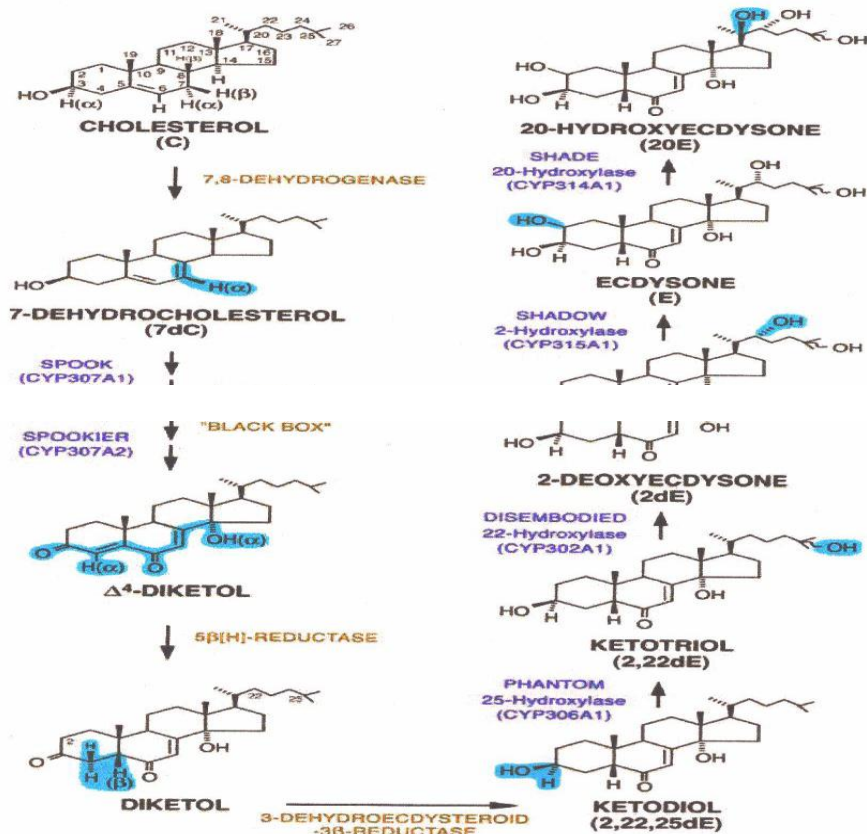


Figure 1. La biosynthèse de l'ecdysone (Gilbert & Rewitz, 2009)

L'insuline, sécrétée par des cellules productrices d'insuline «CPI», localisées dans un hémisphère du cerveau agit sur un récepteur unique, «InR ou récepteurs d'insuline» (Rulifson *et al.*, 2002). L'InR, récepteur transmembranaire à tyrosine kinase (RTK), consiste en un tétramère constitué par des hétérodimères α et β ; les sous-unités α définissent la spécificité de la liaison du ligand, tandis que les sous-unités β , jouent le rôle de médiateur du signal de l'insuline ou ILPs (White, 1998; Badisco *et al.*, 2013). Les ligands se fixent sur les sous-unités α et permettent la phosphorylation des sous-unités β induisant un changement de conformation (Yenush *et al.*, 1996 ; Patti & Kahn,1998; Badisco *et al.*, 2013) qui active la cascade des protéines kinases et le facteur de transcription nommé *Forkhead box class O* ou FoxO (Francis *et al.*, 2010; Puig & Mattila, 2011; Hou *et al.*, 2012 ; Antonova *et al.*, 2012). Ce même facteur est aussi retrouvé chez les insectes et est lié à la régulation dans la voie de

signalisation de l'ecdysone (Yamanaka *et al.* 2013 ; Herboso *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2016). La voie de signalisation de l'insuline, conservée dans l'évolution animale, et impliquant le facteur FoxO reste encore à l'étude chez les insectes (Herboso *et al.*, 2015; Wang & Zhao, 2016). Cependant et, malgré des voies de signalisation similaires, les Mammifères et les Insectes présentent des différences structurales au niveau des ILPs et des récepteurs (Colombani *et al.*, 2005, 2012; Garelli *et al.*, 2012). Par ailleurs, les ILP_s qui présentent des séquences d'acides aminés identiques avec l'insuline des Mammifères portent à la fois les fonctions métaboliques de l'insuline mais aussi les facteurs de croissance ou IGF (Puig & Mattila, 2011; Antonova *et al.*, 2012; Colombani *et al.*, 2012; Garelli *et al.*, 2012).

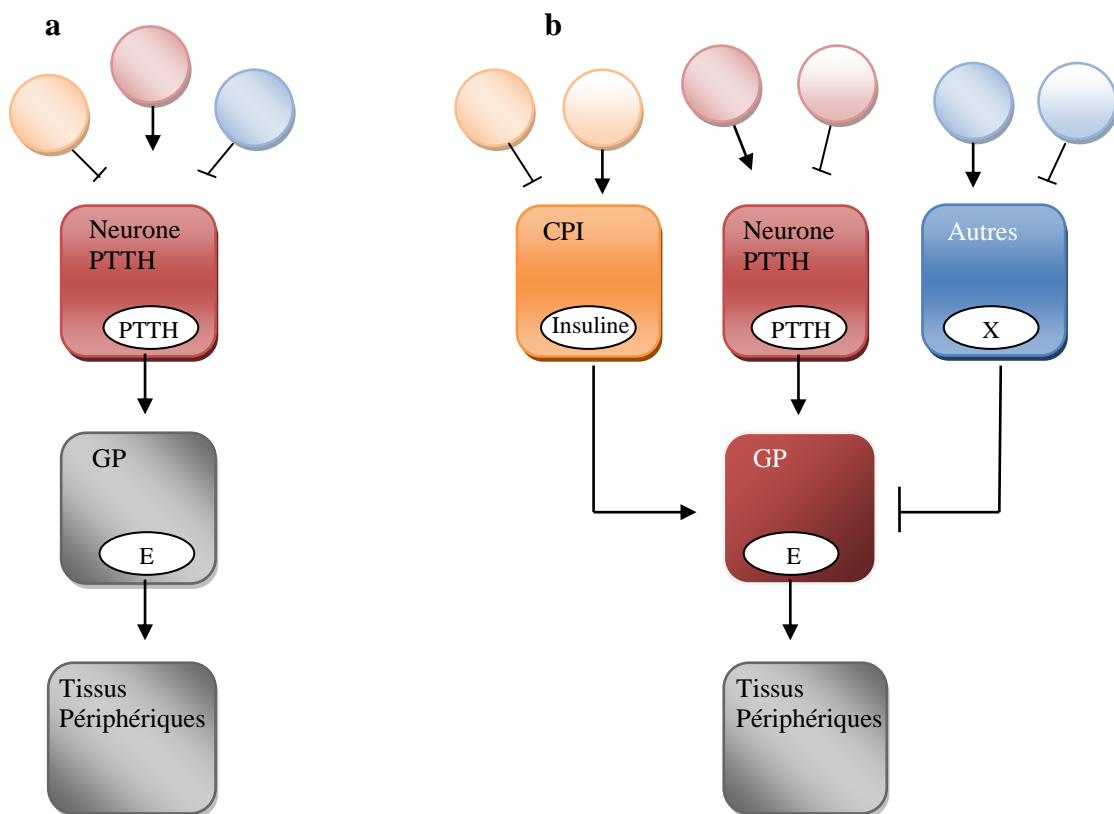


Figure 2. Endocrinologie de l'insecte : (a) schéma classique; (b) nouveau schéma (Yamanaka *et al.*, 2013). E : ecdysone, PTTH : hormone prothoracicotrope, PG : gland prothoracique, IPC : cellule productrice d'insuline, X : facteur prothoracostatique inconnu.

Des études antérieures indiquent que l'insuline bovine induit une réponse biologique chez les insectes mais ces effets physiologiques semblent nuancés entre les ILPs endogènes des insectes et l'insuline des Mammifères (Graf *et al.*, 1997; Riehle & Brown, 1999; Manière *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2008); en effet, la spécificité de la connexion, entre le ligand et les récepteurs d'insuline, peut expliquer les effets différents qui sont notés (Brown *et al.*, 2008). L'insuline bovine ou porcine, comparée aux ILPs endogènes des insectes, montrent des effets variables sur la vitellogénèse et la synthèse des ecdystéroïdes chez ces mêmes espèces (Brown *et al.*, 2008; Riehle & Brown, 1999 ; Colombani *et al.*, 2005); en effet, dans ces processus, l'insuline et la 20E agissent soit en synergie (Roy *et al.*, 2007; Rusten *et al.*, 2004; Francis *et al.*, 2010) soit de manière antagoniste (Colombani *et al.*, 2005). Par ailleurs, les ILPs endogènes sont, également, impliqués dans la régulation de la stéroïdogénèse ovarienne (Riehle & Brown, 1999; Maniere *et al.*, 2004). En outre, ces deux hormones (20E et insuline) montrent aussi un rôle clé sur le stress oxydatif chez les insectes; en effet, le pouvoir antioxydant de la 20E a été mis en évidence par Krishnan *et al.*, (2007) et l'insuline est citée pour moduler le stress oxydatif (Tettweiler *et al.*, 2005 ; Krishnan & Kodrík, 2011) *via* le facteur FoxO (Jünger *et al.*, 2003; Puig & Mattila, 2011).

De nombreuses interactions physiologiques et moléculaires, entre l'insuline et les hormones stéroïdes, ont été rapportées chez les insectes comme *Aedes aegypti* (Graf *et al.*, 1997; Roy *et al.* 2007), *Diacamma intricatum* (Okada *et al.* 2010), *Drosophila melanogaster* (Mirth & Shingleton, 2012; Herboso *et al.*, 2015), *Leptinotarsa decemlineata* (Fu *et al.*, 2016) ou encore *Helicoverpa armigera* (Cai *et al.*, 2016); cependant, ces interactions, notées dans le développement (mue et métamorphose) mais aussi dans la reproduction (Badisco *et al.*, 2013) ou encore le stress oxydatif (Puig & Mattila, 2011) ne sont pas encore bien établies chez les Mammifères. Colombani *et al.*, (2005) note que cette interaction fonctionnelle (insuline-hormones stéroïdes), présente chez les insectes, pourrait, si elle est conservée chez

l'homme, jouer un rôle important dans des pathologies cancéreuses et métaboliques où ces signalisations sont impliquées. Le facteur FoxO est présent chez les Mammifères (dont l'Homme) et les ecdystéroïdes sont capables de se lier aux récepteurs oestrogéniques en entraînant des effets similaires à ceux induits par les oestrogènes (Gao *et al.*, 2008; Kapur *et al.*, 2010; Jian *et al.* 2013); en effet, l'action de la 20E a été mise en évidence sur la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses chez les Mammifères.

L'insuline bovine ou porcine, testée chez les insectes, suggère, dans les études citées, une interaction avec les ecdystéroïdes mais qu'en est-il des effets de l'insuline humaine chez les insectes et quelle est son action comparée avec la 20E ? Ainsi, la présente étude a pour but d'examiner l'impact de l'insuline humaine et de la 20E, testées séparément chez *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Ce modèle biologique a fait l'objet de diverses études liées à la reproduction, au développement (Tefler, 2009), au profil hormonal (Elouaer *et al.* 2006; 2010) et à l'impact des agonistes de l'hormone de mue (Elouaer *et al.*, 2010; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). Chez les espèces de Lépidoptères, les ILPs ont été identifiés et, sont au nombre de 5 chez *Samia cynthia*, 2 chez *Agruis convolvuli* et 3 chez *Spodoptera littoralis* (Antonova *et al.*, 2012). Actuellement, peu de choses est connu sur la sécrétion des ILPs, l'interaction des récepteurs et leurs effets directs sur des processus spécifiques dans les tissus cibles des insectes (Antonova *et al.*, 2012).

L'objectif de ce travail est donc d'étudier les effets de l'insuline humaine et de la 20E sur quelques indicateurs de la reproduction (vitellogénines, vitellines, ecdystéroïdes ovariens et potentiel reproducteur) mais aussi sur le stress oxydatif de par, le rôle de ces hormones sur ces processus (Riehle & Brown, 1999; Maniere *et al.*, 2004; De Loof, 2008; Belles & Piulachs, 2015). Cependant, au préalable, il est impératif de préciser, chez l'insecte, les effets primaires de l'insuline humaine (glycogénèse et les interconversions associées); par conséquent, les métabolites biochimiques majeurs (glucides, protéines et lipides dans le corps gras) sont

examinés. Seules deux études ont rapportées que les ILPs synthétiques affectent directement la régulation du métabolisme chez les insectes (Antonova *et al.*, 2012). Les effets de la 20E sur le métabolisme sont également considérés de par, la possible relation entre les ILPs et les ecdystéroïdes dans le contrôle du métabolisme (Tatar *et al.*, 2003; Colombani *et al.*, 2005); par ailleurs, le rôle de la 20E dans le métabolisme protéique au cours de la métamorphose chez un autre Lépidoptère *Corcyra cephalonica* vient d'être citée (Rao *et al.*, 2016). Les résultats attendus pourront permettre une évaluation de l'action séparée de ces hormones afin de mieux comprendre leur interaction.

Dans ce tapuscrit, les résultats obtenus sur les effets de l'insuline humaine et de la 20E chez *E. kuehniella*, pour les différents paramètres évalués, sont présentés comme suit:

1/ principaux constituants biochimiques (sucres totaux, glycogène, protéines et lipides) dans le corps gras chez les chrysalides (mise en évidence des effets primaires).

2/ vitellogénines chez les chrysalides femelles et vitellines ovariennes chez les adultes (traitement simple et combiné)

3/ ecdystéroïdes ovariens chez les femelles adultes.

4/ potentiel reproducteur chez les femelles adultes (période de préoviposition, période d'oviposition, fécondité ou nombre d'oeufs pondus et fertilité ou pourcentage d'éclosion).

5/ stress oxydatif (activité spécifique de la catalase), chez les chrysalides mâles et femelles.

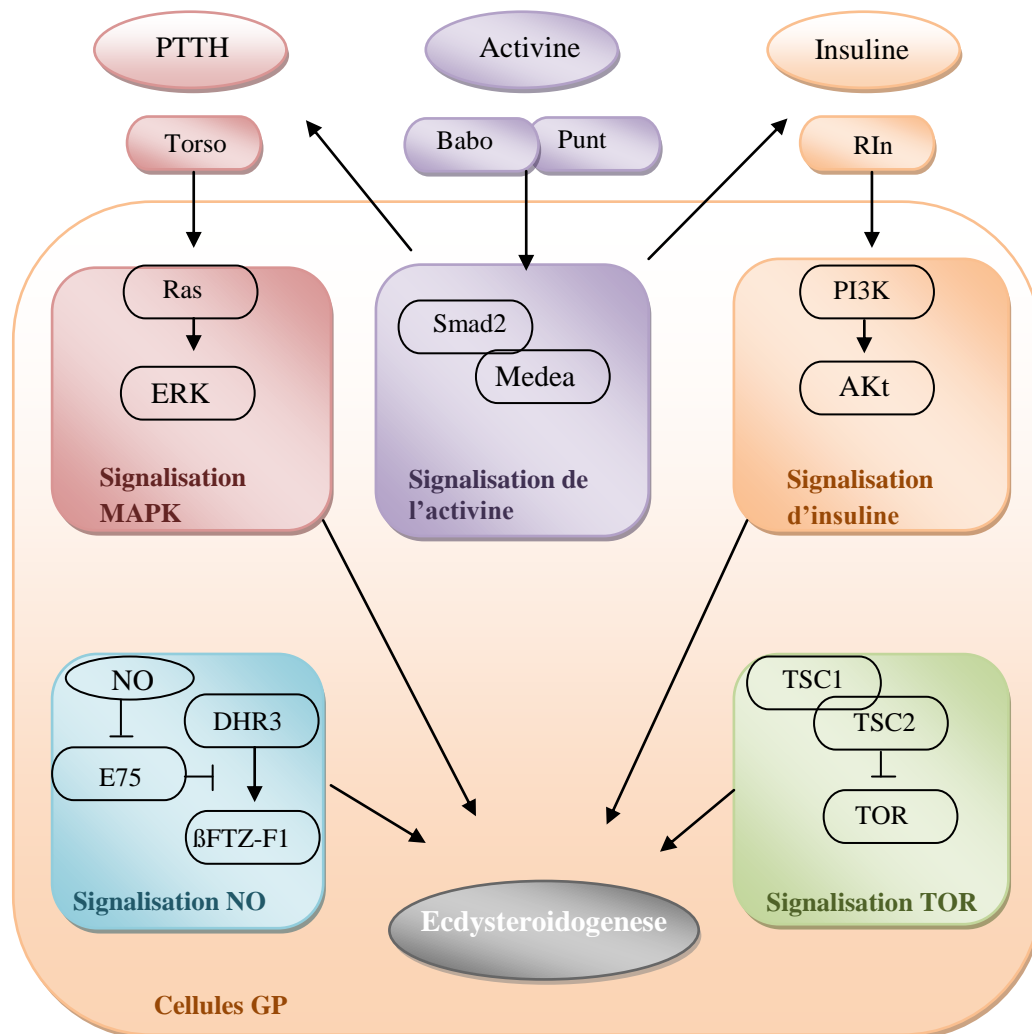


Figure 3. Voies de signalisation régulant l'ecdystéroïdogénèse dans la glande prothoracique chez *D. melanogaster*. (Yamanaka *et al.*, 2013). PG : glande prothoracique, PTHH : hormone prothoracicotrope, MAPK : protéines kinases, NO : oxide nitrique, InR : récepteur d'insuline, TOR : la cible de la rapamycine, ERK : kinases régulées par des signaux extracellulaires, PI3K : Phosphoinositide 3-kinase, Babo : gène codant pour la protéine kinase, AKt : protéine kinase B, DHR3 : Récepteur nucléaire *Drosophila*, E 75 : récepteur nucléaire d'ecdysone, βFTZ-F1 : un récepteur nucléaire régulant l'ecdysone, TSC : Le gène qui code pour des protéines, Torso : récepteur membranaire, Ras : protéine GTPase, Smad : protéine codante pour un gène, Medea : protéine codante

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Présentation du matériel biologique

Ephestia kuehniella (Zeller, 1877), insecte lépidoptère nocturne et holométabole, existe dans les régions tempérées et méditerranéennes (Balachowsky, 1972). Cet insecte est un ravageur des denrées stockées et cause des nuisances aux grains de céréales, biscuits, pâtes alimentaires, chocolat et riz; néanmoins, il montre une nette préférence pour la farine d'où son nom «Pyrale de la farine ». *E. kuehniella* est aussi une source d'allergène et peut donc provoquer de l'asthme et des rhinites (Bataille *et al.*, 1995; Cipola *et al.*, 1996). Parallèlement à son intérêt économique, *E. kuehniella* constitue, du fait de son élevage facile et de son cycle de développement court, un modèle biologique de laboratoire intéressant pour différentes études. Le développement chez *E. kuehniella* passe par 4 stades (Fig. 4) qui sont : œuf, larve ou chenille, nymphe ou chrysalide, adulte ou papillon (Balachowsky, 1972).

L'œuf, de couleur blanchâtre et de forme ovoïde, présente une longueur de 440 µm, et une largeur de 250 µm. Il est utilisé dans la lutte biologique comme aliment pour l'élevage des prédateurs naturels et présente de ce fait une valeur économique (Lynn & Ferkovich, 2004)

La larve, de couleur blanc rosé, mesure 9 à 15 mm de long. Dès l'éclosion, la larve s'alimentant directement, est caractérisée par un déplacement rapide et une vive activité de filage. Les larves du dernier stade débutent leur nymphose en tissant une enveloppe de soie ou « cocon » pour former la chrysalide. A ce stade, les mâles se différencient des femelles par la présence, sur la face dorsale, d'une tache sombre correspondant aux testicules.

La chrysalide, stade immobile où se produit la métamorphose, correspond à un cocon dans lequel la nymphe évoluera pendant 8 à 12 jours; ce cocon, de couleur brunâtre mesure environ 9 à 10 mm de long et devient de plus en plus foncé avec l'âge.

L'adulte, 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. Les mâles meurent, en général, 1 à 3 jours après l'accouplement et les femelles 3 à 4 jours après la ponte. La femelle pond environ 100 à 200 œufs pendant une période de 3 jours.

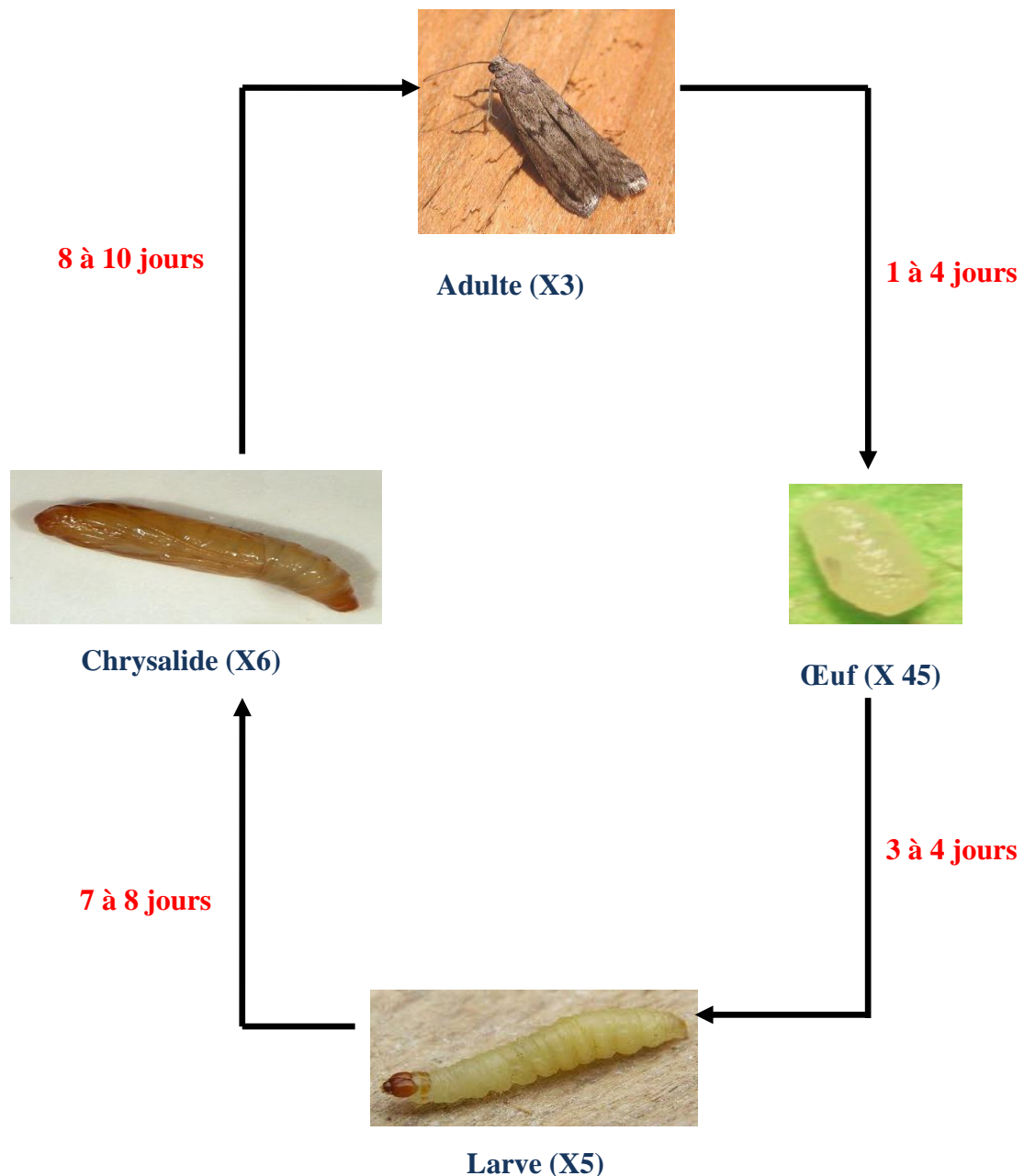


Figure 4. Cycle de développement d'*E. kuehniella* à 25°C.
Photos : www.aramel.free.fr

2. Elevage en laboratoire

L'élevage est réalisé dans des bocaux en verre contenant de la farine et recouverts par un morceau de tulle. L'élevage est maintenu dans des conditions contrôlées de température et d'humidité (25°C et 70 % environ). Les larves du dernier stade récoltées à la surface du tulle, sont séparées en fonction de leur sexe, et déposées dans des boîtes en plastique contenant de la farine et du papier plissé pour la nymphose.

L'élevage est suivi quotidiennement et les chrysalides nouvellement exuviées (0 jour) sont utilisées pour l'expérimentation. Les nymphes sont datées en fonction de leur âge (jours) après l'exuviation nymphale. Dans les conditions de laboratoire, le développement nymphal est de 9 jours environ.

3. Présentation des hormones

L'insuline humaine est un peptide à 2 chaînes d'acides aminés : une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Ces deux chaînes sont reliées par 2 ponts disulfures mais, la chaîne A comporte, aussi, 1 pont disulfure intrachaine ; tous les ponts disulfures sont reliés à des cystéines. La formule chimique de l'insuline est $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ et la masse moléculaire de 5807 g/mol. (Fig. 5).

La 20 hydroxyecdysone est un stéroïde, provenant du cholestérol; cette hormone est caractérisée par un noyau stérol portant une jonction *cis* des cycles A et B, un chromophore 6-one-7-ène sur le cycle B et un hydroxyle en position 14. Sa formule chimique est $C_{27}H_{44}O_7$ et la masse molaire de 480,64 g/mol (Fig. 6).

4. Traitements

La 20 hydroxyecdysone et l'insuline ont été administrées par application topique (Jeffers *et al.*, 2014; Gu & Chow, 2003). Les doses de 5 et 10 µg ont été choisies en se basant sur la littérature (El-Ouaer *et al.* 2010, Roy *et al.* 2007); une quantité de 3µl a été déposée sur la face latéro-ventrale de l'abdomen des chrysalides nouvellement exuviées (< 6 h et sans

cocon). Les séries témoins reçoivent 3µl de solvant (acétone). L'acétone permet une meilleure diffusion à travers la cuticule. L'insuline est soluble dans les solvants organiques (Brange, 1987) et sa solubilité dans l'acétone est citée dans la littérature (Bergeron *et al.*, 2003). En outre, des études antérieures ont montré que chez *E. kuehniella*, l'acétone n'a pas d'effet significatif, comparativement aux séries traitées (El Ouar *et al.*, 2006).

4.1. Traitement simple: La 20 hydroxyecdysone ou l'insuline ont été administrées, séparément, le jour de l'exuviation nymphale.

4.2. Traitement combiné: La 20E est appliquée le jour de l'exuviation nymphale (5 ou 10 µg) puis l'insuline (5 ou 10 µg) à deux périodes différentes du stade nymphal (3 ou 5 jours); ces deux temps correspondent respectivement à la phase ascendante et descendante du pic des ecdystéroïdes coïncidant avec la vitellogénèse (El-Ouaer *et al.* 2010).

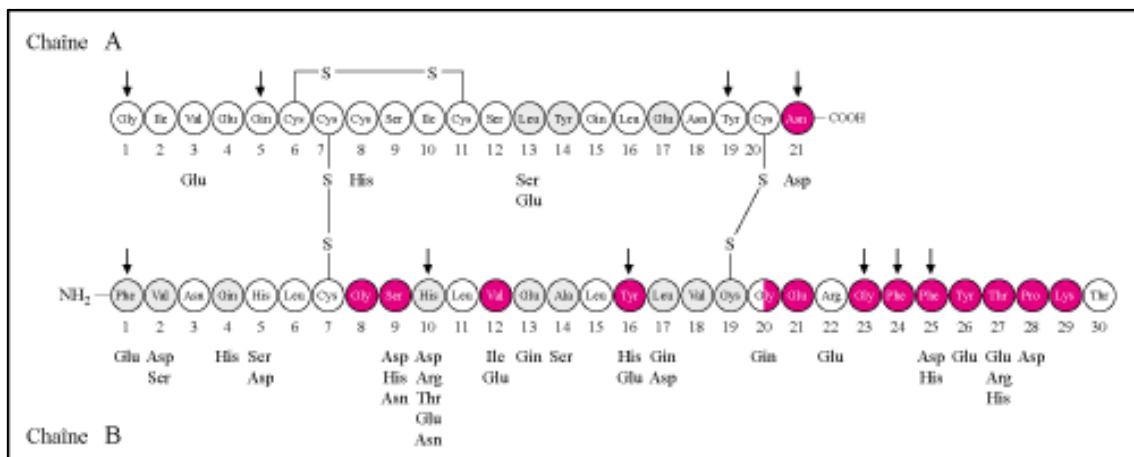


Figure 5. Structure chimique de l'insuline humaine. Photo : www.jle.com

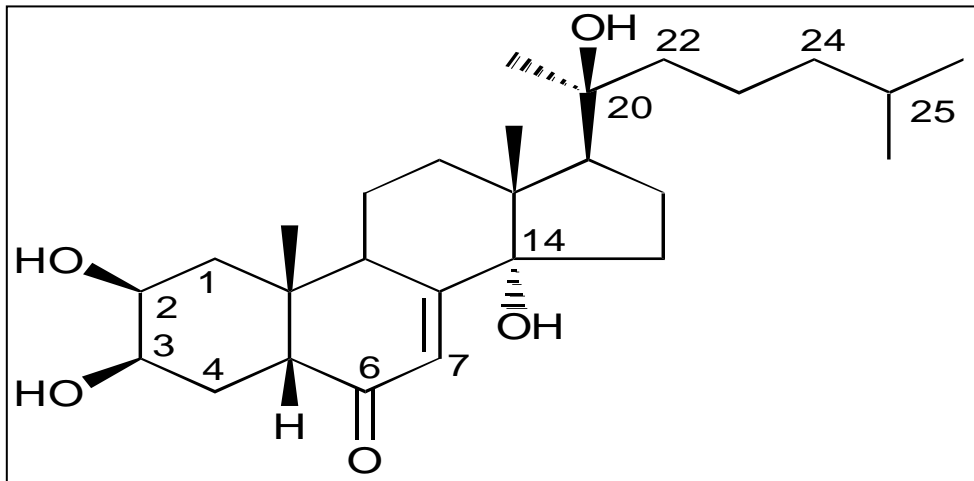


Figure 6. Structure chimique de la 20-hydroxyecdysone.

Photo : www.researchgate.net

5. Extraction et dosage des métabolites dans le corps gras.

Les corps gras des chrysalides femelles témoins et traitées d'*E. kuehniella*, prélevés à 0, 1, 3, 5 et 7 jours ont été pesés puis conservés au froid (-20°C) dans 300 µL d'acide trichloracétique (TCA à 20% d'eau distillée) jusqu'à leur analyse (Fig. 7).

L'extraction des sucres totaux, protéines et lipides a été réalisée selon le procédé de Schibko *et al.* (1966), et celle du glycogène selon Van Handel (1965).

Le dosage du glycogène et des sucres totaux a été effectué selon Duchateau & Florkin (1959) qui utilise, l'antrone¹ comme réactif et une solution mère de glycogène (0,1 mg/ml d'eau distillée) ou de glucose (1mg/ml d'eau distillée) comme standard (Tab. 1 et 2). Les absorbances ont été lues à 620nm.

La quantification des protéines a été réalisée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Comassie² (G250, Merck) comme réactif, et l'albumine de sérum de bœuf (BSA, Sigma) comme standard à (1 mg/ml) (Tab. 3). Les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595nm.

Les lipides ont été déterminés selon la méthode de Glodsworthy *et al.* (1972) utilisant la vanilline³ comme réactif et une solution mère de lipides⁴ (2,5 mg/ml) comme standard (Tab. 4). Les absorbances ont été lues après 30 minutes à une longueur d'onde de 530 nm.

Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µl et les contenus des différents métabolites du corps gras ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références. Les expérimentations sont conduites avec 6 à 8 répétitions par âge pour chaque série.

1 : 150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique concentré (96%), 25 ml d'eau distillée.

2 : 100mg de bleu brillant de Comassie ,50 ml d'éthanol absolu 95°, 100ml d'acide orthophosphorique à 85% et complété à 1L avec de l'eau distillée

3 : 0,38 g de vanilline, 55 ml d'eau distillée et 195 ml d'acide orthophosphorique à 85 %

4 : 25 mg d'huile de table pesée dans un tube eppendorf; cette quantité est ensuite reprise dans 10 ml du mélange (éther / chloroforme ; V/V)

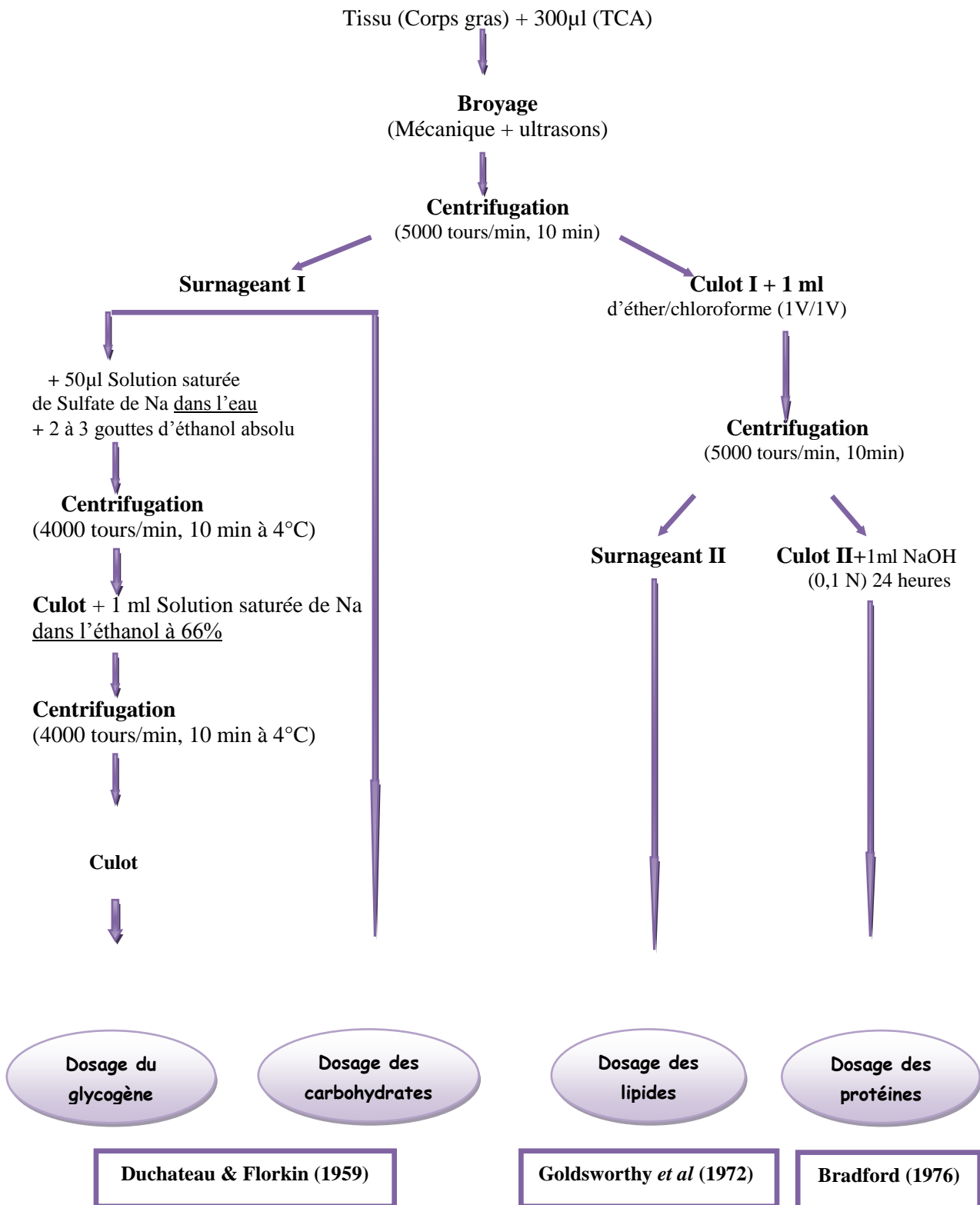


Figure 7. Principales étapes d'extraction des carbohydrates, glycogène protéines, glucides et lipides (Shibko *et al.*, 1966 ; Van Handel, 1964) et leurs dosages.

Tableau 1. Dosage du glycogène dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Glycogène (µl)	0	20	40	60	80	100
Quantité de glycogène (µg)	0	2	4	6	8	10
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	2	2	2	2	2	2

Tableau 2. Dosage des glucides dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Quantité de glucose (µg)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau 3. Dosage des protéines dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau 4. Dosage des lipides dans le corps gras: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Quantité de lipides (µg)	0	50	100	150	200	250
Solvant Ether/Chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Vaniline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

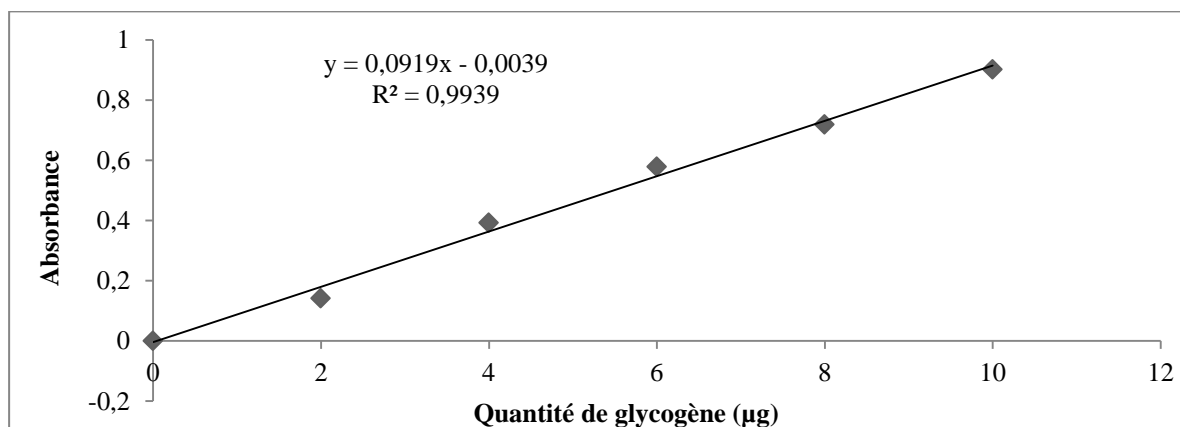


Figure 8. Dosage du glycogène dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glycogène (µg) (R^2 : coefficient de détermination)

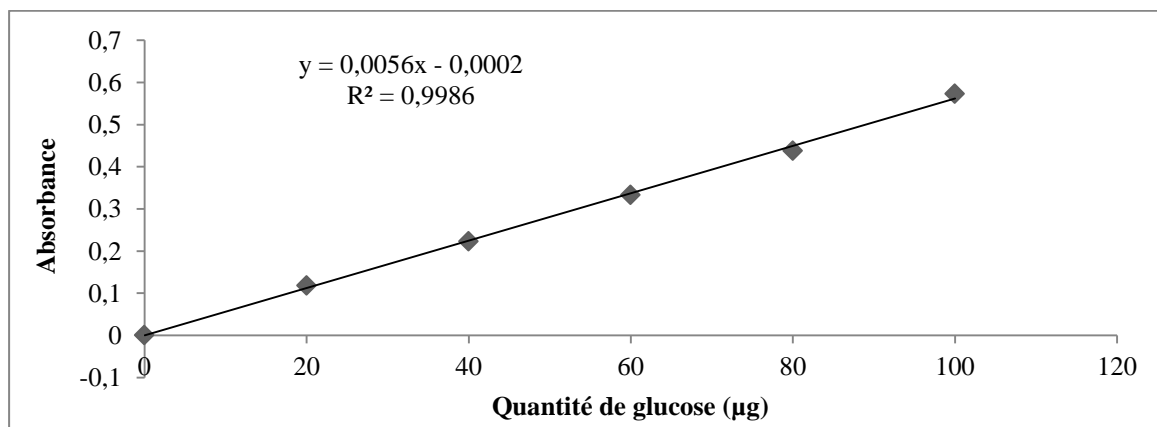


Figure 9. Dosage des glucides dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose (µg).

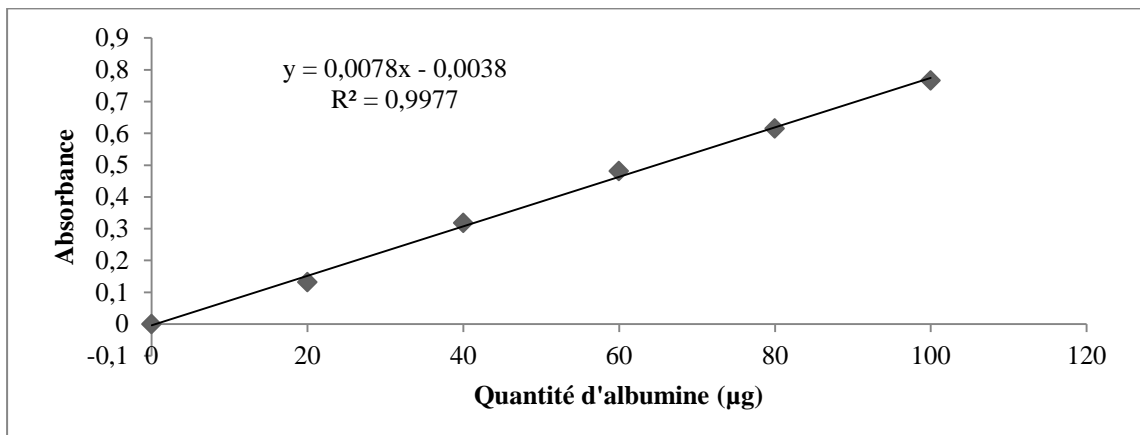


Figure 10. Dosage des protéines dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).

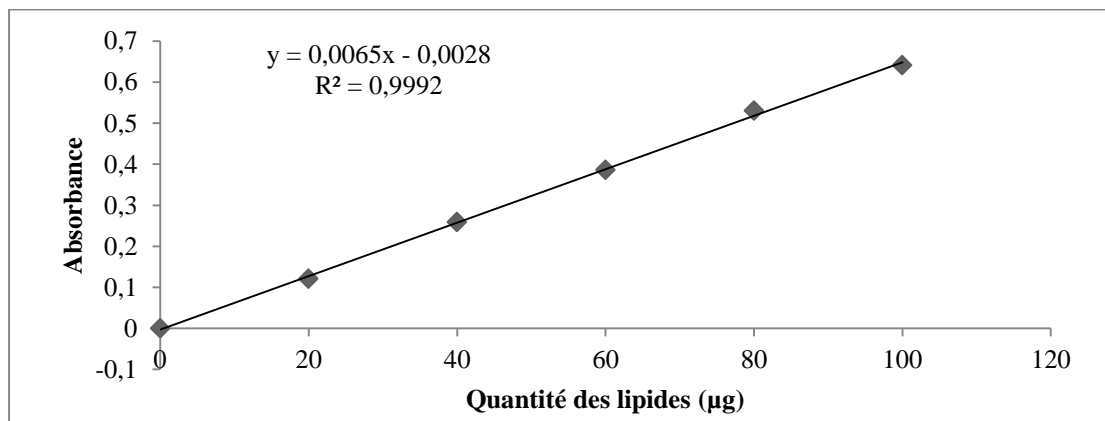


Figure 11. Dosage des lipides dans le corps gras : droite étalon exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table (µg).

6. Dosage des ecdystéroïdes ovariens

Les ovaires des adultes femelles, nouvellement émergées (0j), des séries témoins et traitées, sont prélevés pesés puis additionnés de 500µl de méthanol (permet aussi l'extraction des ecdystéroïdes). Les échantillons sont ensuite conservés au froid (-20°C) jusqu'au dosage. Avant le dosage, les échantillons sont broyés puis centrifugés (2700 tours/min pendant 10 minutes); le surnageant est ensuite récupéré puis évaporé dans un bain à sec; les extraits secs (correspondant aux ecdystéroïdes libres) sont alors récupérés dans 500µl de tampon phosphate (pH : 7,4 ; 0,1M)¹ préalablement préparé.

Les ecdystéroïdes libres ovariens ont été dosés selon la technique immunoenzymatique ou EIA (De Reggi *et al.*, 1992 ; Aribi *et al.*, 1997). Cette dernière repose sur le principe de la compétition entre le traceur enzymatique qui est la peroxydase couplée à la 2-succinyl 20 hydroxyecdysone et les ecdystéroïdes des extraits biologiques pour les sites limités d'un anticorps anti-ecdystéroïdes. Les complexes formés seront ensuite fixés par un second anticorps (anti-immunoglobuline ou anti-IgG) de lapin (EIA polyclonal), déposés préalablement au cours d'un coating au fond des puits des microplaques à 96 puits (NUNC Immunoplate Maxisorp F96, Danemark). Au bout de 3 heures d'incubation, les éléments non retenus seront éliminés au cours d'un rinçage des plaques par un tampon de lavage². La révélation ou la coloration est réalisée grâce à un réactif de la peroxydase qui est la tétraméthylbenzidine ou TMB (Sigma France). Cette étape se fait sous agitation pendant 15 à 30 minutes et les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (labsystem, Finlande) à 630 nm ou 450 nm sans ou avec addition d'H₂SO₄ (2N), respectivement. La coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'ecdystéroïdes contenue dans les échantillons. Les résultats sont exprimés en picogrammes équivalent 20-hydroxyecdysone (pg équiv. 20E). Les résultats sont calculés à partir d'une courbe étalon, établie grâce à différentes concentrations de 20E (10⁻⁷M à 10⁻¹³M), réalisées à partir d'une solution mère (10⁻⁶M). Six à huit répétitions, pour chaque série, sont analysées individuellement. Le calcul des quantités d'ecdystéroïdes se fait grâce à la formule suivante :

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

B : Absorbance de l'échantillon ou du standard.

B₀ : Absorbance en absence de l'hormone (témoin ou tampon phosphate).

T : Absorbance en absence d'hormone et d'anticorps (blanc).

1 : 100 ml tampon phosphate; 23,4g Na Cl 0,4 M; 0,37g EDTA (Ethylène diamine tétra acétique acide); 1g BSA (sérum albumine bovine) complété avec à 1 L d'eau distillée.

2 : 5 ml solution mère, 250 ml Tween 20, Compléter à 500 ml avec de l'eau distillé.

Tableau 5. Analyse quantitative des ecdystéroïdes ovariens chez les adultes femelles *d'E kuehniella* traitées à l'insuline (5, 10µg) et à la 20E (5, 10µg) : courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de 20-hydroxyecdysone (20E).

Solution standard	Concentration (M)	B/B ₀
1	10 ⁻¹⁴	100,0
2	10 ⁻¹³	88,0
3	10 ⁻¹²	51,0
4	10 ⁻¹¹	19,5
5	10 ⁻¹⁰	8,0
6	10 ⁻⁹	3,9
7	10 ⁻⁸	1,2
8	10 ⁻⁷	0,4

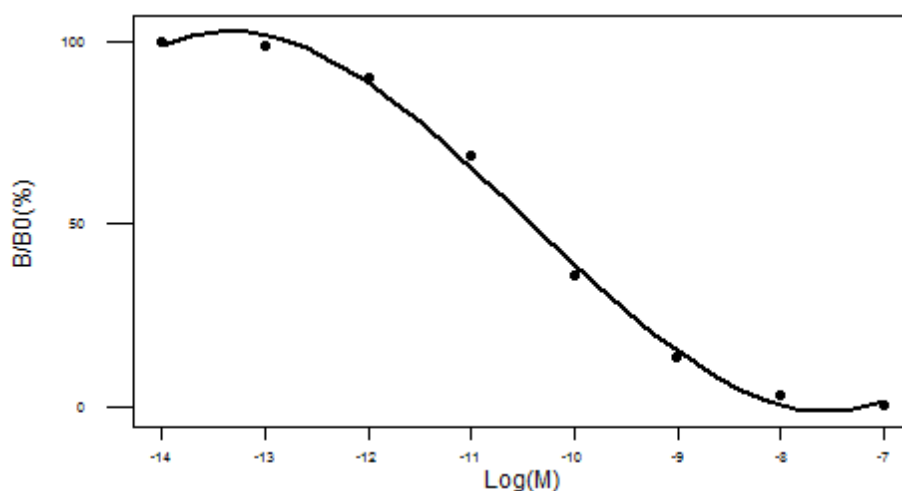


Figure 12. Analyse quantitative des ecdystéroïdes ovariens chez les adultes femelles *d'E kuehniella* traitées à l'insuline (5, 10µg) et à la 20E (5, 10µg) : courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de 20-hydroxyecdysone (20E).

7. Extraction et dosage des vitellogenines et des vitellines

Pour le dosage des vitellogénines, les corps gras ont été prélevés à partir des chrysalides femelles, à différents âges (0, 1, 3, 5 et 7j), des séries témoins et traitées. Pour le dosage des vitellines, les ovaires des adultes femelles, nouvellement émergées (0 jour), des séries témoins et traitées, sont disséqués puis prélevés. Les échantillons biologiques sont pesés puis conservés dans un tampon Tris-HCL-NaCl (pH 7,4). L'extraction des vitellogénines et vitellines, est effectuée selon Postlethwait *et al.*, (1980) et Fabre *et al.*, (1990). Les échantillons sont extraits après une homogénéisation dans le tampon Tris-HCl¹ puis une centrifugation à 5000 tours/mn pendant 10 minutes. Le dosage des vitellogénines et des vitellines (en fonction des échantillons) a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976) explicitée plus haut (voir 2.5). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu. Les expérimentations sont conduites avec 6 à 8 répétitions par âge pour chaque série.

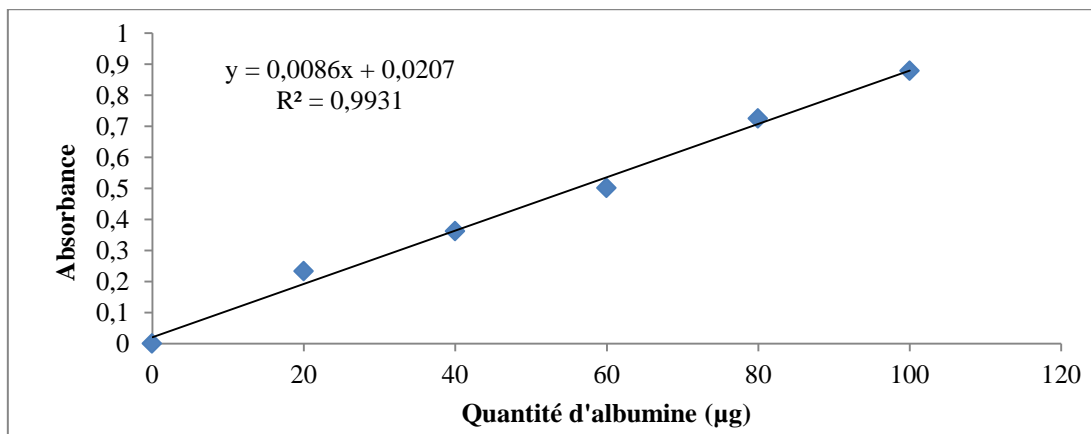


Figure 13. Dosage des vitellogenines dans le corps gras et des vitellines ovariennes : droite étalon exprimant l'absorbances à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (μg).

1 : La solution Tris-Hcl, consiste à diluer 3,02 g de tris (0,5 M) dans 300 ml d'eau distillée, puis ajuster cette solution à un pH de 7,4 avec de l'HCl concentré puis compléter à 500 ml d'eau distillée. Pour réaliser le tampon: diluer 2,9 g de Nacl (0,5 M) dans 10 ml de la solution mère de Tris-HCl et compléter à 100 ml d'eau distillée.

8. Détermination du potentiel reproducteur

Les adultes femelles, nouvellement émergées, provenant des chrysalides d'*E. kuehniella*, traitées séparément aux deux doses (5, 10 µg) de 20E ou d'insuline, sont accouplées avec des mâles non traités. Les différentes séries de couples sont maintenues dans des conditions contrôlées et un suivi régulier a permis de déterminer la

- durée de la période de préoviposition: nombre de jours entre l'émergence et le début de la ponte.
- durée de la période d'oviposition ou durée (en jours) de la ponte.
- fécondité des femelles: nombre total d'œufs pondus par femelle
- viabilité des œufs ou pourcentage d'éclosion: nombre d'œufs éclos sur le nombre total d'œufs pondus par femelle.

9. Dosage de la catalase

Les chrysalides mâles et femelles, des séries témoins et traitées sont broyées dans 1 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 7). L'homogénat obtenu est centrifugé à 15000 tours pendant 15 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

L'activité de la Catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Claiborne *et al.*, 1985. Elle est basée sur la mesure des absorbances après la réduction de H₂O₂. Le dosage est effectué sur 50µl de surnageant auquel on ajoute 750µl de tampon phosphate (100mM, pH 7,4) et 200 µl d'eau oxygénée H₂O₂ (500mM). La lecture des absorbances s'effectue toutes les 5 secondes pendant 30 secondes à une longueur d'onde de 240 nm dans un spectrophotomètre UV contre un blanc préparé avec 800µl de tampon phosphate (100mM, pH 7,4) et 200µl d'eau oxygénée H₂O₂ (500mM). La concentration en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford (voir la section 2.5). Les expérimentations sont conduites avec 6 à 8 répétitions par âge pour chaque série. L'activité spécifique est déterminée selon la formule suivante

$$CAT \text{ (M/min/mg de protéines)} = \Delta D_0 / \text{min} / 0,043 \times \text{mg de protéines}$$

$\Delta D_0 = \Delta D_0 / \text{mn}$ (blanc) - $\Delta D_0 / \text{mn}$ (Echantillon)

0,043 Mol⁻¹ : coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène.

Mg de protéines : quantité de protéines

Les résultats obtenus dans ce travail sont exprimés en $\mu\text{M/min/mg}$ de protéines

10. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne des différentes répétitions et leur écart type ($m \pm S. D$). Pour toutes les séries de données et avant l'utilisation de tests paramétriques, l'égalité des variances a été confirmée grâce au test de Levene. Les données ont été analysées avec le test t de Student mais aussi avec des analyses de variance à un ou deux critères de classification (au seuil de 5%); le test *post-hoc* de Tuckey (test HSD) a permis le classement des différents effets. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant GraphPad prisme version 6.01 (GraphPad software, www.Graphpad.com).

RESULTATS

RESULTATS

1. Effets de l'insuline et de la 20E sur la biochimie du corps gras

Les effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5 et 10 µg) par application topique, le jour de l'exuviation nymphale des femelles d'*E. kuehniella*, ont été évalués, sur les contenus des principaux métabolites (carbohydrates, glycogène, lipides et protéines) tout au long de ce même stade (1, 3, 5 et 7 jours).

1.1. Contenu en carbohydrates

Chez les chrysalides femelles témoins, les valeurs du contenu en carbohydrates, dans le corps gras à 0, 1, 3, 5 et 7 jours sont précisées dans le tableau 6. Il apparait que le contenu en carbohydrates diminue significativement à 5 ($p = 0,01$) et 7 jours ($p = 0,002$).

1.1.1. Effets de l'insuline

Chez les individus traités à l'insuline (5 et 10 µg), une augmentation dans le contenu en carbohydrates est notée dès le jour 1. La réduction observée, au cours du stade, chez la série témoin est retrouvée aux mêmes âges chez les séries traitées (5 et 7 jours) à la dose la plus forte mais seulement à 7 jours à la faible dose.

La comparaison entre les séries témoins et traitées à l'insuline révèle, aux deux doses testées (5 et 10 µg), une augmentation dans le contenu en carbohydrates dans les corps gras, à 1 ($p = 0,0003$; $p = 0,0005$), 3 ($p = 0,0005$; $p = 0,0002$) 5 ($p = 0,0002$; $p = 0,001$) et 7 jours ($p = 0,0001$; $p = 0,001$). Le traitement montre un effet dose-dépendant, avec des valeurs plus importantes au jour 5 ($p = 0,02$) mais aussi au jour 7 ($p = 0,01$) à la dose la plus faible (5 µg) (Tab. 6).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 7), révèle un effet traitement, un effet âge et une interaction traitement âge significatifs.

Tableau 6. Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8).

Traitement Jours	Témoin	Insuline (5µg)	Insuline (10µg)
0	271,20 ± 12,90 A		
1	261,90 ± 8,60 a A	332,70 ± 3,10 b B	357,30 ± 10,80 b B
3	256,00 ± 9,20 a A	336,30 ± 7,30 b B	357,30 ± 8,50 b B
5	206,70 ± 100 a B	316,90 ± 8,80 b B	281,60 ± 8,20 c C
7	143,60 ± 6,60 a C	249,20 ± 9,60 b A	205,20 ± 9,50 c D

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges (p <5 %).

Tableau 7. Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	36,96	2	18,48	7,45	0,01**
Age	4559	4	1140	459,90	0,001***
Interaction	3190	8	398,80	160,90	0,001***
Erreur résiduelle	114,00	46	2,47		

*** : très hautement significatif; ** : hautement significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

1.1.2. Effets de la 20E

Chez les individus traités à la 20E, la réduction dans les carbohydrates, aux cours du stade, est notée à la dose la plus faible, aux mêmes âges que chez les témoins (5 et 7 jours) mais à 3 et 7 jours à la forte dose. L'augmentation dans le contenu en carbohydrates, au jour 1 est observée seulement à la dose la plus faible.

La 20E, administrée à 5 et 10 µg, entraîne, comparativement aux témoins, une augmentation significative dans le contenu en carbohydrates au jour 3 à la dose la plus faible ($p = 0,02$), au jour 5 aux deux doses testées ($p = 0,006$; $p = 0,03$) et au jour 7, seulement, à la dose la plus élevée ($p = 0,001$) (Tab. 8).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classifications révèlent un effet traitement, un effet âge et une interaction traitement-âge très hautement significatifs (Tab .9).

Tableau 8. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n= 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	20E (5µg)	20E (10µg)
0	271,20 ± 12,90 A		
1	261,90 ± 8,60 a A	292,70 ± 8,60 a B	273,30 ± 6,40 a A
3	256 ± 9,20 a A	308,40 ± 15 b B	244,10 ± 5,40 a B
5	206,70 ± 10 a B	257,70 ± 7,40 b C	244,90 ± 10,20 b B
7	143,60 ± 6,60 a C	1350± 6,10 a D	205,10 ± 9,50 b C

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Tableau 9. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8) : ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	144,50	2	72,25	27,21	0,001***
Age	3120	4	780,10	293,80	0,001***
Interaction	2368	8	296	111,50	0,001***
Erreur résiduelle	122,20	46	2,65		

*** : très hautement significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

1.1.3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en carbohydrates dans le corps gras

Les deux molécules induisent une augmentation dans la teneur en carbohydrates. La comparaison des moyennes montre que l'insuline a un effet plus important que la que la 20E sur le contenu en carbohydrates particulièrement à 1 et 3 jours avec les deux doses testés (Fig.14).

L'analyse de la variance à un critère de classification, confirme ces résultats et révèle des différences très hautement significatives ($p < 0,001$) à 1, 3, 5 et 7 jours pour les deux doses (5 et 10µg).

Le tableau 10 révèle, grâce au test HSD de Tuckey, l'existence de deux groupes au jour 1 et de 3 groupes aux jours 3, 5 et 7.

L'insuline montre un effet plus important que la 20E à 1 jour aux deux doses, à 3 jours à la dose la plus forte et aux jours 5 et 7 à la dose la plus faible. L'insuline entraîne une augmentation dans le contenu en carbohydrates, dans les corps gras, à tous les âges testés; cet effet est comparable pour les deux doses, excepté à 7 jours où c'est la dose la plus faible qui entraîne la hausse la plus importante.

La 20E a un effet similaire à l'insuline aux jours 3 et 5 à la faible dose et au jour 7 à la dose la plus forte (10 µg). La 20E n'a pas d'effet au jour 1 aux deux doses, à 3 et 5 j à la dose la plus forte et au jour 7 à faible dose.

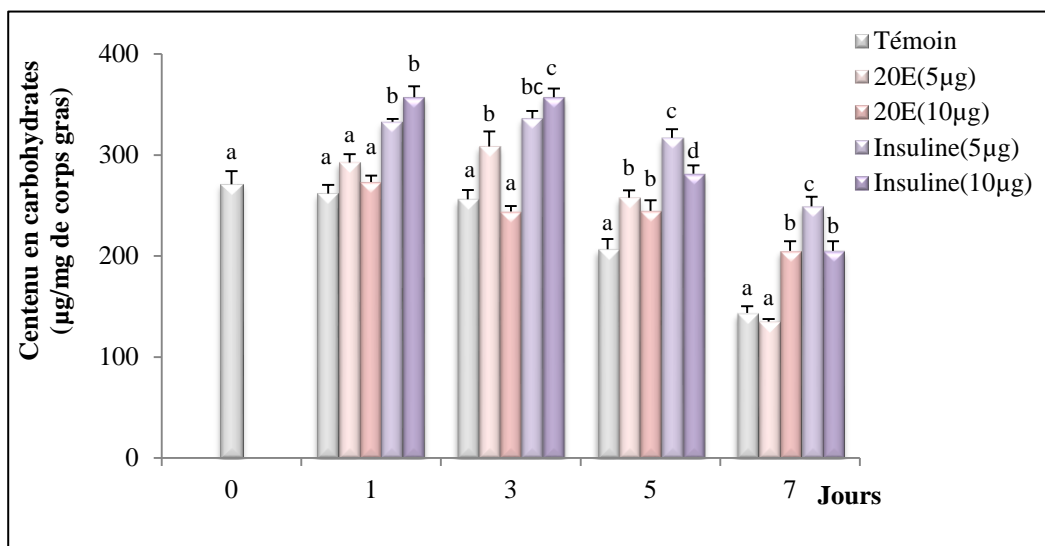


Figure 14. Effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg), séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en carbohydrates dans le corps gras (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, n= 6-8).

Les lettres minuscules comparent les valeurs pour un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

Tableau 10. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur le contenu en carbohydrates (µg/mg de tissu) dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	Insuline (10µg)	357,20	A
	Insuline (5µg)	332,70	A
	20E (5µg)	292,60	B
	20E (10µg)	273,30	B
	Témoin	261,80	B
3	Insuline (10µg)	357,20	A
	Insuline (5µg)	336,30	AB
	20E (5µg)	308,30	B
	Témoin	255,90	C
	20E (10µg)	244,10	C
5	Insuline (5µg)	316,90	A
	Insuline (10µg)	281,60	AB
	20E (5µg)	257,60	B
	20E (10µg)	244,90	BC
	Témoin	206,70	C
7	Insuline (5µg)	249,10	A
	Insuline (10µg)	205,10	B
	20E (10µg)	205	B
	Témoin	143,50	C
	20E (5µg)	134,90	C

1.2. Contenu en glycogène

Chez les chrysalides femelles témoins, les valeurs du contenu en glycogène dans le corps gras au cours du stade nymphal, sont précisées dans le tableau 11. Il apparaît que le contenu en glycogène diminue aux jours 3 ($p = 0,02$), 5 ($p = 0,003$) et 7 ($p = 0,02$) chez les nymphes d'*E. kuehniella* (Tab. 11).

1.2.1. Effets de l'Insuline

Les chrysalides d'*E. kuehniella*, traitées à l'insuline, montrent également une réduction dans leur contenu en glycogène au jour 7 et aux deux doses testées.

La comparaison entre les séries témoins et traitées révèle des valeurs plus importantes dans le contenu en glycogène, au jour 5 du stade nymphal à 5 μg ($p = 0,01$) et 10 μg ($p = 0,001$) mais également, au jour 7 à la dose la plus forte seulement ($p = 0,005$).

Tableau 11. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 μg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	Insuline (5 μg)	Insuline (10 μg)
0	134 \pm 15,50 A		
1	126 \pm 8,80 a A	127,90 \pm 5,40 a A	141,40 \pm 7,50 a A
3	106,80 \pm 4,90 a B	111,30 \pm 7,10 a A	122,40 \pm 6,80 a A
5	66,50 \pm 2,50 a C	110 \pm 12,50 b A	129,60 \pm 4,30 b A
7	48,50 \pm 5,70 a D	65,90 \pm 5,60 ab B	86,30 \pm 6,90 b B

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres en majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab 12), révèlent un effet traitement, un effet âge et une interaction traitement-âge significatifs ($p < 0,001$).

Tableau 12. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène dans le corps gras ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au cours du stade nymphal des femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n= 6-8$) : ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	23,14	2	11,57	7,41	0,01**
Age	602,40	4	150,60	96,46	0,001***
Interaction	578,50	8	72,31	46,31	0,001***
Erreur résiduelle	70,26	45	1,56		

*** : très hautement significatif ; ** : hautement significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

1.2.2. Effets de la 20E

Les chrysalides d'*E. kuehniella*, traitées à la 20E, montrent aussi une baisse dans leur contenu en glycogène aux deux doses testées; en effet, la diminution enregistrée se produit aux jours 1 et 7 à la faible dose et aux jours 3 et 5 à la forte dose. La comparaison entre les séries témoins et traitées révèle que le traitement à la 20E, augmente le contenu en glycogène, ($p = 0,01$) seulement au jour 7 du stade nymphal et à la dose la plus faible (5 μg) (Tab. 13). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 14), révèlent des effets dans le traitement, l'âge et l'interaction traitement-âge très hautement significatifs ($p < 0,001$).

Tableau 13. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8).

Traitement Jours	Témoin	20E (5µg)	20E (10µg)
0	134 ± 15,50		
1	126 ± 8,80 a A	110,80 ± 5,30 a B	113 ± 6,80 a A
3	106,80 ± 4,90 a B	108,50 ± 10,50 a B	88,20 ± 7,70 a B
5	66,50 ± 2,50 a C	81 ± 14,30 a BC	60,40 ± 5,20 a C
7	48,50 ± 5,70 a D	76,30 ± 4,80 b C	56,60 ± 3,70 a C

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges (p< 5 %).

Tableau 14. Effets de la 20E administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en glycogène (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal des femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	110,10	2	55,07	31,36	0,001***
Age	422,70	4	105,70	60,18	0,001***
Interaction	409,80	8	51,22	29,17	0,001***
Erreur résiduelle	79,03	45	1,76		

*** : très hautement significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

1.2.3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en glycogène dans le corps gras

Une diminution dans les valeurs du glycogène est retrouvée, au cours de chaque stade pour les différentes séries; cependant, elle se produit plus tôt avec la 20E et plus tard avec l'insuline.

Les deux molécules induisent le même effet dans la teneur en glycogène (Fig. 15); ainsi, l'insuline et la 20E à faible dose présentent une augmentation dans les valeurs du contenu en glycogène. L'analyse statistique confirme cet effet de l'insuline, à 5 ($p=0,001$) et 7 jours ($p=0,005$) à la dose la plus forte, mais seulement au jour 5 à la dose la plus faible. La 20E présente une hausse dans le contenu en glycogène au jour 7 mais, seulement, à la plus faible dose. L'analyse de la variance à un critère de classification, effectuée pour chaque âge et en fonction des deux molécules utilisées, confirme ces résultats et montre, entre les traitements, des différences significatives ($p=0,017$) au jour 1, et des différences hautement significatives aux jours 5 et 7 ($p=0,0003$; $p=0,001$).

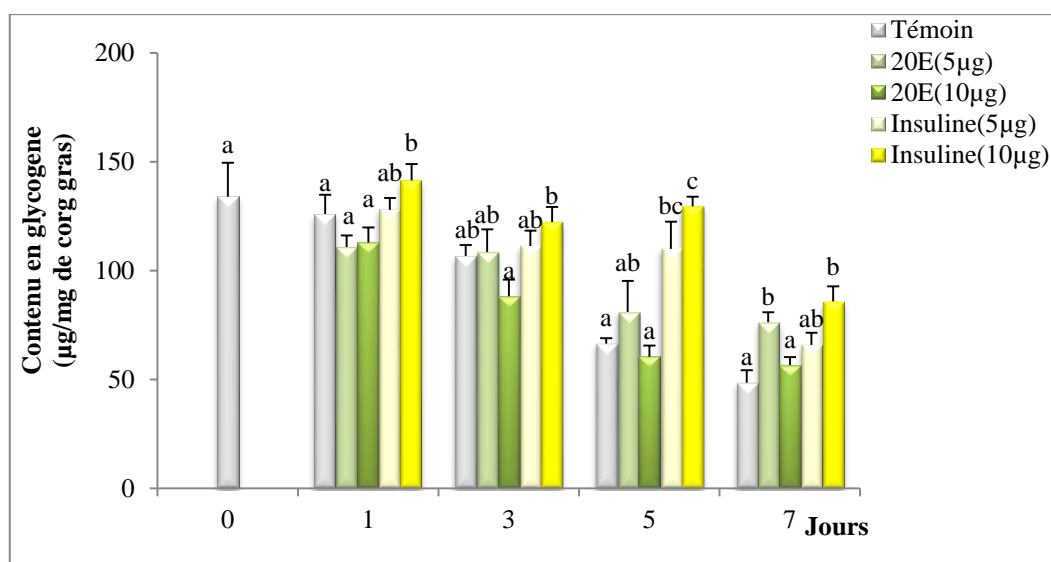


Figure 15. Effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg) séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu du glycogène (µg/mg de tissu) dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n=6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

Les effets des deux molécules sur le contenu en glycogène chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sont classés dans le tableau 15. L'insuline à 10µg montre, au cours du stade nymphal, l'effet le plus important sur l'augmentation dans le contenu en glycogène. La 20E, à 5 µg, montre un effet similaire à l'insuline (10µg) seulement au jour 7. L'insuline à 5µg agit uniquement au jour 5 et de manière comparable à la dose 10 µg.

Tableau 15. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur le contenu du glycogène, dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	Insuline (10µg)	141,40	A
	Insuline (5µg)	127,90	A B
	Témoin	126	B
	20E (10µg)	113	B
	20E (5µg)	110,80	B
3	Insuline (10µg)	122,30	A
	Insuline (5µg)	111,30	A B
	20E (5µg)	108,50	A B
	Témoin	106,80	A B
	20E (10µg)	88,20	B
5	Insuline (10µg)	129,60	A
	Insuline (5µg)	109,90	A B
	20E (5µg)	81	B C
	Témoin	66,50	C
	20E (10µg)	60,30	C
7	Insuline (10µg)	86,20	A
	20E (5µg)	76,30	A B
	Insuline (5µg)	65,80	ABC
	20E (10µg)	56,60	B C
	Témoin	48,50	C

1. 3. Contenu en protéines

Chez les chrysalides femelles des séries témoins, le contenu en protéines, dans les corps gras, diminue au cours du stade nymphal (Tab. 16).

1.3.1. Effets de l'Insuline

Le traitement aux deux doses d'insuline, montre, au cours du stade nymphal des modifications dans le contenu en protéines. En effet, à la dose 10 µg et après une diminution au jour 1, les valeurs restent comparables. Cependant, à 5 µg, après cette même diminution, une hausse dans les valeurs est notée aux jours 3 et 5; au jour 7, une baisse est, à nouveau, observée.

La comparaison entre les séries témoins et traitées indique que l'insuline entraîne, une augmentation dans le contenu en protéines à 3 ($p = 0,03$), 5 ($p = 0,0004$) ($p = 0,02$) et 7 jours ($p = 0,02$; $p = 0,0009$) ; l'effet dose, noté au jour 5, indique une baisse à 10 µg ($p = 0,004$).

Tableau 16. Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	Insuline (5µg)	Insuline (10µg)
0	85,90 ± 4,10 A		
1	71 ± 4,20 a B	62,10 ± 1,80 a B	63,70 ± 6,50 a BC
3	57 ± 8,20 a CD	76 ± 1,20 b C	78,90 ± 1,10 b B
5	53,30 ± 2,90 a D	117 ± 8,40 b D	73,80 ± 4,70 c BC
7	42,10 ± 2,80 a CE	69,10 ± 8,50 b BC	62,20 ± 1,60 b C

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 17), révèlent un effet traitement significatif ($p = 0,011$) mais aussi un effet âge et une interaction entre ces deux critères très hautement significatifs ($p < 0,001$).

Tableau 17. Effets de l'insuline administrée par application topique (5 et 10 μg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au cours du stade nymphal des femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$) : ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	8,62	2	4,31	4,95	0,011*
Age	190,20	4	47,56	54,63	0,001****
Interaction	301,90	8	37,73	43,34	0,001****
Erreur Résiduelle	39,18	45	0,87		

**** : très hautement significatif ; * : significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

1.3.2. Effets de la 20E

Le traitement avec la 20E aux deux doses montre, au cours du stade nymphal, une diminution dans le contenu en protéines ; cependant, à 5 jours une augmentation est notée, particulièrement, à la dose la plus faible.

La comparaison entre les séries témoins et traitées indique que la 20E montre, à la dose la plus faible (5 μg), une diminution dans le contenu en protéines au jour 1 ($p = 0,03$) mais une augmentation aux jours 5 ($p = 0,003$) et 7 ($p = 0,003$). La 20E, à la dose la plus forte, révèle des valeurs comparables aux témoins (Tab.19). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 20), révèlent un effet traitement, âge et interaction traitement-âge très hautement significatifs ($p < 0,001$).

Tableau 18. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8).

Traitement Jours	Témoin	20E (5µg)	20E (10µg)
0	85,90 ± 4,10 A		
1	71 ± 4,20 a B	58,10 ± 1,70 b B	65,70 ± 30 ab B
3	57 ± 8,20 a CD	53,50 ± 7,20 a B	66,20 ± 4,50 a B
5	53,30 ± 2,90 a D	83,40 ± 5,60 b A	70,60 ± 8 ab AB
7	42,10 ± 2,80 a CE	63 ± 3,60 b B	53 ± 4,20 ab B

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges (p < 5 %).

Tableau 19. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal des femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	14,68	2	7,34	8,52	0,007**
Age	121,50	4	30,38	35,29	0,001***
Interaction	216,50	8	27,06	31,43	0,001***
Erreur résiduelle	38,75	45	0,86		

*** : très hautement significatif ; ** : hautement significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité

1.3.3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en protéines dans le corps gras

La comparaison des effets de l'insuline et de la 20E a permis de révéler que ces deux hormones entraînent une augmentation dans le contenu en protéines aux jours 5 et 7; cette hausse se produit à 5 ($p= 0,004$) et 10 μg ($p= 0,01$) pour l'insuline et seulement à 5 μg pour la 20E ($p= 0,003$); en outre, au jour 5, un effet dose est noté ($p = 0,004$). Au jour 3, seule l'insuline induit une augmentation ($p= 0,03$) qui est comparable aux deux doses testées (Fig. 16). L'analyse de la variance à un critère de classification, effectuée pour chaque âge et en fonction des deux molécules utilisées, confirme ces résultats et montre des différences significatives entre les traitements à 3 et 7 jours ($p = 0,015$; $p = 0,01$), et des différences très hautement significatives ($p < 0,001$) à 5 jours.

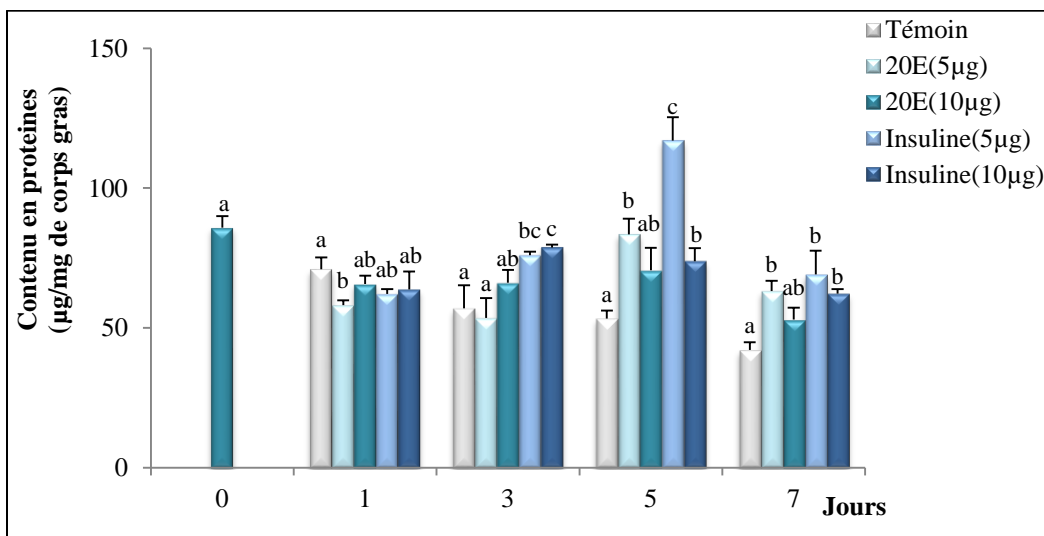


Figure 16. Effets l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 μg) séparément par application topique le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D.}$, $n= 6-8$). Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

Le tableau 20 classe les effets des deux molécules testées sur le contenu en protéines, dans le corps gras, au cours du stade nymphal, chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella*.

Les résultats obtenus, grâce au test HSD de Tuckey, révèlent que seule l'insuline induit un effet sur le contenu en protéines au jour 3. L'insuline présente un effet plus marqué que la 20E particulièrement au jour 5 de la chrysalide. L'insuline (5µg) et la 20E (5 µg) ont un effet comparable au jour 7.

Tableau 20. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en protéines, dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	Témoin	71,00	A
	20E (10µg)	65,70	A
	Insuline (10µg)	63,70	A
	Insuline (5µg)	62,10	A
	20E (5µg)	58,10	A
3	Insuline (10µg)	78,90	A
	Insuline (5µg)	76,00	A B
	20E (10µg)	66,20	BC
	Témoin	57	C
	20E (5µg)	53,50	C
5	Insuline (5µg)	117	A
	20E (5µg)	83,40	B
	Insuline (10µg)	73,80	B C
	20E (10µg)	70,60	B C
	Témoin	53,30	C
7	Insuline (5µg)	69,10	A
	20E (5µg)	63,20	A
	Insuline (10µg)	62,20	A B
	20E (10µg)	53,00	A B
	Témoin	42,10	B

1. 4. Contenu en lipides

Le contenu en lipides, dans les corps gras, chez les chrysalides témoins d'*E. kuehniella*, augmentent significativement aux jours, 3 ($p = 0,02$), 5 ($p = 0,003$) et 7 ($p = 0,01$) au cours du stade nymphal (Tab. 21).

1.4.1. Effets de l'Insuline

Chez les chrysalides d'*E. kuehniella*, traitées à l'insuline, l'augmentation dans le contenu en lipides, observée chez les témoins, est retrouvée à 5 jours à la faible dose mais à 5 et 7 jours à la dose la plus forte; cependant, une diminution préalable est notée au jour 1 à faible dose. La comparaison entre les séries témoins et traitées indique que l'insuline entraîne, à 5 μg , une diminution dans le contenu en lipides totaux à tous les âges testés (1 jour $p = 0,01$; 3 jours $p = 0,02$; 5 jours $p = 0,007$; 7 jours $p = 0,0005$). L'insuline, à 10 μg , induit une baisse, seulement au jour 5 mais avec une relation dose réponse; une diminution plus importante est notée ($p = 0,04$) à la dose la plus faible.

Tableau 21. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal des femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	Insuline (5 μg)	Insuline (10 μg)
0	124,50 \pm 10,40 A		
1	130,40 \pm 5,80 a AB	110,30 \pm 2,00 b B	133,70 \pm 3,60 a A
3	145,70 \pm 4,70 a B	123,90 \pm 5,90 b AB	146,00 \pm 8,10 ab A
5	189,60 \pm 8 a C	145,80 \pm 7,70 b AD	177,60 \pm 9,70 c B
7	229 \pm 7,20 a D	157,80 \pm 7,70 b D	213,90 \pm 6,20 a C

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Les résultats concernant l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 22), révèlent un effet traitement, âge et interaction traitement-âge très hautement significatifs ($p < 0,001$).

Tableau 22. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 μg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	316,80	2	158,40	103,60	0,001***
Age	1729	4	432,20	282,70	0,001***
Interaction	275,60	8	34,45	22,53	0,001***
Erreur Résiduelle	68,81	45	1,53		

*** : très hautement significatif; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

1.4.2. Effets de la 20E

Au cours du stade nymphal, le contenu en lipides dans les corps gras, chez les chrysalides traitées à la 20E, présente, pour les deux doses testées, une augmentation à 5 (5 μg $p = 0,001$; 10 μg $p = 0,003$) et 7 jours (5 μg $p = 0,01$; 10 μg $p = 0,001$).

La comparaison des résultats obtenus entre les séries témoins et traitées à la 20E (5 μg , 10 μg) montre des valeurs statistiquement comparables dans le contenu en lipides (Tab. 23). Par conséquent, aucun effet de la 20E n'est à noter sur ce paramètre.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab 24), révèlent seulement un effet âge significatif ($p < 0,001$).

Tableau 23. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides (µg/mg de tissu), au cours du stade nymphal, chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8).

Traitement Jours	Témoin	20E (5µg)	20E (10µg)
0	124,50 ± 10,40 A		
1	130,40 ± 5,80 a AB	126,40 ± 4,10 a A	130,10 ± 4,90 a A
3	145,70 ± 4,70 a B	127,30 ± 13,40 a A	138,30 ± 5,90 a A
5	189,60 ± 8 a C	210,80 ± 7,70 a B	183 ± 8 a B
7	229 ± 7,20 a D	244,80 ± 5,60 a C	230,40 ± 5,20 a C

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges (p < 5 %).

Tableau 24. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en lipides (µg/mg de corps gras) au cours du stade nymphal des femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	84,50	2	42,25	25,15	0,43
Age	2580	4	645	383,90	0,001***
Interaction	359,10	8	44,89	26,72	0.08
Erreur résiduelle	75,61	45	1,68		

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

1.4.3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en lipides dans le corps gras

La comparaison des effets des deux hormones sur le contenu en lipides (Fig. 16), a permis de mettre en évidence que seule l'insuline, à la dose la plus faible, agit sur les lipides en entraînant une diminution.

L'analyse statistique montre des différences entre les traitements; elles sont significatives à 1 jour ($p = 0,013$), hautement significatives à 5 jours ($p = 0,009$), et très hautement significatives à 7 jours ($p < 0,001$).

A 3 jours aucune différence significative n'est notée ($p = 0,23$).

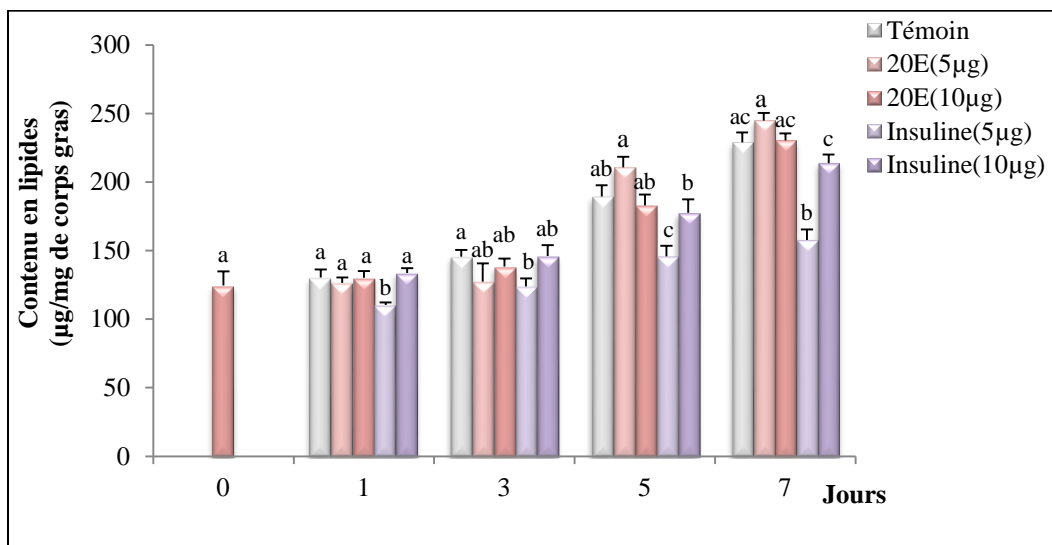


Figure 17. Effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg) séparément par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en lipides (µg/mg de tissu) dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

Le tableau 25 présente les résultats sur le contenu en lipides dans les corps gras, à 1, 3, 5 et 7 jours chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella*, témoins et traitées aux deux molécules testées. Le classement par le test HSD de Tuckey confirme que seule l'insuline induit une diminution et que cet effet est plus important avec la dose la plus faible.

Tableau 25. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur le contenu en lipides dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	Insuline (10µg)	133,7	A
	Témoin	130,3	A
	20E (10µg)	130,1	A
	20E (5µg)	126,4	A
	Insuline (5µg)	110,3	B
3	Insuline (10µg)	145,9	A
	Témoin	145,7	A
	20E (10µg)	138,3	A
	20E (5µg)	127,3	A
	Insuline (5µg)	123,9	A
5	20E (5µg)	210,7	A
	Témoin	189,5	AB
	20E (10µg)	182,9	AB
	Insuline (10µg)	177,5	B
	Insuline (5µg)	145,8	C
7	20E (5µg)	244,8	A
	20E (10µg)	230,3	AB
	Témoin	229	AB
	Insuline (10µg)	213,8	B
	Insuline (5µg)	157,8	C

2. Effets de l'insuline et de la 20E sur la reproduction

2.1. Effets de la 20E et de l'insuline en traitement simple sur les vitellogénines dans le corps gras

Les effets de l'insuline et de la 20E (5 et 10 μg) administrées, par application topique en traitement simple, le jour de l'exuviation nymphale des femelles d'*E. kuehniella*, ont été évalués, au cours de ce même stade (1, 3, 5 et 7 jours), sur le contenu en vitellogénines dans les corps gras.

Chez les chrysalides témoins, les vitellogénines montrent une valeur maximale au jour 5 qui est de l'ordre de $37,53 \pm 1,14 \mu\text{g}/\text{mg}$ de corps gras. Ces valeurs qui augmentent entre 3 et 5 jours ($p = 0,002$) au cours du stade nymphal diminuent à la veille de l'exuviation adulte ($p = 0,02$).

2.1.1 Effets de l'insuline

Les deux doses d'insuline indiquent une évolution différente dans le contenu en vitellogénines chez les chrysalides. En effet, le traitement à la dose la plus forte révèle une évolution identique aux individus témoins; cependant, l'insuline à 5 μg induit une augmentation dans les valeurs des vitellogénines qui se produit aux jours 1 et 3.

La comparaison entre les séries témoins et traitées montre que l'insuline à 5 μg entraîne, une augmentation significative dans le contenu en vitellogénines à 1 et 3 jours ($p < 0,001$); au jour 5 de la chrysalide, une baisse est ensuite observée ($p < 0,001$). La forte dose d'insuline montre des valeurs comparables aux individus témoins (Tab 26).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab 27), révèlent des effets hautement significatifs dans le traitement et des effets très hautement significatif dans l'âge et dans l'interaction traitement-âge.

Tableau 26. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n = 6-8).

Jours \ Traitement	Témoin	Insuline (5µg)	Insuline (10µg)
0	22,84 ± 0,34 a A		
1	24,74 ± 1,06 a A	38,59 ± 0,72 b B	25,97 ± 1,2 a A
3	25,19 ± 1,55 a A	36,53 ± 1,26 b C	24,19 ± 1,18 a A
5	37,53 ± 1,14 a B	33,04 ± 0,66 b B	37,12 ± 1,07 a B
7	32,15 ± 1,51 a C	31,41 ± 0,82 a B	31,48 ± 0,91 a C

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges (p < 5 %).

Tableau 27. Effets de l'insuline administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogenines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8) : ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	p
Traitement	215,70	2	107,80	8,87	0,006**
Age	8182	4	2046	140,30	0,001***
Interaction	1611	8	201,40	16,57	0,001***
Erreur résiduelle	486,30	40	12,16		

*** : très hautement significatif ; ** : hautement significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

2. 1. 2 Effets de la 20E

La 20E, aux deux doses testées, induit une augmentation dans le contenu en vitellogénines qui apparait plus tôt au cours du stade nymphal (jour 1); une diminution dans ces valeurs se produit à 7 jours de manière similaire aux individus témoins. La comparaison entre les séries témoins et traitées avec la 20E, indique que le contenu en vitellogenines augmente aux jours 1, 3, 5 et 7 aux deux doses testées ($p < 0,001$); au jour 3, un effet dose-réponse est noté ($p = 0,003$) (Tab 28).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab 29), révèlent des effets dans le traitement, l'âge et l'interaction traitement-âge très hautement significatifs ($p < 0,001$).

Tableau 28. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu des vitellogénines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	20E (5 μg)	20E (10 μg)
0	22,84 \pm 0,34 a A		
1	24,74 \pm 1,06 a A	38,59 \pm 0,74 b B	40,07 \pm 0,77 b B
3	25,19 \pm 1,55 a A	37,34 \pm 0,6 b B	41,59 \pm 0,79 c BD
5	37,53 \pm 1,14 a B	57,5 \pm 0,24 b C	56,51 \pm 2,14 b C
7	32,15 \pm 1,51 a C	43,15 \pm 1,48 b D	44,02 \pm 1,07 b D

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Tableau 29. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphal, sur le contenu des vitellogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8) : ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	1016	2	508,10	13,17	0,001***
Age	16326	4	4082	124,60	0,001***
Interaction	3088	8	386	10,01	0,001***
Erreur résiduelle	1543	40	38,57		

*** : très hautement significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

2. 1 .3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur les vitellogénines

La comparaison des moyennes montre que la 20 E a un effet plus important que l'insuline (5µg) sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras aux jours 1 et 3; en outre, un effet similaire est noté au jour 3 entre les faibles doses de 20E et d'insuline. Au jour 5, c'est un effet opposé entre les deux hormones qui est observé. Au jour 7, seule la 20E induit une augmentation dans le contenu en vitellogénines (Fig. 18).

L'analyse de la variance à un critère de classification, confirme ces résultats et montre des différences très hautement significatives ($p < 0,001$) entre les traitements pour les deux doses au cours du stade nymphal.

Le tableau 30 présente le contenu en vitellogénines dans le corps gras, à 1, 3, 5 et 7 jours chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella*, témoins et traitées aux deux molécules testées. Les résultats obtenus, grâce au test de Tuckey, ont permis d'identifier trois groupes à 1 et 3 jours et 2 groupes à 5 et 7 jours. La 20E, aux deux doses, montre un effet plus important

que l'insuline (5 µg) sur le contenu en vitellogénines aux jours 1 et 3 mais aux jours 5 et 7, seul l'effet 20E est noté. La forte dose d'insuline reste sans effet.

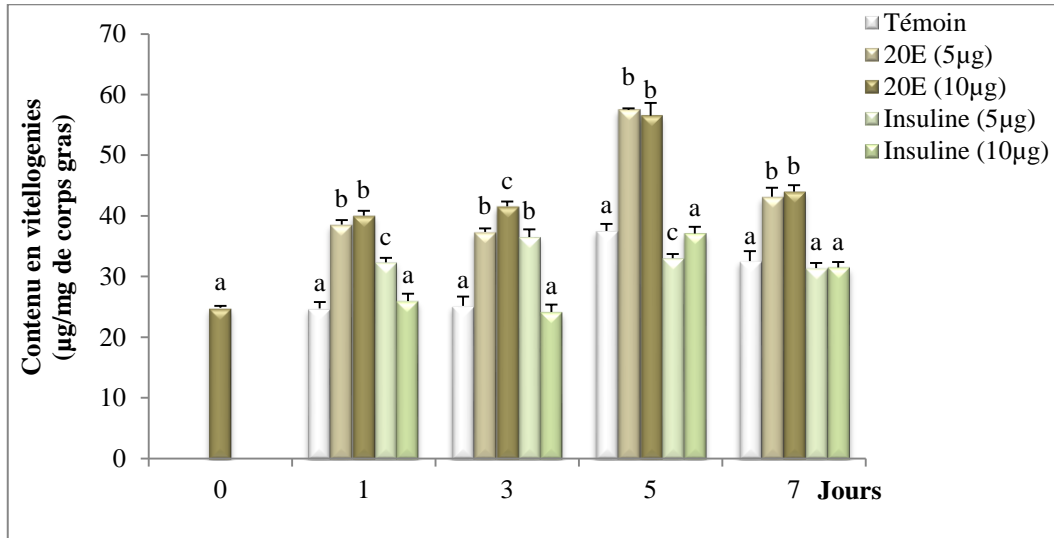


Figure 18. Effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5, 10 µg) séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras (µg/mg de tissu) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

Tableau 30. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras, au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	20E (10µg)	40,07	A
	20E (5µg)	38,59	A
	Insuline (5µg)	32,36	B
	Insuline (10µg)	25,97	C
	Témoin	24,74	C
3	20E (10µg)	41,59	A
	20E (5µg)	37,34	A
	Insuline (5µg)	36,53	B
	Témoin	25,19	C
	Insuline (10µg)	24,19	C
5	20E (5µg)	57,5	A
	20E (10µg)	56,51	A
	Témoin	37,53	B
	Insuline (10µg)	37,12	B
	Insuline (5µg)	33,04	B
7	20E (10µg)	44,02	A
	20E (5µg)	43,15	A
	Témoin	32,15	B
	Insuline (10µg)	31,48	B
	Insuline (5µg)	31,41	B

2. 2. Effets de la 20E et l'insuline en traitement combiné sur les vitellogénines

La 20 E a été administrée à 5 et 10 µg, le jour de l'exuviation nymphale puis l'insuline a été appliquée aux deux doses (5, 10 µg) et à deux périodes différentes après la 20E (âge nymphal : 3 ou 5 jours). L'effet du traitement combiné a été évalué, au cours du stade nymphal, sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras.

La figure 19 montre, à tous les âges, une stimulation de la production des vitellogénines ($p < 0,0001$) pour les différentes combinaisons testées, excepté, aux jours 5 et 7, quand l'application d'insuline est effectuée à 10 μg , au jour 5. La comparaison entre les traitements combinés présente un effet similaire sur les vitellogénines au jour 1 mais à tous les âges suivants l'augmentation observée est fonction de la dose d'insuline et/ou de la période d'application. Aux jours 3 et 5, la hausse dans le contenu en vitellogénines est fonction de la dose d'insuline et non de la période d'application; ainsi, une hausse plus importante est notée quand l'insuline est appliquée à 10 μg au jour 3, et à 5 μg au jour 5.

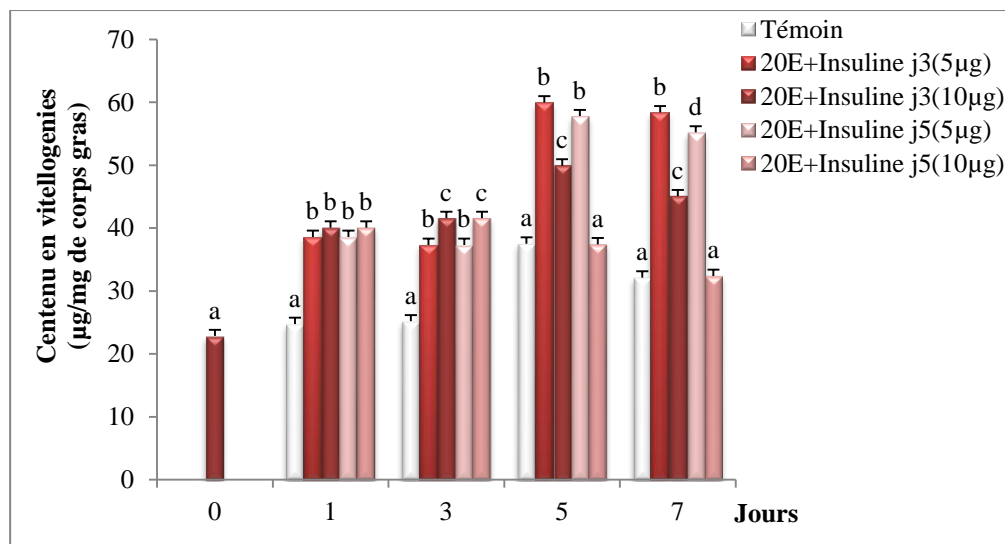


Figure 19. Effets de la 20E et de l'insuline, administrée (5, 10 μg) en traitement combiné, par application topique (3 ou 5 jours du stade nymphal) sur le contenu ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de corps gras) en vitellogénines au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

L'augmentation des vitellogénines, en fin de stade nymphal, dépend non seulement de la dose d'insuline mais aussi du moment d'application; ainsi, des valeurs plus importantes dans le contenu en vitellogénines sont notées avec la plus faible dose d'insuline appliquée au

jour 3 de la nymphe; en outre, l'insuline à 5 µg, appliquée au jour 5 de la nymphe, induit un effet plus important comparativement à l'insuline 10 µg administrée au jour 3.

L'analyse de la variance à un critère de classification, effectuée pour chaque âge, confirme ces résultats et montre des différences très hautement significatives ($p < 0,0001$) entre les traitements à 1, 3, 5 et 7 jours.

Le classement, grâce au test HSD de Tukey (Tab. 33), des effets du traitement combiné sur le contenu des vitellogénines, chez les femelles d'*E. kuehniella*, a permis d'identifier deux groupes au cours du stade nymphal.

Le traitement combiné avec la 20E et l'insuline montre à 1 et 3 jours du stade nymphal, le même effet pour les différentes combinaisons réalisées; ainsi, l'augmentation notée dans le contenu en vitellogénines se produit pour les deux doses de 20E (administrées le jour de l'exuviation nymphale) et pour les deux doses d'insuline appliquée aux jours 3 ou 5 du stade nymphal. Cette augmentation est retrouvée, également, aux jours 5 et 7, excepté quand la l'insuline à 10 µg est appliquée au jour 5 du stade nymphal; en effet, ce type de combinaison présente des valeurs dans le contenu en vitellogénines qui est comparable aux séries témoins.

Tableau 31. Comparaison des effets de la combinaison de la 20E (5, 10 µg à l'émergence) et de l'insuline aux deux doses (5 et 10 µg à 3 ou 5 jours après émergence), sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	20E + Insuline j3 (10µg)	40,07	A
	20E + Insuline j5 (10µg)	40,07	A
	20E + Insuline j3 (5µg)	38,59	A
	20E + Insuline j5 (5µg)	38,59	A
	Témoin	24,74	B
3	20E + Insuline j3 (10µg)	41,59	A
	20E + Insuline j5 (10µg)	41,59	A
	20E + Insuline j3 (5µg)	37,34	A
	20E + Insuline j5 (5µg)	37,34	A
	Témoin	25,19	B
5	20E + Insuline j3 (5µg)	59,97	A
	20E + Insuline j5 (5µg)	57,8	A
	20E + Insuline j3 (10µg)	49,95	A
	Témoin	37,53	B
	20E + Insuline j5 (10µg)	37,41	B
7	20E + Insuline j3 (5µg)	58,39	A
	20E + Insuline j5 (5µg)	55,21	A
	20E + Insuline j3 (10µg)	45,09	A
	20E + Insuline j5 (10µg)	32,39	B
	Témoin	32,15	B

2. 3. Effets de la 20E et de l'insuline en traitement simple sur les vitellines dans les ovaires

Les effets de la 20E (5, 10 µg) et de l'insuline (5 et 10 µg) administrés par application topique en traitement simple, le jour de l'exuviation nymphale, ont été évalués, sur le contenu des vitellines ovariennes chez les adultes femelles d'*E.kuehniella* à l'émergence.

Les vitellines ovariennes, chez les femelles d'*E kuehniella*, à l'émergence, ont une valeur de l'ordre de $88,94 \pm 3,90$ chez les séries témoins.

2. 3. 1. Effets de l'insuline

Le traitement à l'insuline induit une augmentation dans le contenu en vitellines ovariennes, seulement à la dose la plus faible (Tab. 32); en effet, la forte dose montre une valeur comparable à celle des individus témoins.

Tableau 32. Effets de l'insuline, administrée, par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu des vitellines ovariennes (µg/mg), chez les adultes femelles d'*E.kuehniella* à l'émergence ($m \pm S.D$, n = 4- 6).

Témoin	Insuline	
	5 µg	10 µg
88,94 ±3,90 a	107,28 ± 3,20 b	98,46 ± 2,10 ab

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%

2. 3. 2. Effets de la 20E

A l'émergence, les adultes femelles d'*E kuehniella* traitées à la 20 E, présentent une hausse significative dans le contenu en vitellines ovariennes avec une relation dose réponse (Tab. 33); un effet plus important est noté à la dose la plus faible ($p = 0,001$).

Tableau 33. Effets de la 20 E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le taux des vitellines ovariennes (µg/mg d'ovaire), dans les ovaires des adultes femelles d'*E.kuehniella* à l'émergence (m ± S.D, n = 4-6).

Témoin	20 E	
	5 µg	10 µg
88,94 ± 3,90 a	276,60 ± 10 b	127,21 ± 1,10 c

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%

2. 3. 3. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu des vitellines ovariennes

La comparaison des effets de l'insuline et de la 20 E sur le contenu en vitellines ovariennes, chez les adultes femelles d'*E. kuehniella* à l'émergence, montre que la 20E induit, comparativement à l'insuline, une augmentation plus importante sur la teneur en vitellines; en outre, la faible dose de 20E induit un effet plus drastique (Fig. 20).

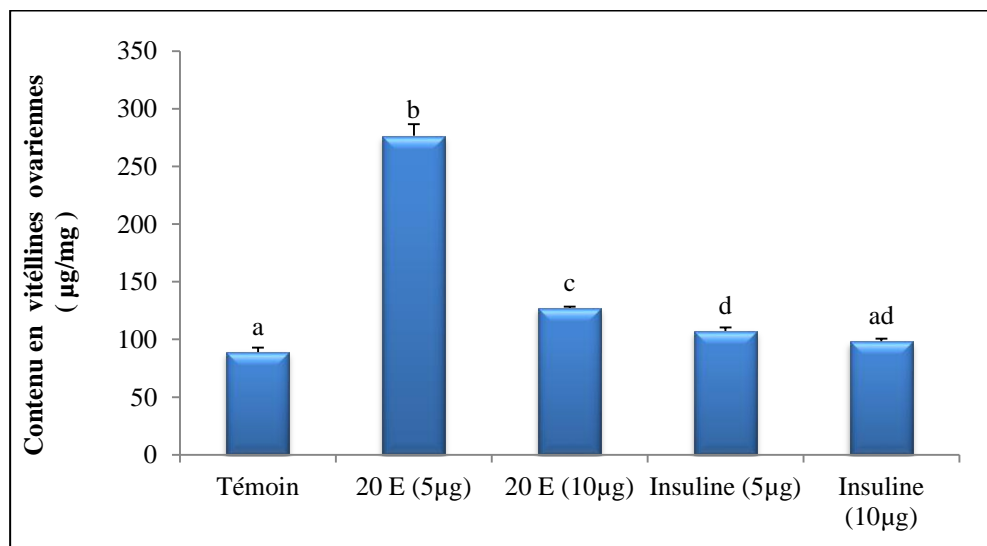


Figure 20. Effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellines ovariennes, (µg/mg) à l'émergence chez les adultes femelles d'*E.kuehniella* (m ± S.D, n = 4-6).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p < 5 %).

L'analyse de la variance à un critère de classification confirme ces résultats et montre des différences très hautement significatives ($p < 0,001$) entre les traitements et pour les deux doses (5 μg et 10 μg).

Les effets des différents traitements ont été classés, grâce au test HSD de Tuckey (Tab. 34). La 20E révèle un effet plus important que l'insuline (5 μg) sur l'augmentation dans le contenu des vitellines ovariennes; la faible dose de 20E a un effet plus drastique. La forte dose d'insuline présente des valeurs comparables à celles des individus témoins.

Tableau 34. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 μg) et de la 20E (5, 10 μg), administrées séparément par application topique, sur le contenu en vitellines ovariennes à l'émergence chez les femelles d'*E. kuehniella* : Classement par le test HSD de Tukey.

Traitement	Moyennes	Groupes
20E (5 μg)	276,58	A
20E (10 μg)	127, 21	B
INS (5 μg)	107,28	C
INS (10 μg)	98,46	DC
Témoin	88,94	D

2. 4. Effets de la 20E et de l'insuline en traitement combiné sur les vitellines ovariennes

La 20 E a été administrée aux deux doses (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale puis l'insuline a été administrée aux deux doses (5, 10 μg) et à deux périodes différentes (3 ou 5 jours) après la 20E. L'effet du traitement combiné a, ensuite, été évalué sur le contenu en vitellines dans les ovaires à l'émergence des adultes femelles.

La comparaison des divers traitements combinés entre la 20E et l'insuline sur le contenu en vitellines ovariennes, chez les adultes femelles d'*E. kuehniella* à l'émergence, indique, comparativement aux témoins, une augmentation dans le contenu en vitellines quand l'insuline est appliquée au jour 5 du stade nymphal avec les deux doses et au jour 3 seulement

à la faible dose; les valeurs pour ce paramètre reste comparable aux témoins lorsque l'insuline est appliquée au jour 3 à la dose la plus forte (Fig. 21).

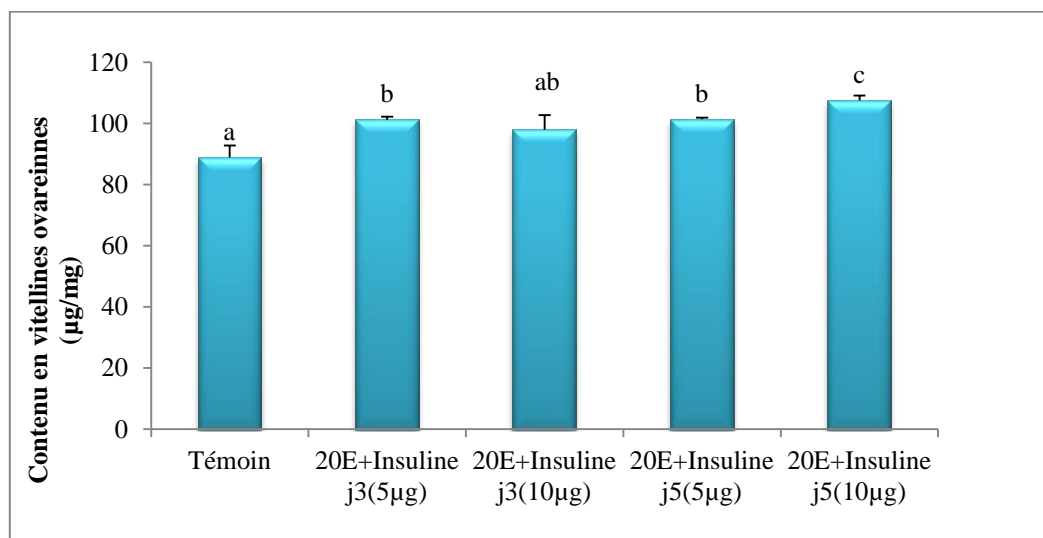


Figure 21. Effets de la 20E (5, 10 µg) et de l'insuline (5, 10 µg), administrées en traitement combiné, par application topique (jours 3 ou 5 de la nymphe) sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg) à l'émergence des femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%

L'analyse de la variance à un critère de classification, effectuée en fonction des deux molécules utilisées, confirme ces résultats et montre des différences significatives ($p = 0,01$) entre les traitements pour les deux combinaisons aux deux doses 5 µg et 10µg.

Les résultats obtenus, grâce au test HSD de Tuckey (Tab. 35) ont permis d'identifier trois groupes. Les différents traitements réalisés entraînent une augmentation dans les vitellines ovariennes; cependant, l'insuline à la dose la plus forte (10 µg), appliquée au jour 5 après la 20E (10 µg), induit l'effet le plus important. Les traitements combinés avec l'insuline à faible dose, appliquée après la 20E (5 µg) au jour 3 ou 5 du stade nymphal induisent des effets comparables. Le traitement combiné où l'insuline à 10 µg est appliquée au jour 3 après la 20E (10 µg) ne montre aucun effet.

Tableau 35. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées en traitement combiné par application topique, sur le contenu des vitellines ovariennes chez les femelles d'*E. kuehniella* à l'émergence: Classement par test le HSD de Tukey.

Traitement	Moyennes	Groupes
20E + Insuline j5 (10µg)	107,58	A
20E + Insuline j5 (5µg)	101,37	B
20E + Insuline j3 (5µg)	101,23	B
20E + Insuline j3 (10µg)	97,95	BC
Témoin	88,94	C

2.4. Effets de l'insuline et de la 20E sur les ecdystéroïdes dans les ovaires

Les effets de l'insuline et de la 20E, administrés (5 et 10 µg) par application topique le jour de l'exuviation nymphale des femelles d'*E. kuehniella*, ont été évalués, sur les ecdystéroïdes ovariens à l'émergence des femelles adultes.

Chez les séries témoins, une valeur de $2235 \pm 220,90$ pg équivalent 20E est enregistrée le jour de l'émergence des adultes femelles d'*E. kuehniella*.

2. 4.1. Effets de l'insuline

Le traitement des chrysalides femelles induit une diminution dans les valeurs hormonales sans relation dose-réponse; en effet, les valeurs, significativement différentes, par rapport aux séries témoins, sont de $335,30 \pm 51,97$ et $552,10 \pm 85,50$ pg équiv 20E chez les séries traitées avec 5µg et 10µg d'insuline, respectivement, ($p=0,001$; $p = 0,002$) (Tab. 36).

Tableau 36. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5 et 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv 20E) à l'émergence des adultes femelles d'*E.kuehniella* (m ± S.D, n = 6-8).

Témoin	Insuline	
	5 µg	10 µg
2235 ± 220,90 a	335,30 ± 51,97 b	552,10 ± 85,50 b

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

2. 4. 2. Effets de la 20E

La 20E, appliquée le jour de l'exuviation nymphale des femelles, induit, aux deux doses testées, une baisse dans les valeurs des ecdystéroïdes ovariens chez les adultes à l'émergence (5µg p = 0,007; 10 µg p=0,001). La 20E, à la dose la plus faible, présente une diminution plus drastique (p < 0,001) sur les valeurs hormonales (Tab. 37).

Tableau 37. Effets de la 20E, administrée (5 et 10 µg) par application topique le jour de l'exuviation nymphale, sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv 20E) le jour de l'émergence des adultes femelles d'*E.kuehniella* (m ± S.D, n = 6-8).

Témoin	20E	
	5 µg	10 µg
2235 ± 220,90 a	161,70 ± 23,90 b	343,70 ± 7,14 c

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

2. 4. 3. La comparaison des effets de l'insuline et la 20E sur les ecdystéroïdes ovariens

La comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le contenu en ecdystéroïdes ovariens, le jour de l'émergence des adultes femelles d'*E. kuehniella*, révèle des effets similaires correspondant à une baisse dans les valeurs hormonales (Fig. 22).

La 20E à la dose la plus faible induit un effet plus drastique sur la diminution dans le contenu en ecdystéroïdes ovariens. La 20E à la dose la plus forte et l'insuline aux deux doses montrent un effet similaire.

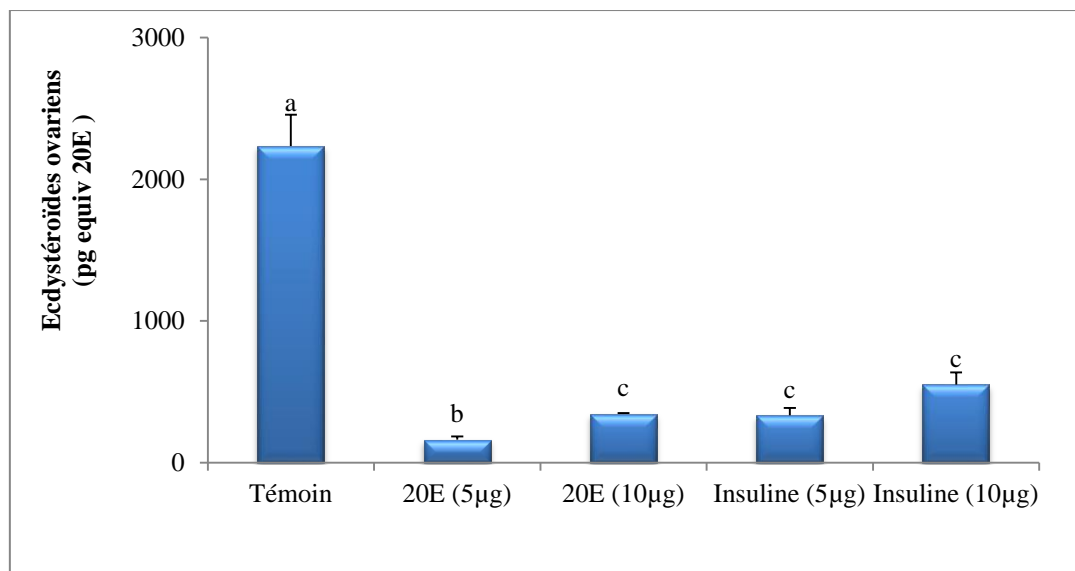


Figure 22. Effets de la 20E et de l'insuline, administrées (5 et 10 µg) séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv 20E) à l'émergence des adultes femelles d'*E.kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

L'ANOVA à un critère de classification, suivie du test de HSD de Tuckey (Tab. 38) confirment ces résultats et mettent en évidence des différences très hautement significatives ($p < 0,001$) entre les traitements. Les résultats obtenus, ont permis d'identifier trois groupes: le premier comporte les témoins, le second est représenté par les traités à l'insuline et à la

forte dose de la 20E, et le dernier groupe englobe les traités à la faible dose de 20E. Ainsi, la faible dose de 20E entraîne la baisse la plus importante; la forte dose de 20E et l'insuline aux deux doses induisent un effet comparable sur le contenu en ecdystéroïdes ovariens.

Tableau 38. Comparaison des effets de la 20E (5, 10 µg) et de l'insuline (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la quantité des ecdystéroïdes ovariens (pg équiv 20E) à l'émergence des adultes femelles d'*E.kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Traitement	Moyennes	Groupes
Témoin	2235,30	A
Insuline (10µg)	552,10	B
20E (10µg)	343,70	B
Insuline (5µg)	335,30	B
20E (5µg)	161,70	C

2. 5. Potentiel reproducteur

Les effets de l'insuline et de la 20E administrées (5 et 10 µg) par application topique, le jour de l'exuviation nymphale des femelles d'*E. kuehniella*, ont été évalués, sur la durée des périodes de préoviposition et d'oviposition, sur le nombre d'œufs pondus (fécondité) et sur le pourcentage d'éclosion (fertilité).

2.5.1 Effets de l'insuline et de la 20 E sur la période de préoviposition

La période de préoviposition chez les femelles témoins est de $1,40 \pm 0,24$ jours; le traitement à l'insuline et à la 20E n'affecte pas ce paramètre qui reste comparable pour toutes les séries (Fig. 23).

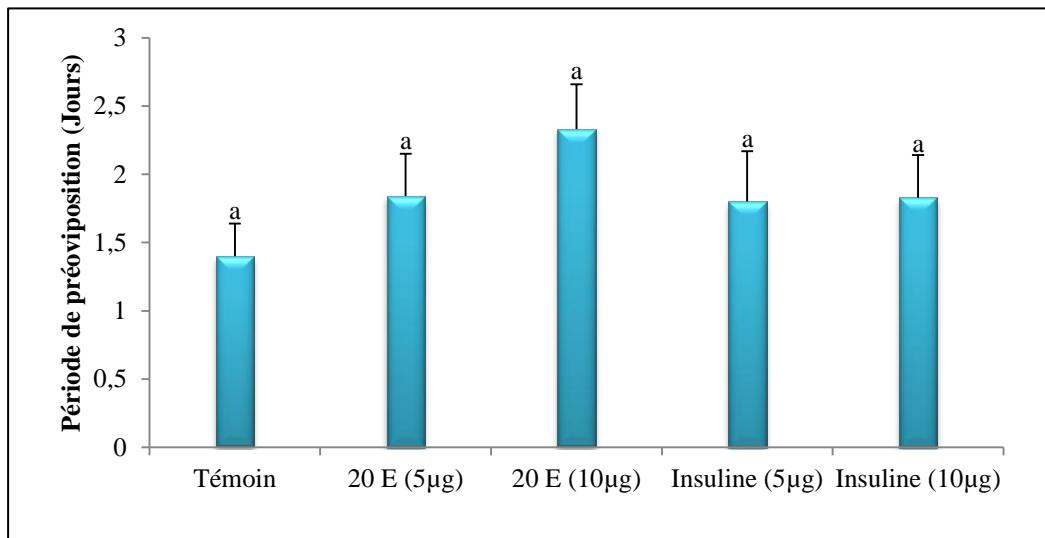


Figure 23. Effets de et de la 20E l'insuline, administrées (5, 10 µg) séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée de la période de préoviposition (jours) chez les adultes femelles d'*E. kuehniella*. ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

2.5.2. Effets de l'insuline et de la 20 E sur la période d'oviposition

La période d'oviposition qui est de $3,8 \pm 0,37$ jours chez les femelles témoins est plus courte après traitement à l'insuline à 5 et 10 µg ($p = 0,02$; $p = 0,03$); les deux doses utilisées ont un effet similaire sur la durée de la période d'oviposition (Tab. 39).

Tableau 39. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée de la période d'oviposition (jours) des adultes femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Témoin	Insuline	
	5 µg	10 µg
$3,80 \pm 0,37$ a	$2,60 \pm 0,37$ b	$2,50 \pm 0,43$ b

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

La 20E n'affecte pas la période de préoviposition; en effet, les résultats obtenus montrent des valeurs comparables entre les femelles des séries témoins et traitées (Tab. 40).

Tableau 40. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée de la période d'oviposition (jours) des adultes femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n = 6-8).

Témoin	20E	
	5 µg	10 µg
3,80 ± 0,37 a	4,00 ± 0,25 a	3,83 ± 0,47 a

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

2.5.3. Effets de l'insuline et de la 20 E sur la fécondité

La fécondité ou le nombre d'œufs pondus par femelle chez *E. kuehniella* est de 189 ± 3.2 œufs chez les individus témoins.

L'insuline entraîne, aux deux doses testées, une réduction significative par rapport aux témoins (p < 0,001) ; en outre, un effet dose-dépendant (p = 0,0016) révèle une diminution plus forte à 5 µg (Tab. 41).

Tableau 41. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la fécondité (nombre d'œufs pondus) des adultes femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n = 6-8).

Témoin	Insuline	
	5 µg	10 µg
189 ± 3,20 a	118,20 ± 1,28 b	127,40 ± 1,56 c

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

La 20E entraîne, aux deux doses testées, une réduction significative de la fécondité par rapport aux témoins ($p < 0,001$); un effet dose-réponse est observé ($p < 0,001$) (Tab. 42).

Tableau 42. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur la fécondité (nombre d'œufs pondus) des adultes femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Témoin	20E	
	5 μg	10 μg
189 \pm 3,20 a	155,70 \pm 3,37 b	123,70 \pm 2,26 c

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

2. 5. 4. Effets de l'insuline et de la 20 E sur le pourcentage d'éclosion

Chez les séries témoins, la fertilité ou le pourcentage d'éclosion des œufs est de 92,7 \pm 2,5 %. Le traitement à l'insuline entraînent une réduction de la fertilité; ainsi, des valeurs de 78,34 \pm 2,44 % ($p = 0,002$) et 79,43 \pm 3,96 ($p = 0,001$) dans le pourcentage d'éclosion sont enregistrées pour les doses 5 et 10 μg d'insuline respectivement (Tab. 43).

Tableau 43. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le pourcentage d'éclosion (%) des adultes femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Témoin	Insuline	
	5 μg	10 μg
92,70 \pm 2,50 a	78,34 \pm 2,44 b	79,43 \pm 3,96 b

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

La 20E réduit significativement le pourcentage d'éclosion des œufs comparativement aux témoins et une baisse plus drastique ($p = 0,005$) est notée avec la plus faible dose (Tab. 44); en effet, les valeurs dans le pourcentage d'éclosion des œufs sont de $63,10 \pm 5,32$ à $5\mu\text{g}$ ($p < 0,001$) et de $80 \pm 6,60$ à $10\mu\text{g}$ ($p = 0,01$).

Tableau 44. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur le pourcentage d'éclosion (%) chez les adultes femelles d'*E. kuehniella*. ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$).

Témoin	20E	
	5 μg	10 μg
$92,70 \pm 2,50$ a	$63,10 \pm 5,32$ b	$80,00 \pm 6,60$ c

Les valeurs suivies des mêmes lettres minuscules sont comparables au seuil de 5%.

2. 5. 5. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur le potentiel reproducteur

Période d'oviposition

La comparaison des moyennes de la période d'oviposition, montre que l'insuline réduit la période d'oviposition aux deux doses alors que la 20E n'a aucun effet (Fig. 24). L'ANOVA à un critère de classification confirme ces résultats et met en évidence des différences significatives ($p = 0,01$) entre les traitements pour les deux doses d'insuline.

Le tableau 45 montre les résultats obtenus, grâce au test HSD de Tuckey, et révèle l'existence de deux groupes. Il apparaît que pour la période d'oviposition, la durée la plus courte est induite après traitement avec l'insuline.

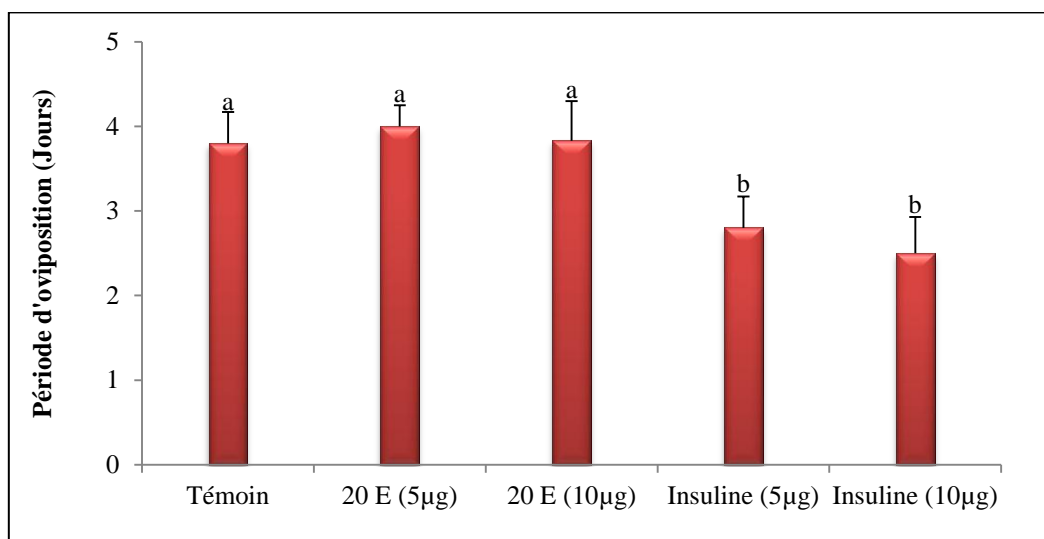


Figure 24. Effets de la 20E et de l'insuline, administrées séparément (5, 10 µg), par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur la durée de la période d'oviposition (jours) chez les femelles d'*E. kuehniella*. (m ± S.D, n = 6-8).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p <5 %).

Tableau 45. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la période d'oviposition chez les femelles d'*E. kuehniella* : Classement par le test HSD de Tukey.

Traitement	Moyennes	Groupes
20E (5µg)	4,00	A
20E (10µg)	3,83	A
Témoin	3,80	A
Insuline (5µg)	2,60	B
Insuline (10µg)	2,50	B

Fécondité

La comparaison des moyennes deux à deux grâce au test de Student révèle que l'insuline aux deux doses et la 20 E à la dose la plus forte réduisent la fécondité avec un effet plus drastique par rapport à la faible dose de 20E (Fig. 25).

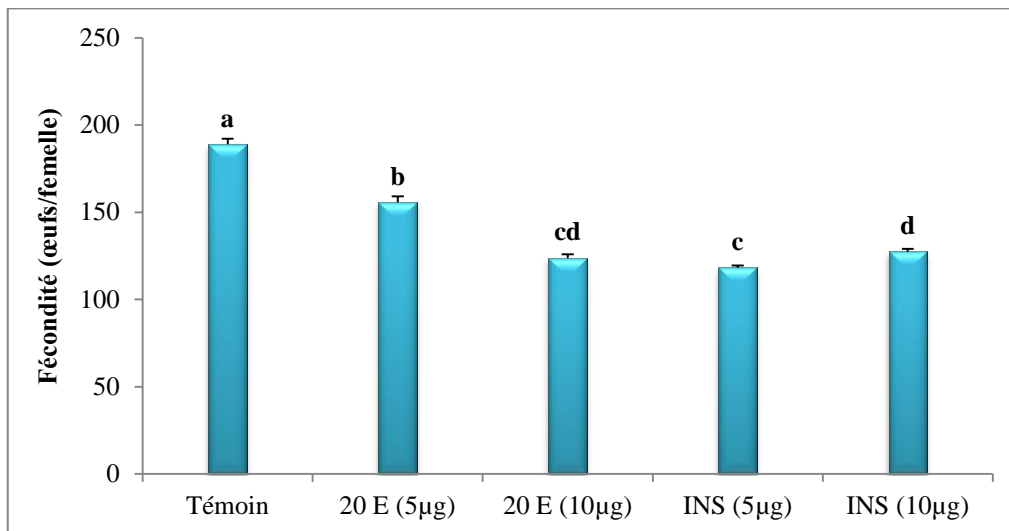


Figure 25. Effets de la 20E et de l'insuline, administrées séparément par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur la fécondité (nombre d'œufs pondus) chez les adultes femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

L'analyse de la variance à un critère de classification, confirme ces résultats et met en évidence des différences très hautement significatives ($p < 0,001$). Le tableau 46, présentant les résultats du test HSD de Tuckey, montre que la forte dose de 20E et les deux doses d'insuline ont un effet similaire. Seule, la 20E à 5 µg induit la baisse la moins drastique sur la fécondité des femelles.

Tableau 46. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la fécondité des femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Traitement	Moyennes	Groupes
Témoin	189,80	A
20E (5µg)	155,66	B
INS (10µg)	127,40	C
20E (10µg)	123,66	C
INS (5µg)	118,20	C

Fertilité

La comparaison des moyennes montre que les deux molécules induisent une réduction de la fertilité mais cet effet est plus important avec la plus faible dose de 20E (Fig. 26).

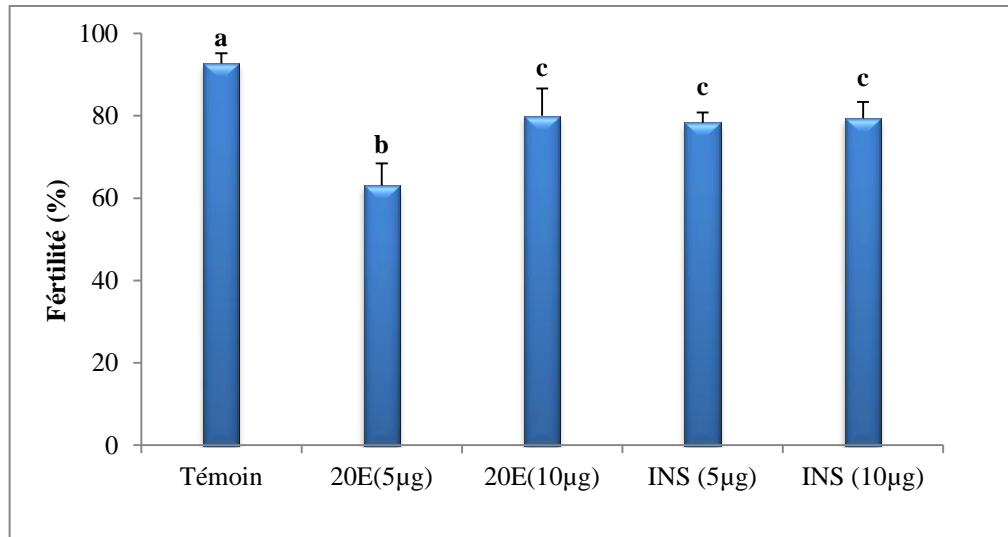


Figure 26. Effets de la 20E et de l'insuline, administrées séparément par application topique (5, 10 µg), le jour de l'exuviation nymphale sur la fertilité (%) des adultes femelles d'*E. kuehniella*. (m ± S.D, n = 6-8).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

Les résultats de l'ANOVA à un critère de classification relatifs à la comparaison entre les deux molécules utilisées, mettent en évidence des différences très hautement significatives ($p < 0,001$).

Le tableau 47 présente le classement des effets des deux molécules testées sur la fertilité chez les femelles d'*E. kuehniella*. Le test HSD de Tuckey, effectué après l'analyse de la variance montre l'existence de trois groupes et confirme les résultats obtenus par le test « t » de Student. Ainsi, l'insuline et la 20E aux deux doses, induisent une diminution de la fertilité des femelles comparativement aux témoins; cependant, la faible dose de 20E présente la réduction la plus drastique.

Tableau 47. Comparaison des effets de l'insuline et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, sur la fertilité des adultes femelles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Traitement	Moyennes	Groupes
Témoin	92,70	A
20E (10µg)	80,00	B
Insuline (10µg)	79,43	B
Insuline (5µg)	78,43	B
20E (5µg)	63,10	C

3. Effets de l'insuline et de la 20E sur le stress oxydatif chez les mâles et les femelles d'*E. kuehniella*

Les effets de l'insuline et de la 20E, administrées (5 et 10 µg), séparément, par application topique le jour de l'exuviation nymphale, ont été évalués sur le stress oxydatif chez les mâles et femelles d'*E. kuehniella*. Les résultats sur l'activité spécifique de la catalase, obtenus au cours du stade nymphal (1, 3, 5 et 7 jours), sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéines (µM/min/mg de protéines).

3. 1. Effets de l'insuline chez les femelles

Les valeurs de l'activité spécifique de la catalase chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées à l'insuline au cours du stade nymphal (0, 1, 3, 5 et 7 jours) sont représentées dans le tableau 48. Chez les chrysalides témoins d'*E. kuehniella*, l'activité spécifique de la catalase, montre une augmentation entre 3 et 5 jours puis un retour à des valeurs de base est ensuite noté. Les individus traités à l'insuline montrent, selon la dose testée, une évolution différente dans le profil de l'activité spécifique de la catalase comparativement aux témoins; en effet, à la plus forte dose, la hausse dans le stress oxydatif

au jour 1 est suivie par une diminution dans les valeurs de la catalase dès le jour 3. La faible dose d'insuline montre une augmentation du stress oxydatif au cours du stade nymphal avec, néanmoins, une diminution au jour 3.

La comparaison entre les séries témoins et traitées montre que l'insuline induit des effets différents en fonction des doses mais aussi en fonction de l'âge des nymphes. L'augmentation de l'activité de la catalase est observée au jour 1 ($p = 0,02$) à la forte dose mais au jour 7 à la faible dose ($p = 0,003$). La diminution de l'activité de la catalase est notée, au jour 3 aux deux doses d'insuline ($p = 0,001$; $p = 0,005$) mais aussi au jour 5 à la dose la plus forte ($p = 0,002$) seulement.

Tableau 48. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E.kuehniella* ($m \pm \text{S.D.}$, $n = 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	Insuline (5 μg)	Insuline (10 μg)
0	0,52 \pm 0,08 A		
1	0,66 \pm 0,09 a AC	0,79 \pm 0,03 a B	0,99 \pm 0,71 b B
3	0,53 \pm 0,02 a AC	0,34 \pm 0,02 b C	0,37 \pm 0,03 b C
5	0,73 \pm 0,06 a B	0,73 \pm 0,05 a B	0,38 \pm 0,02 b C
7	0,45 \pm 0,08 a C	0,99 \pm 0,08 b D	0,46 \pm 0,17 a C

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 49), révèlent des effets hautement significatifs dans le traitement ($p = 0,01$), très hautement

significatifs dans l'âge ($p < 0,001$), et significatifs dans l'interaction traitement-âge ($p = 0,03$).

Tableau 49. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 μg), le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n= 6-8$): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,40	2	0,20	7,04	0,010**
Age	3,06	4	0,76	26,73	0,001***
Interaction	0,76	8	0,09	3,31	0,030*
Erreur résiduelle	1,57	55	0,03		

*** : très hautement significatif ; ** : hautement significatif ; * : significatif ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

3. 2. Effets de la 20E chez les femelles

Les chrysalides femelles d'*E. kuehniella*, traitées à la 20E, montrent, aux deux doses testées, une évolution similaire dans le profil de l'activité spécifique de la catalase; en effet, la hausse dans le stress oxydatif au jour 1 est suivie par une diminution dans les valeurs de la catalase au jour 3; une tendance à l'augmentation est de nouveau observée entre 5 et 7 jours.

La comparaison entre les séries témoins et traitées montre que la 20E entraîne, une diminution de l'activité spécifique de la catalase à 3 et 5 jours et une augmentation à 1 et 7 jours; par ailleurs, ces effets sont modulés non seulement en fonction de l'âge des nymphes mais aussi en fonction des doses. L'augmentation de l'activité de la catalase, présente une relation dose-réponse au jour 1 ($p = 0,02$) et au jour 7 ($p = 0,01$). Au jour 3, la diminution, de

l'activité de la catalase, est seulement notée, à la dose la plus élevée ($p = 0,003$) ; au jour 5, un effet dose-dépendant révèle que la faible dose induit la plus forte diminution ($p = 0,01$) (Tab. 50).

Tableau 50. Effets de la 20E, administrée, par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E.kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	20E (5 μg)	20E (10 μg)
0	0,52 \pm 0,08 A		
1	0,66 \pm 0,09 a AC	1,20 \pm 0,05 b B	1,57 \pm 0,11 c B
3	0,53 \pm 0,02 a AC	0,61 \pm 0,03 a AC	0,33 \pm 0,01 b C
5	0,73 \pm 0,06 a B	0,46 \pm 0,01 b A	0,54 \pm 0,01 c A
7	0,45 \pm 0,08 a C	0,66 \pm 0,02 b C	1,07 \pm 0,110 c D

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.
Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 51), révèlent un effet dans le traitement et l'âge très hautement significatif ($p < 0,001$), mais ne présentent aucun effet dans l'interaction traitement-âge ($p = 0,332$).

Tableau 51. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	1,42	2	0,71	17,63	0,001***
Age	1,91	4	0,48	11,89	0,001***
Interaction	0,37	8	0,05	1,17	0,332
Erreur résiduelle	2,41	60	0,04		

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

3. 3 Comparaison de l'effet de l'insuline et de la 20E sur le stress oxydatif chez les femelles

La comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur l'activité spécifique de la catalase chez les femelles d'*E. kuehniella*, est précisée dans la figure 27. Les résultats montrent un effet similaire sur le stress oxydatif pour les deux molécules testées. Ainsi, aux jours 3 et 5, une diminution dans les valeurs de la catalase est enregistrée; le pouvoir antioxydant, noté est similaire entre les deux hormones au jour 3 mais est plus important, au jour 5 à la dose la plus forte d'insuline. Les faibles doses de 20E et d'insuline ont des valeurs comparables aux témoins à 3 et 5 jours respectivement. Une augmentation dans les valeurs de la catalase est observée aux jours 1 et 7 avec les deux molécules; la 20E agit avec un effet dose mais l'insuline agit au jour 1 à la forte dose mais au jour 7 à dose la plus faible (Fig. 27).

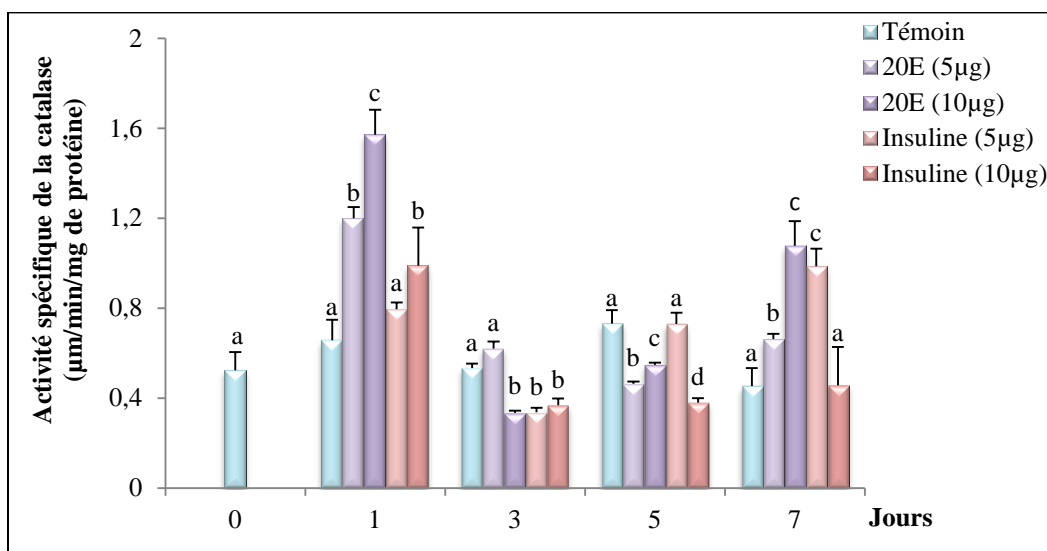


Figure 27. Effets de la 20E (5, 10 µg) et de l'insuline (5, 10 µg), administrées séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n = 6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ($p < 5\%$).

L'analyse de la variance à un critère de classification, effectuée pour chaque âge et en fonction des deux molécules utilisées, confirme ces résultats et montre des différences hautement significatives ($p < 0,01$). Le tableau 52 présente les résultats du test HSD de Tuckey qui a permis le classement des effets des deux molécules sur le stress oxydatif. L'insuline et la 20E ont un pouvoir antioxydant qui est similaire aux jours 3 et 5 du stade nymphal. Au jour 3, l'insuline agit aux deux doses et la 20E seulement à la dose la plus forte mais au jour 5, la 20E agit aux deux doses et l'insuline seulement à la dose la plus élevée. La 20E, à 10 µg, présente à 1 et 7 jours un stress oxydatif qui est le plus important. L'insuline à 10 µg montre, à 1 jour, des effets similaires à ceux trouvés avec la faible dose de 20E.

Tableau 52. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg), administrées séparément par application topique, le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal des femelles d'*E.kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	20E (10µg)	1,57	A
	20E (5µg)	1,21	B
	Insuline (10µg)	0,99	B
	Insuline (5µg)	0,80	C
	Témoin	0,66	C
3	20E (5µg)	0,62	A
	Témoin	0,53	A
	Insuline (10µg)	0,37	B
	Insuline (5µg)	0,34	B
	20E (10µg)	0,33	B
5	Témoin	0,73	A
	Insuline (5µg)	0,73	A
	20E (10µg)	0,55	B
	20E (5µg)	0,46	B
	Insuline (10µg)	0,38	B
7	20E (10µg)	1,08	A
	Insuline (5µg)	0,99	AB
	20E (5µg)	0,66	BC
	Témoin	0,48	C
	Insuline (10µg)	0,46	C

3.4. Effets de l'insuline chez les mâles

Les valeurs de l'activité spécifique de la catalase au cours du stade nymphal (0, 1, 3, 5 et 7 jours) chez les chrysalides mâles d'*E. kuehniella* témoins et traitées à l'Insuline sont représentées dans le tableau 53.

Chez les chrysalides témoins d'*E. kuehniella*, l'activité spécifique de la catalase montre une augmentation significative au jour 1 ($p < 0,001$), puis les valeurs restent stables. L'insuline n'affecte pas l'activité spécifique de la catalase au cours du stade nymphal.

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 54) révèlent un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) pour le critère âge et pas d'effets significatifs pour le critère traitement ($p = 0,43$) et pour l'interaction traitement âge ($p = 0,08$).

Tableau 53. Effets de l'insuline, administrée par application topique le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) au cours du stade nymphal des mâles d'*E.kuehniella* ($m \pm \text{S.D}$, $n = 6-8$).

Traitement Jours	Témoin	Insuline (5 μg)	Insuline (10 μg)
0	0,57 \pm 0,04 a A		
1	0,73 \pm 0,01 a B	0,73 \pm 0,02 a B	0,72 \pm 0,03 a BC
3	0,71 \pm 0,01 a B	0,66 \pm 0,02 a A	0,64 \pm 0,03 a AB
5	0,72 \pm 0,02 a B	0,78 \pm 0,02 a C	0,82 \pm 0,03 a C
7	0,75 \pm 0,02 a B	0,81 \pm 0,02 a BC	0,67 \pm 0,04 a B

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Tableau 54. Effets de l'insuline, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase au cours du stade nymphal chez les mâles d'*E. kuehniella* ($m \pm S.D$, $n= 6-8$): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,01	2	0,003	0,84	0,43
Age	0,40	4	0,10	28	0,001***
Interaction	0,05	8	0,006	1,85	0,08
Erreur Résiduelle	0,19	53	0,003		

*** : très hautement significatif ($p < 0,0001$) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

3. 5. Effets de la 20E chez les mâles

Chez les individus mâles traités à la 20E, l'augmentation du stress qui apparaît au jour 1 chez les témoins se produit plus tard (jour 5) au cours du stade nymphal; ceci pour les deux doses testées.

Chez les chrysalides mâles d'*E. kuehniella*, la comparaison entre les séries témoins et traitées à la 20E montre une réduction, dans l'activité spécifique de la catalase (Tab. 55), aux jours 1 et 3, aux deux doses testées, mais aussi au jour 7, seulement, à la forte dose ($p = 0,04$).

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tab. 56), révèlent des effets très hautement significatifs ($p < 0,001$) pour les critères traitement et âge; cependant l'interaction traitement âge ne présente aucun effet significatif ($p = 0,33$).

Tableau 55. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les mâles d'*E.kuehniella* (m ± S.D, n = 6-8).

Traitement Jours	Témoin	20E (5µg)	20E (10µg)
0	0,57 ± 0,04 a A		
1	0,73 ± 0,01 a B	0,57 ± 0,05 b A	0,59 ± 0,03 b A
3	0,71 ± 0,01 a B	0,57 ± 0,02 b A	0,59 ± 0,03 b A
5	0,72 ± 0,02 a B	0,74 ± 0,01 a B	0,74 ± 0,02 a B
7	0,72 ± 0,02 a B	0,62 ± 0,02 ab AB	0,59 ± 0,05 b A

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges (p < 5 %).

Tableau 56. Effets de la 20E, administrée par application topique (5, 10 µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur l'activité spécifique de la catalase au cours du stade nymphal chez les mâles d'*E. kuehniella* (m ± S.D, n= 6-8): ANOVA à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	1,42	2	0,71	17,63	0,001***
Age	1,91	4	0,48	11,89	0,001***
Interaction	0,37	8	0,05	1,17	0,33
Erreur Résiduelle	2,41	60	0,04		

*** : très hautement significatif (p < 0,001) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ;

CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p : niveau de significativité.

2.5.6 Comparaison de l'effet de l'insuline et de la 20E sur l'activité spécifique de la catalase chez les mâles

Chez les mâles d'*E. kuehniella*, la comparaison des effets de l'insuline et de la 20E sur l'activité spécifique de la catalase au cours du stade nymphal, montre que seul le traitement à la 20E induit un pouvoir antioxydant de par, une diminution dans l'activité spécifique de la catalase (Fig. 28).

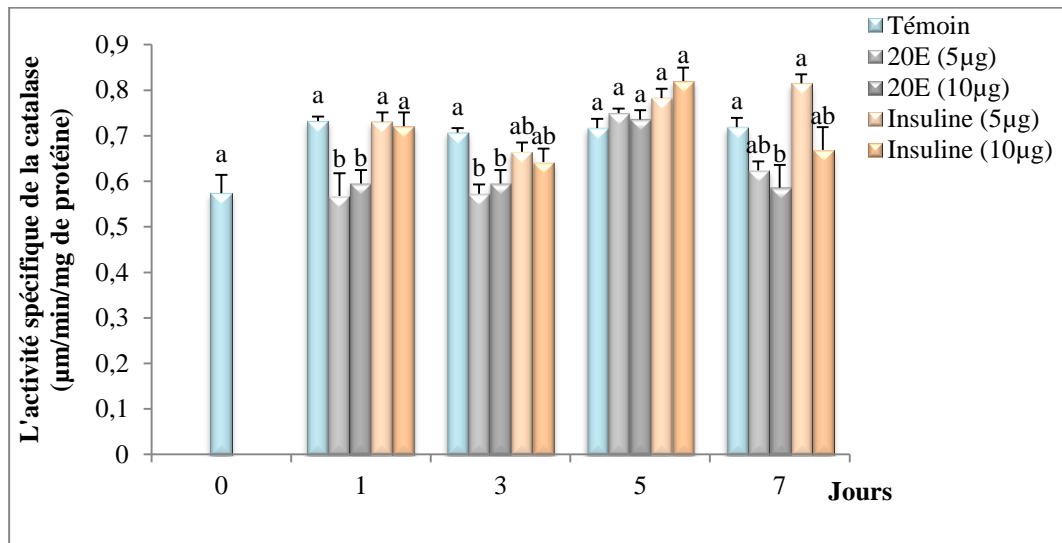


Figure 28. Effets de la 20E (5µg, 10µg) et de l'insuline (5µg, 10µg), administrées séparément, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les mâles d'*E.kuehniella* ($m \pm S.D$, $n= 6-8$).

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries. ($p < 5\%$).

L'analyse de la variance confirme le pouvoir antioxydant de la 20E chez les mâles et montre des différences hautement significatives ($p = 0,003$) à 1 jour et significatives ($p < 0,01$) à 3 et 7 jours; par ailleurs, aucune différence n'est notée au jour 5. Le tableau 57 présente le classement des effets de la 20E et de l'insuline sur le stress oxydatif, à 1, 3, 5 et 7 jours chez les chrysalides mâles d'*E. kuehniella*. Il apparait que seule la 20E aux deux doses induit un pouvoir antioxydant aux jours 1, 3 et 7 du stade nymphal.

Tableau 57. Comparaison des effets de l'insuline (5, 10 µg) et de la 20E (5, 10 µg) sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéine) au cours du stade nymphal chez les mâles d'*E. kuehniella*: Classement par le test HSD de Tukey.

Age (Jours)	Traitement	Moyennes	Groupes
1	Témoin	0,73	A
	Insuline (5µg)	0,73	A
	Insuline (10µg)	0,72	AB
	20E (10µg)	0,59	BC
	20E (5µg)	0,57	C
3	Témoin	0,71	A
	Insuline (5µg)	0,66	AB
	Insuline (10µg)	0,64	AB
	20E (10µg)	0,59	B
	20E (5µg)	0,57	B
5	Insuline (10µg)	0,82	A
	Insuline (5µg)	0,77	A
	20E (5µg)	0,75	A
	20E (10µg)	0,74	A
	Témoin	0,71	A
7	Insuline (5µg)	0,81	A
	Témoin	0,72	AB
	Insuline (10µg)	0,67	AB
	20E (5µg)	0,62	B
	20E (10µg)	0,59	B

DISCUSSION

DISCUSSION

1. Effets de l'insuline et de la 20E sur les principaux constituants biochimiques du corps gras

Le corps gras, d'origine mésodermique, est l'un des tissus les plus importants pour les processus de maintenance et de reproduction (Gillott, 1995; Roma *et al.* 2010; Hansen *et al.*, 2014). Il constitue le site de synthèse et de stockage des glucides, lipides et protéines, molécules indispensables dans les processus nutritifs et énergétiques (Keely, 1985; Van Hensden & Law, 1989 Dapporto *et al.*, 2008; Zhou & Miesfeld, 2009). Ces réserves ou sources d'énergie transportées vers les organes utilisateurs, *via* l'hémolymphe (Downer, 1985), sont contrôlées par des hormones régulatrices (Keeley, 1985) dont l'insuline. Cette hormone principale du métabolisme énergétique permet, par le stockage des métabolites dans les tissus adipeux, de maintenir l'homéostasie de l'organisme (Badisco *et al.* 2013). Chez les individus témoins d'*E. kuehniella*, la diminution dans le contenu en glucides observée durant le stade nymphal pourrait s'expliquer par l'énergie utilisée pour le processus de métamorphose (Lehninger *et al.* 1993). La réduction dans les valeurs du glycogène, forme essentielle de mise en réserves des glucides, au jour 3 de la vie nymphale coïncide avec l'apolyse (El Ouaer *et al.*, 2010) et pourrait être liée à la synthèse de la chitine nécessaire à l'élaboration de la cuticule adulte (Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011). Les résultats obtenus montrent que l'insuline humaine, induit, dans les corps gras chez *E. kuehniella*, une augmentation dans le contenu en glucides, dont le glycogène, tout comme les ILPs endogènes synthétiques (Brown *et al.* 2008). Il apparaît, également, que la 20E présente sur les contenus en glycogène un effet comparable à celui de l'insuline confirmant ainsi des travaux antérieurs réalisés chez *D. melanogaster* (Beckstead *et al.* 2005; Hou *et al.* 2012). En outre, la 20E est citée comme un inhibiteur de la glycolyse durant la métamorphose chez *Bombyx mori* (Tian *et al.* 2010). L'action similaire de l'insuline et de la 20E sur le métabolisme des sucres pourrait

s'expliquer par le fait que ces deux hormones semblent inhiber, chez *E. kuehniella*, les mêmes mécanismes moléculaires que *D. melanogaster* et *H. armigera* (Puig & Mattila 2011; Hou *et al.* 2012).

Chez les chrysalides témoins d'*E. kuehniella*, la baisse des protéines enregistrée pourrait être en relation avec le dépôt des protéines cuticulaires et l'organogénèse adulte (Soltani 1990; El Ouaer *et al.* 2010). Par ailleurs, le processus de vitellogénèse qui se déroule au cours du stade nymphal chez *E. kuehniella* (Zimowska *et al.* 1991; El Ouaer *et al.* 2010) peut aussi expliquer la diminution notée dans les valeurs des protéines. Nos résultats indiquent que l'insuline provoque, chez les nymphes d'*E. kuehniella* une augmentation des protéines dans le corps gras, conformément aux rôles connus des ILPs et, en accord avec ce qui est noté chez *A. aegypti* (Graf *et al.* 1997). La 20E présente, à faible dose, une action similaire à celle de l'insuline et l'absence d'effet à la dose la plus forte serait peut être liée à un processus de régulation; ceci en accord avec le rôle de cette hormone dans la régulation des protéines (Rao *et al.*, 2016) mais aussi à l'interaction qui est citée entre l'insuline et la 20E (Cai *et al.*, 2016). En début de stade nymphal, le traitement à la 20E chez *E. kuhniella* induit, cependant, une réduction des protéines qui est retrouvée, chez un autre lépidoptère, *Plodia interpunctella* traité, également, avec la même hormone (Rharrabe *et al.* 2009); cette baisse pourrait être liée à la synthèse des enzymes nécessaires à la dégradation de la 20E exogène ou encore au rôle possible de la 20E dans la protéolyse au cours de la mue ou la métamorphose (Cai *et al.*, 2016).

La diminution des glucides et des protéines, observée chez les chrysalides témoins d'*E. kuehniella*, peut être également liée à leur possible conversion en lipides (Lehninger *et al.* 1993); ils constituent une énergie mobilisable rapidement lors d'un jeûne et ceci peut expliquer l'augmentation notée au cours du stade nymphal. L'insuline, testée à la dose la plus forte est sans effet sur les lipides et ceci est en accord avec les travaux menés chez *D.*

melanogaster (Ceddia *et al.*, 2003) et *A. aegypti* (Brown *et al.*, 2008); par ailleurs, la voie de signalisation de l'insuline étant un régulateur possible dans la modulation de la teneur en lipides (Baumann *et al.*, 2013), la diminution de ce métabolite, observée à la faible dose (5 µg), semble s'expliquer. Après application de la 20E, les taux de lipides, chez *E. kuehniella*, restent comparables à ceux des séries témoins, confirmant les travaux réalisés chez d'autres espèces de Lépidoptères comme *Plodia interpunctella* (Rharrabe *et al.*, 2009) et *Bombyx mori* (Wang *et al.*, 2010).

Ainsi, les résultats montrent, non seulement, des effets de l'insuline humaine mais aussi le rôle de la 20E sur le métabolisme des nymphes d'*E. kuehniella*. Tatar *et al.* (2003) avait suggéré le fait que beaucoup d'effets attribués seulement l'insuline pouvaient être induits par les ecdystéroïdes. En outre, dans les corps gras, chez *D. melanogaster*, Colombani *et al.* (2005) ont noté que l'ecdysone peut être régulée à travers la modulation de la voie de la signalisation de l'insuline (*via* FoxO); cette hypothèse est aussi reprise, récemment, par Herboso *et al.*, (2015) et Fu *et al.*, (2016).

2. Effets de l'insuline et de la 20E sur la reproduction

Chez les lépidoptères comme chez *E. kuehniella*, l'ovaire est de type méroïstique polytrophique. Comprenant 8 à 10 ovarioles, il est constitué par un tube épithélial mésodermique dans lequel les ovocytes sont en succession linéaire liée à leur développement (William, 1971); chaque ovariole est caractérisée par l'existence de deux zones fonctionnelles, le germanium apical et le vitellarium (Cassier *et al.*, 1997). Le germanium contient des cellules germinales primordiales qui engendrent par division les ovocytes et les cellules nourricières et somatiques (Cassier *et al.*, 1997). Le vitellarium permet aux follicules ovariens (ovocytes, entourés par une assise de cellules folliculaires), d'accumuler des réserves (vitellus) et d'acquérir, ensuite des enveloppes protectrices de l'oeuf, sécrétées par le follicule,

appelées enveloppe vitelline et chorion (Raikhel & Dhadialla, 1992). La phase d'accroissement des ovocytes ou vitellogénèse (Cassier *al.*, 1997), étape essentielle de la reproduction correspond à la synthèse des vitellogénines par le corps gras puis à leur incorporation dans l'ovocyte pour la formation des vitellines. Ce processus est sous contrôle endocrine et est régi principalement par l'HJ et la 20E (Telfer *et al.* 2009; Delanoue *et al.*, 2010 ; Yamanaka *et al.* 2013 ; Belles & Piulachs, 2015). La vitellogénèse, chez *E. kuehniella*, s'effectue pendant la vie nymphale (Zimowski *et al.*, 1991) et, une augmentation dans le contenu en vitellogénines est notée entre 3 et 5 jours chez les séries témoins; ce pic dans les valeurs des vitellogénines est contemporain avec l'augmentation des ecdystéroïdes signalée dans divers travaux (Zimowska *et al.* 1991; El Ouaer *et al.* 2010). La 20E (5 et 10 µg) et l'insuline (5 µg), testées séparément, entraînent, toutes deux, une augmentation dans le contenu en vitellogénines et vitellines. Ce résultat est en accord avec les observations de Parthasarathy *et al.* (2010) qui signalent une potentialisation de la synthèse des vitellogénines et des vitellines par la 20E. Par ailleurs, les travaux de Roy *et al.* (2007) chez *Aedes aegypti* montrent que l'insuline entraîne, également, une augmentation des vitellogénines; chez *A. aegypti*, il a été démontré *in vitro*, un effet stimulateur direct de l'insuline bovine sur la synthèse des protéines ovariennes (Graf *et al.*, 1997). En outre, la littérature précise que les voies de signalisation insuline et 20E sont essentielles dans la vitellogénèse et la maturation des ovocytes (Okada *et al.*, 2010 ; Parthasarathy & Palli, 2011); ainsi, l'augmentation des vitellogénines mais aussi des vitellines, dans les résultats obtenus, peut être expliquée. La diminution dans le contenu en vitellogénines, observée au jour 5 du stade nymphal, après application de l'insuline pourrait être liée à une régulation par les hormones endogènes mais aussi à l'interaction moléculaire citée entre l'insuline et l'HJ (Parthasarathy & Palli 2011; Suren-Castillo *et al.*, 2012, Cai *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). L'insuline peut également agir en combinaison avec les acides aminés et la 20E comme un troisième composant régulant les

vitellogénines (Roy *et al.* 2007); cet effet régulateur sur les vitellogénines pourrait expliquer l'absence d'effet observé avec l'insuline à la dose la plus élevée (10µg). La stimulation des vitellogénines et vitellines, suite au traitement combiné, met en évidence les effets similaires de l'insuline et de la 20E et pourrait suggérer une potentialisation éventuelle dans la synthèse de ces protéines; par ailleurs, les modulations observées en fonction de la dose d'insuline et/ou de la période d'application, semblent être en faveur de l'interaction et/ou de l'inter-régulation, citée dans la littérature, entre ces deux hormones (Puig & Mattila, 2011 ; Quinn *et al.*, 2012; Antonova *et al.*, 2012; Yamanaka *et al.*, 2013; Herboso *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2016). Les interactions insuline/20E ou insuline/JH, basées sur des relations complexes *via* le facteur de transcription FoxO, sont mises en évidence mais restent à l'étude (Yamanaka *et al.*, 2013; Antonova *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2016).

La stéroïdogénèse ovarienne, chez les insectes, est une remarquable cible pour l'insuline (Riehle & Brown, 1999). L'insuline bovine stimule, *in vitro*, chez *A. aegypti* (Riehle and Brown, 1999) et chez *Phormia regina* (Maniere *et al.*, 2004) la synthèse des ecdystéroïdes ovariens. Il a été reporté que l'insuline bovine peut augmenter la production des ecdystéroïdes dans les ovaires chez *A. aegypti* (Riehle & Brown 1999; Brown *et al.*, 2008) et que l'insuline porcine stimule également ce même paramètre chez la même espèce (Graf *et al.*, 1997). Cependant, l'insuline des mammifères, semble constituer de mauvais agoniste pour la production des ecdystéroïdes, comparativement aux ILPs endogènes (Brown *et al.*, 2008). Chez *E. kuehniella*, l'évaluation des ecdystéroïdes ovariens, avant ou après hydrolyse enzymatique par une estérase de foie de porc, révèle que les ecdystéroïdes conjugués représentent seulement 8,37% de la quantité totale en ecdystéroïdes (Yezli *et al.*, communication personnelle). Dans nos résultats, l'application de 20E et d'insuline montre, comparativement aux témoins, des effets similaires correspondant à une diminution des ecdystéroïdes libres ovariens. L'action similaire des deux hormones est probablement le fait

de l'intervention du même mécanisme moléculaire (Puig & Mattila 2011). L'effet le plus marqué, noté avec la faible dose de 20E, peut suggérer une régulation endocrine; par ailleurs, *in vivo*, différents facteurs (hormones, peptides et protéines kinases) peuvent affecter la biosynthèse hormonale (Belles & Piulack, 2015) ; en outre, les ecdystéroïdes peuvent avoir un rôle sur leur propre synthèse *via*, un effet feedback sur l'axe de la PTTH (cerveau) et/ou *via* une action directe sur les organes ecdysiogéniques (GP et/ou autres sources comme les ovaires) (Belles & Piulack, 2015). Par ailleurs, chez les larves de *D. melanogaster*, la sécrétion des ILPs est corrélée avec une réduction dans la synthèse d'ecdysone (Herboso *et al.*, 2015). Chez les espèces de Lépidoptères, de récentes études montrent la régulation par les ILPs de la production des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques; ceci, peut être, de par les signaux de l'état nutritionnel et *via* la PTTH (Antonova *et al.*, 2012). Par ailleurs, le rôle des ILPs, lié à l'hormone ecdystéroïdogénique, (OEH) stimulant la production des ecdystéroïdes dans les ovaires n'est pas encore clair.

La diminution des ecdystéroïdes ovariens, chez *E.kuehniella*, pourrait être liée à l'impact négatif noté sur le potentiel reproducteur. En effet, les ecdystéroïdes synthétisés par les cellules folliculaires ovariennes, stimulent l'ovulation, ont un rôle majeur dans la maturation des œufs et contrôlent le développement embryonnaire (Gäde & Hoffmann, 2005; Lafont *et al.*, 2005; Parthasarathy *et al.*, 2010; Gancz *et al.*, 2011; König *et al.*, 2011; Ting, 2013). En outre, la voie de signalisation de l'insuline agit sur la différenciation de l'ovaire et est essentielle aux derniers stades de la maturation folliculaire (Okada *et al.* 2010). Les résultats obtenus révèlent que la 20E et l'insuline induisent une réduction de la fécondité et de la fertilité chez les femelles adultes d'*E.kuehniella*. Cet impact sur le potentiel reproducteur est en accord avec la littérature où il est noté que la voie de signalisation de l'insuline peut affecter, *via* l'HJ, la reproduction (Rauschenbach *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2016) et réduire la fécondité (Baumann *et al.*, 2013). Similairement, la 20E ou les agonistes des ecdystéroïdes provoquent

également une baisse de la fertilité et de la fécondité (Lanot *et al.*, 1989; Swevers *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000; Dhadialla *et al.*, 1998; 2005). Cependant, et malgré l'action similaire des deux hormones sur le nombre d'œufs pondus, l'effet le plus drastique est noté pour la dose la plus faible d'insuline et pour la dose la plus forte de 20E. L'effet variable de la 20E, observé en fonction de la dose administrée, a été cité par des études antérieures (Chudakova *et al.*, 1982); en effet, l'injection de petites doses stimule la fécondité, alors que de fortes doses l'inhibent. La diminution dans le nombre d'œufs pondus, notée dans nos résultats après traitement à l'insuline et à la 20E, peut être attribuée à une résorption des ovocytes (Salem *et al.*, 1997), une inhibition de la croissance des ovaires et des ovocytes (Seixas *et al.*, 2008) ou encore à une baisse de l'attractivité sexuelle (Kuo *et al.*, 2012). Kuo *et al.* (2012) et Baumann *et al.* (2013) notent également que l'insuline affecte négativement le pourcentage d'œufs éclos. Ce paramètre semble, aussi être lié à la diminution des ecdystéroïdes ovariens. En effet, les ecdystéroïdes présents dans les œufs sont d'origine maternelle et une réduction peut affecter l'embryogénèse et inhiber l'éclosion des œufs (Hoffmann, 1980, Sonobe et Yamada, 2004, Lafont *et al.*, 2005). Ainsi, la baisse dans le pourcentage des œufs éclos, notée après traitement avec l'insuline et la 20E, peut s'expliquer. Néanmoins, malgré la réduction de la fécondité observée, le traitement à l'insuline et la 20E ne modifie pas la période de préoviposition. Cependant, la période d'oviposition est plus courte après traitement à l'insuline aux deux doses; ceci peut être expliqué par le fait que l'insuline stimule la maturation des œufs et peut, par conséquent, réduire la période de ponte (Brown *et al.*, 2008). Nos résultats montrent que la 20E semble ne pas affecter la période d'oviposition mais cet élément semble être controversé dans la littérature; en effet, la 20E stimule l'oviposition chez *Ornithodoros moubata* (Ogihara *et al.*, 2007) alors que le RH2485 (agoniste des ecdystéroïdes) l'inhibe chez *E.kuehniella* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

L'ajustement des fonctions du système endocrin et la voie de signalisation de l'insuline sont contrôlées par un même mécanisme moléculaire (Puig & Mattila 2011); par conséquent, un rôle régulateur est suggéré dans le processus de reproduction où l'HJ et la 20E sont impliquées et interagissent (Quinn *et al.*, 2012; Yamanaka *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2016).

3. Effets de l'insuline et de la 20E sur l'activité de la catalase

La catalase (CAT), est une enzyme cytosolique inductible dont la fonction est de protéger les systèmes biologiques contre les dommages liés au stress oxydatif (Roméo *et al.*, 2000). C'est une enzyme héminique, elle contient donc des atomes de fer au sein de hèmes qui constituent les sites actifs de la protéine. Cette enzyme catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Digiulio *et al.*, 1989; Orbea *et al.*, 2002). La catalase est très utilisée comme biomarqueur de stress oxydatif (Van der-oost *et al.*, 2003 ; Napierska & Barsiene, 2009). Celui-ci apparaît quand les ERO «espèces réactives à l'oxygène», produits hautement nocifs provenant de la respiration cellulaire, sont en excès dans l'organisme par rapport aux défenses anti-oxydantes naturelles (Velki *et al.*, 2011). L'augmentation dans la concentration de ces ERO est une menace contre l'intégrité des processus cellulaires (Puig & Mattila 2011). Chez les séries témoins d'*E. kuehniella*, la hausse du stress oxydatif, observée entre 3 et 5 jours, peut être expliquée par le métabolisme lié aux divisions cellulaires et à la différenciation au cours de la métamorphose (Puig & Mattila 2011). Après application de 20E et d'insuline, les résultats obtenus sur le stress oxydatif, sont différents entre les chrysalides mâles et femelles d'*E. kuehniella*. Chez les mâles, l'insuline n'a pas d'effet mais la 20E induit un pouvoir antioxydant aux jours 1, 3 et 7 en accord avec la littérature (Krishnan *et al.*, 2007); l'absence d'effet au jour 5 pourrait être lié au pic hormonal d'ecdystéroïdes concomittant, relié au processus de mue (Elouaer, 2006; 2010), suggérant une régulation avec l'hormone endogène. Chez les femelles, le pouvoir antioxydant est également

noté aux jours 3 et 5 après application, non seulement de 20E mais aussi d'insuline; chez les femelles, cette période coïncide, aussi, avec le pic hormonal endogène lié à la mue. Ainsi, à la différence des mâles, le processus de vitellogénèse chez les femelles permettrait d'expliquer la sensibilisation à l'insuline. Il faut préciser, cependant, que l'effet le plus important est noté, au jour 3, avec la forte dose de 20E mais au jour 5, avec la forte dose d'insuline. A l'opposé, à 1 et 7 jours, il est noté chez les femelles, un stress oxydatif qui est plus important au jour 1 et avec la forte dose de 20E et au jour 7 la faible dose d'insuline. Les effets similaires de l'insuline et de la 20E sur le pouvoir antioxydant notés dans nos résultats, s'expliquent par le mécanisme moléculaire commun qui joue un rôle central dans les voies de signalisation de l'insuline et de la 20E mais aussi de la protection de l'organisme contre le stress oxydatif (Puig & Mattila 2011; Tettweiler *et al.*, 2005). La modulation dans le stress oxydatif, retrouvée chez les femelles, semble être effectuée par l'insuline, en accord avec la littérature (Tettweiler *et al.*, 2005; Krishnan et Kodrík, 2011) *via* le facteur FoxO (Jünger *et al.*, 2003; Puig & Mattila, 2011). Par ailleurs, les effets différents sur le stress oxydatif, dépendants de l'âge des chrysalides et/ou des doses d'insuline ou de 20E utilisées pourraient être liées à des modulations et/ou interactions entre ces deux hormones (Puig & Mattila, 2011; Herboso *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats sur les aspects métaboliques montrent que l'insuline humaine peut agir chez *E. kuehniella*. Les récepteurs d'insuline, hautement conservés et l'action d'un même mécanisme moléculaire peuvent expliquer cette action; en outre, des études suggèrent que de multiples ILPs peuvent activer le même récepteur insuline et stimuler la transduction du signal. Les différences d'action entre l'insuline humaine et les ILPs endogènes peuvent être expliquées par une spécificité de la liaison entre l'insuline et le récepteur. Parallèlement, la 20E agit aussi sur le contrôle du métabolisme et entraîne des effets similaires à ceux induits par l'insuline. L'insuline humaine induit, chez *E. kuehniella*, les effets connus pour les glucides et les protéines mais pas pour les lipides. La stabilité dans les contenus en lipides peut être expliquée par une balance entre leur utilisation et leur stockage. Les variations dans le contenu en métabolites chez les nymphes, observées en fonction de l'âge et de la dose, peuvent être liées à la mobilisation de l'énergie nécessaire au cours de la métamorphose et/ou une éventuelle régulation par les hormones endogènes; la diminution des lipides, à faible dose d'insuline, serait en faveur de cette hypothèse.

L'insuline et la 20E stimulent les vitellogénines et les vitellines mais des différences sont observées en fonction de la dose et du moment d'application; un effet plus important est notée avec la 20E. Le traitement combiné avec les deux molécules indique, un effet similaire sur la stimulation de la vitellogénèse pour la majorité des combinaisons. Cependant, l'absence d'effet à la forte dose d'insuline en traitement simple ou combinée ou encore l'effet de la période d'application de l'insuline (3j ou 5 j) semblent être en faveur d'une interaction hormonale et/ou d'une régulation. L'insuline et la 20E induisent une diminution dans les ecdystéroïdes ovariens, expliquant la réduction du potentiel reproducteur (fécondité, fertilité et pourcentage d'éclosion des œufs), de par leur rôle dans l'ovulation et le développement post-embryonnaire. La période d'oviposition est plus courte après traitement à l'insuline et ce,

de par l'intervention de cette hormone dans la maturation des œufs; la 20E semble ne pas affecter la période d'oviposition mais ce dernier résultat reste controversé dans la littérature. La période de préoviposition n'est pas affectée par les deux hormones testées.

L'insuline et la 20E agissent sur le stress oxydatif mais cet effet diffère entre les mâles et les femelles d'*E. kuehniella*; ceci pourrait être lié à la reproduction des femelles. Cependant, le pouvoir antioxydant noté, pour les deux sexes au milieu du stade nymphal, pourrait suggérer un lien avec le pic concomitant des ecdystéroïdes endogènes. Par ailleurs, chez les femelles, les résultats montrent également des effets variables dépendants de l'âge des chrysalides et/ou des doses d'insuline ou de 20E utilisées.

En définitive, l'application topique de la 20E et de l'insuline humaine chez *E. kuehniella* révèle des effets similaires sur tous les paramètres considérés. Les modulations observées qui sont fonction des doses et des âges peuvent être expliquées par les interactions possibles entre l'insuline et les ecdystéroïdes; ceci, en particulier, quand les deux hormones sont impliquées dans le contrôle des mêmes fonctions. Chez *E. kuehniella*, nos résultats montrent que l'insuline agit au niveau du corps gras mais ne peut stimuler la stéroïdogénèse ovarienne. Des études montrent que les ILPs peuvent différer dans leur capacité à activer divers processus physiologiques; en effet, à des doses similaires, les ILPs ne peuvent activer des processus métaboliques dans le corps gras mais activent, *in vitro*, la production des ecdystéroïdes.

De futures investigations sont nécessaires pour comprendre comment de multiples ILPs interagissent avec un récepteur d'insuline et coordonnent divers processus physiologiques et comportementaux dans différents tissus. Les mécanismes d'action de l'insuline et de la 20E restent, en outre, à clarifier. Par ailleurs, un traitement combiné entre l'insuline humaine et la 20E, à différentes doses et différents temps d'application, paraît nécessaire afin de préciser les interactions entre ces deux hormones (métabolisme, reproduction et stress oxydatif).

RESUMES

RESUME

Les effets de l'insuline humaine et de la 20E, testées séparément (5 et 10 µg) par application topique le jour de l'exuviation nymphale, ont été évalués chez *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) sur des processus où ces deux molécules interagissent, la reproduction et le stress oxydatif; néanmoins, les effets primaires de l'insuline humaine, chez l'insecte, ont tout d'abord été précisés. L'insuline humaine et la 20E entraînent, chez les séries traitées, une augmentation dans le contenu en sucres totaux, glycogène et protéines, présents dans les corps gras; le contenu en lipides diminue seulement à la faible dose d'insuline. Les effets de la 20E et de l'insuline sur le contenu en métabolites dans le corps gras sont similaires mais l'insuline montre un effet plus marqué. L'insuline humaine et la 20E, en traitement simple, entraînent une augmentation dans le contenu en vitellogénines dans le corps gras et, en vitellines dans les ovaires. Le traitement combiné avec les deux molécules indique, un effet similaire sur la stimulation de la vitellogénèse (vitellogénines et vitellines) pour la majorité des combinaisons. Le contenu en vitellogénines et vitellines reste comparable aux témoins quand l'insuline est appliquée à 10 µg au jour 5 et à 10 µg au jour 3 respectivement. Le traitement simple induit, en outre, une diminution dans le contenu en ecdystéroïdes ovariens mais aussi une baisse de la fécondité et de la fertilité pour les deux molécules testées. La période de préoviposition n'est pas affectée par l'insuline et la 20E et, seule, l'insuline, réduit la période d'oviposition. La 20E présente, sur les divers paramètres de reproduction, un effet plus important que l'insuline. Cependant, l'absence d'effet à la forte dose d'insuline en traitement simple ou encore l'effet de la dose et/ou de la période d'application d'insuline (3j ou 5 j), en traitement combiné, semblent être en faveur d'une interaction hormonale et/ou d'une régulation. La 20E et l'insuline présentent, chez les femelles d'*E. kuehniella*, les mêmes effets sur le stress oxydatif avec un pouvoir antioxydant à 3 et 5 jours. Chez les mâles d'*E. kuehniella*, seul, le traitement à la 20E entraîne une diminution dans le stress oxydatif.

L'insuline et la 20E agissent similairement chez *E. kuehniella*. Les modulations observées, en fonction de l'âge et de la dose, semblent liées à l'interaction citée entre les deux hormones; néanmoins, l'hypothèse d'une régulation avec les hormones endogènes n'est pas écartée.

Mot Clés : *Ephestia kuehniella*, Insuline, 20-hydroxyecdysone, Reproduction, Stress oxydatif.

ABSTRACT

The effects of human insulin and 20E, tested separately (5 and 10 µg) by topical application on newly emerged pupae, were evaluated in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) on processes where these two molecules interact, the reproduction and oxidative stress. Nevertheless, the primary effects of human insulin in the insect had initially been clarified. Human insulin and 20E lead in the treated series to an increase in total carbohydrates, glycogen and protein content in the fat body; the lipids content decreases only to a lower dose of insulin. 20E and insulin effects on metabolites contents in the fat body are similar; however, the effect is stronger with insulin. Human insulin and 20E, in separate treatment, increase the vitellogenins and vitellin contents, respectively, in the fat body and ovary. The combined treatment with the two molecules indicates a similar effect on vitellogenesis stimulation (vitellins and vitellogenins) for the majority of combinations. Vitellogenins and vitellins contents remain comparable to control when insulin applied to 5 µg on day 3 and 10 µg on day 5 respectively. The simple treatment induces additionally a reduction of ecdysteroids content in ovaries but also a decrease in the fecundity and fertility, for the two tested molecules. The preoviposition period is not affected by insulin and 20E; and only insulin reduced oviposition period. 20E shows a greater effect, compared to insulin, on various reproductive parameters. However, the lack of effect at high dose of insulin in separate treatment or even effects of the dose and/or the period of insulin application (3 days or 5 days) in combined treatment, seem to favor an hormonal interaction and / or regulation. In females of *E. kuehniella*, 20E and insulin present the same effects on oxidative stress with antioxidant power at 3 and 5 days. In males of *E. kuehniella*, only 20E treatment causes a reduction in oxidative stress.

Insulin and 20E act similarly in *E. kuehniella*. The observed modulations according to the age and the dose could be related to the cited interaction between these two hormones; nevertheless, the hypothesis of interaction with endogenous hormones seems possible.

Key words: *Ephestia kuehniella*, Insulin, 20-hydroxyecdysone, Reproduction, oxidative stress

المخلص

تم اختبار تأثير الأنسولين البشري و 20E بشكل منفصل (5 و 10 µg) من خلال التطبيق الموضوعي يوم انسلاخ العذراء، عند *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) اجري التقييم على العمليات أين تتفاعل الجزيئتين : التكاثر و الإجهاد التاكسدي . في البداية قد تم تحديد التأثير الأولي للأنسولين البشري عند الحشرة. يؤدي كل من الأنسولين البشري و 20E، في السلسلة المعاملة إلى زيادة في محتوى السكريات التامة، الجليكوجين والبروتينات، و يقلل فقط من محتوى الدهون عند الجرعة المنخفضة من الأنسولين . إن تأثيرات 20E و الأنسولين على محتوى المكونات الحيوية في الجسم الدهني متشابهة ولكن يظهر الأنسولين تأثير أقوى. المعاملة البسيطة بالأنسولين البشري و 20E، تزيد في محتوى vitellogenines في الجسم الدهني و vitellines في المبايض. المعاملة المزدوجة تشير إلى تأثير متشابه على تحفيز تكوين vitellines و vitellogenines لمعظم المجموعات، يبقى محتوى Vitellogenines و Vitellines مشابه للشواهد عندما يتم تطبيق الأنسولين في الجرعة 5µg في اليوم 3 و 10 µg في اليوم 5 على التوالي. المعاملة البسيطة تؤدي إلى انخفاض في محتوى ecdysteroides المبيضي ولكن انخفاض في عدد البيوض ونسبة البيض المفصص لكل من الجزيئات التي تم اختبارها. لا يؤثر الأنسولين و 20E على مدة ما قبل الوضع ولكن الأنسولين فقط يقلل من فترة وضع البيض ، 20E تؤثر أكثر من الأنسولين . إن عدم وجود تأثير في الجرعة العالية للأنسولين في المعاملة البسيطة أو تأثير الجرعة و / أو فترة تطبيق الأنسولين (3أيام أو 5أيام) في المعاملة المزدوجة يبدو ارتباطه بالتفاعل الهرموني و / أو التنظيم. عند إناث *E. kuehniella* ، 20E و الأنسولين يقدمان نفس التأثيرات على الإجهاد التاكسدي مع مضاد للأكسدة اليوم 3 و 5. عند ذكور *E. kuehniella*، المعاملة ب 20E تسبب انخفاضا في الإجهاد التاكسدي و لكن الأنسولين ليس له تأثير .

عند *E. kuehniella* ، الأنسولين و 20E لهما نفس التأثير و التنظيم الملاحظ حسب العمر و الجرعة قد يكون ذو صلة بالتفاعل المذكور بين الهرمونيين، و لكن يبدو التفاعل مع الهرمونات الذاتية ممكنا.

الكلمات المفتاحية: *Ephestia kuehniella* ، انسولين، 20-hydroxyecdysone ، التكاثر ، الإجهاد التاكسدي

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdellaoui, K. , Ben Halima-Kamel, M., Soltani, N., Aribi, N. & Ben Hamouda, M. H. 2013.** Biochemical and Histological Effects of Gibberellic Acid on *Locusta migratoria migratoria* Fifth Instar Larvae. *Pest. Biochem. Physiol.* **107**: 32-37.
- Antonova, Y., Arik, A. J., Moore, W., Riehle, M. A. & Brown, M. R. 2012.** Insulin-Like Peptides: Structure, Signaling, and Function. In L.I. Gilbert (ed.) *Insect Endocrinol*, Academic press, chapter 2, pp. 63-92.
- Aribi N., Quenedey, A., Pitoizet, N. & Delbeque, J.P. 1997.** Ecdysteroid Titres in a Tenebrionid Beetle, *Zophobas Atratus*: Effects of Grouping and Isolation. *J. Insect Physiol.* **43** (9): 815-821.
- Badisco, L., Wielendaele, P. V. & Broeck, J. V. 2013.** Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Front Physiol.* **4**: 1-16.
- Balachowsky. 1972.** Blood sucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals. *Mix. Publ. Ent. Soc. Am.* **8**: 161-376.
- Baltaev,U. A, & Shangaraeva, G. S. 2000.** Zooecdysteroids: Distribution and Role in Arthropod Life Cycles. *Chem Natur Comp.* **36** (6) : 543-559
- Bataille, A., Anton, M., Mollat, F., Bobe, M., Bonneau, C., Caramaniam, M. N., Geraut G. & Dupas, D. 1995.** Respiratory allergies among symptomatic bakers and pastry cooks : initial results of a prevalence study. *Allergie et immunologie.* **27**(1): 7-10.
- Baumann, A. A., Benoit, J. B., Michalkova, V., Mireji, P. O., Attardo, G. M., Moulton, J. K., Wilson, T. G. & Aksoy. S. 2013.** Juvenile hormone and insulin suppress lipolysis between periods of lactation during tsetse fly pregnancy. *Mol Cell Endocrinol.* **372**: 30-41.

- Beckstead, R. B., Lam, G. & Thummel, C. S. 2005.** The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Genome Biol.* **6**: 1-13.
- Belles, X. & Piulachs, M. D. 2015.** Ecdysone signalling and ovarian development in insects: from stem cells to ovarian follicle formation. *Biochim Biophys Acta.* **1849** (2): 181-186.
- Bergeron, L., Filobelo, L. F., Galkin, O. & Vekilov, P. G. 2003.** Thermodynamics of the Hydrophobicity in Crystallization of Insulin. *Biophys J.* **85** (6): 3935-3942.
- Bialecki, M., Shilton, A., Fichtenberg, C., Segraves, W. A. & Thummel, C. S. 2002.** Loss of the ecdysteroidinducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev. Cell.* **3**:209-20.
- Bonneton, F., Zelus, D., Iwema, T., Robinson-Rechavi, M. & Laudet, V. 2003.** Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between EcR and USP-RXR. *Mol. Biol. Evol.*, **20** (4): 551- 553.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.***72**: 248-254.
- Brange, J. 1987.** Galenics of insulin: The physic-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 103p.
- Brown, M. R., Clark, K. D., Gulia, M., Zhao, Z., Garczynski, S. F. & Crim, J. W. 2008.** An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci.* **105**: 5716-5721.
- Brown, M. R., Sieglaff, D. H. & Rees, H. H. 2009.** Gonadal ecdysteroidogenesis in arthropoda: occurrence and regulation. *Annu Rev Entomol.* **54** :105-125.
- Cai, M.J., Zhao, W.L., Jing, Y.P., Song, Q., Zhang, X. Q., Wang, J.X. & Zhao, X. F. 2016.** 20-hydroxyecdysone activates Forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting. *Develop.* **10**: 1242

- Caspari, E. W. & Gottlieb, F.J. 1975.** The Mediterranean meal moth *Ephestia kuehniella*, R. C. King Handbook of genetics, Plenum, New York, 125-147.
- Cassier, P., Lafont, R., Descamps, M., Porchet, M. & Soyeux, D. 1997.** Reproduction des invertébrés : Stratégies, modalités et régulation. *Edition Masson*. 354p.
- Ceddia, R. B., Bikopoulos, G. J., Hilliker, A. J. & Sweeney, G. 2003.** Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in *Drosophila* Kc cells. *FEBS Letters*. **555**: 307-310.
- Chudakova, I., Maslennikova, V. & Luchnikova, E. 1982.** Effect of 20-hydroxyecdysone on *Acheta domesticus* (L) (Orthoptera) and *Drosophila melanogaster* Meig (Diptera) reproduction. *Zool. Jb. Physiol.* **86**: 45-52.
- Cipola, C., Lugo, G., Sassi, C., Belisario, A., Nucci, M. C., Palermo, A., Pascarolli, M. A., Nobile, M. & Raffi, G. B. 1996.** A new risk of occupational disease: allergic rhinoconjunctivitis in persons working with beneficial arthropods. *Insect. Arch. Occup. Environ Health*. **68**: 133-135.
- Claiborne, A. 1985.** Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 283-284.
- Colombani, J., Andersen, D. S. & Leopold, P. 2012.** Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science*. **336**: 582-585.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E. & Dauphin –Villemant, C. 2005.** Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Sciences*. **310**: 667-670.
- Cruickshank, W. J. 1971.** Formation and possible function of the accessory yolk nuclei in *Anagasta* (*Ephestia kuehniella*). *Nature*. **201**: 735-736.

- Dapporto, L., Lambardi, D. & Turillazzi, S. 2008.** Not only cuticular lipids: first evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus* *J. Insect Physiol.* **54** (1): 89-95.
- De Loof, A. 2008.** Ecdysteroids, juvenile hormone and insect neuropeptides: Recent successes and remaining major challenges. *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**: 3-13.
- 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 p. 9
- Delanoue, R., Slaidina, M. & Leopold, P. 2010.** The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *Drosophila* fat cells. *Dev Cell.* **18** (6): 1012-1021.
- Delbecque, J.P., Weidner, K. & Hoffmann, K.H. 1990.** Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invert Reprod Devel.* **18**: 29-42.
- Dhadialla T.S., Retnakaran A. & Smaghe G., 2005.** Insect growth and development-disturbing insecticides, in: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier–Pergamon, Oxford, UK. **6**: 55-115
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R. & Lee, D.P., 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu.Rev. Entomol.* **43**: 545-569.
- Digiulion, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R. J., Winston, G.W. & Jewell, C. S. 1989.** Biochemical responses in aquatic animals – a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 1103-1123.
- Downer, R.G.H. 1985.** Lipid metabolism. In: Kerkut GA, Gilbert L (Eds.), *Comprehensive insect biochemistry, physiology and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, **10**: 77-113.

- Duchateau, G & Florkin, M. 1959.** Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Arch Int Physiol Biochem.* **67**: 306-314.
- El Ouar, I., Aribi, N. & Soltani-Mazouni, N. 2010.** Dosage des ecdystéroïdes chez *Ephestia kuehniella*. Actes de la CIFE VI. Travaux de l'Institut Scientifique. Série Zoologie. **47**: 137-140.
- El-Ouar, I., Aribi, N. & Solani-Mazouni, N. 2006.** Effet d'un analogue de l'hormone juvénile (Pyriproxifene) sur le profil de l'hormone de mue et la résistance chez la pyrale de la farine *Ephestia kuehniella*. Actes du Colloque International d'Entomologie et de Nématologie, INA Alger :75-81.
- Fabre, M.C, Descamps, M. & Baert, J.L. 1990.** Identification and partial characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulata* LATREILLE (Myriapoda Chilopoda). *In Proceedings of the 8th International Conference on Myriapodology*, Innsbruck, Austria. Ber. nat.ined. Verein Innsbruck: 117-121.
- Francis, V.A., Zorzano, A. & Teleman, A. A. 2010.** dDOR is an EcR coactivator that forms a feed-forward loop connecting insulin and ecdysone signaling. *Curr. Biol.* **20**: 1799-1808.
- Fu, K. Y., Zhu, T. T., Guo, W.C., Ahmat, T. & Li, G. Q. 2016.** Knockdown of a putative insulin-like peptide gene *LdILP2* in *Leptinotarsa decemlineata* by RNA interference impairs pupation and adult emergence. *Gene.* **581**: 170-177
- Gäde, G. & Hoffmann, K.H. 2005.** Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol Entomol.* **30** : 103-121.
- Gancz, D., Lengil, T. & Gilboa, L. 2011.** Coordinated regulation of niche and stem cell precursors by hormonal signaling. *PLoS Biol.* **9**:e1001202.

- Gao, F.X., Hou, Z., Liu, Y.C., Wu, S.Q. & Ao, C. J. 2008.** Effect of maternal under-nutrition during late pregnancy on lamb birth weight, *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **21**: 371- 375.
- Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E. & Dominguez, M. 2012.** Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Sciences.* **336**: 579-582.
- Gilbert, L. I. & Rewitz, K. F. 2009.** The function and evolution of the hallowe genes: the pathway to the arthropod molting hormone. In: Smagghe, G.(Ed.),*Ecdysone: Structure and Function*, Springer, Netherlands: 231-269.
- Gillott, C. 1995.** Entomology. Plenum Press, New York.
- Glitho, I., Delbeque, J. P. & Delachambre, J. 1979.** Prothoracic gland involution related to molting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* (L.) *Insect. Physiol.* **25**: 187-191.
- Goldsworthy, G. J., Mordue, W. & Guthkelch, J. 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen Comp Endocrinol.* **18**: 545-551.
- Graf, R., Neuenschwander, S., Brown, M. R. & Ackermann, U. 1997.** Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of blood-fed *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* **6**: 151-163.
- Gu, S. H & Chow, Y. S. 2003.** Stimulation of juvenile hormone biosynthesis by different ecdysteroids in *Bombyx mori*. *Zool stud.* **42** (3): 450-454.
- Gu, S. H., Yeh, W. L., Young, S. C., Lin, P. L. & Li, S. 2012.** TOR signaling is involved in PTH-stimulated ecdysteroidogenesis by prothoracic glands in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol.* **42**: 296-303.

- Hansen, I. A., Attardo, G. M., Rodriguez, S. D. & Drake, L. L. 2014.** Four-way régulation of mosquito yolk protéines precursor genes by juvenile hormone , ecdysone , nutriment , and insulin - l'île peptide signaling pathways. *Front physiol.* **5**: 103.
- Henrich, V. 2005.** The ecdysteroid receptor. In L.I. Gilbert, I. Kostas, S.Gill (eds) *Comprech.Insect.Mol.Sci*, Elsevier. **3**: Pergamon Press, New York.
- Herboso, L., Oliveira, M. M., Talamillo, A., Pérez, C., González, M., Martín, D., Sutherland, J. D., Shingleton, A. W., Mirth, C. K. & Barrio, R. 2015.** Ecdysone promotes growth of imaginal discs through the regulation of Thor in *D. melanogaster*. *Scientific Reports.* **5**: 12383
- Hoffmann, J. 1980.** Ecdysone et reproduction chez les femelles adultes d'insectes. *Reprod. Nutr. Develop.* **20** (2): 443-456.
- Hou, L., Cai, M. J., Liu, W., Song, Q. & Zhaon, X. F. 2012.** Small GTPase Rab4b participates in the gene transcription of 20-hydroxyecdysone and insulin pathways to regulate glycogen level and metamorphosis. *Dev. Biol.* **371**: 13-22.
- Hua, Q. 2010.** Insulin: a small protein with a long journey. *Protein Cell.* **1**: 537-551.
- Jian, C. X., Liu, X. F., Hu, J., Li, C. J., Zhang, G., Li, Y., Zhu, J. W. & Tan, Y. H. 2013.** 20-hydroxyecdysone-induced bone morphogenetic protein -2- dependent osteogenic differentiation through the ERK pathway in human periodontal ligament stem cells. *Eur. J. Pharmacol.* **698**: 48-56.
- Jeffers, L. A., Shen, H., Bissinger, B. W., Khalil, S., Gunnoe, B. & Roe, M. 2014.** Polymers for the stabilization and delivery of proteins topically and *peros* to the insect hemocoel through conjugation with aliphatic polyethylene glycol. *Pest Biochem Physiol.* **115**: 58-66
- Jünger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Vegh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., & Hafen, E. 2003.**The *Drosophila* forkhead transcription factor

FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling.

J. Biol. **2**: 20

Kapur, P., Wuttke, W., Jarry, H. & Seidlová-Wuttke, D. 2010. Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine*.**17**: 350-355.

Keeley, L. L. 1985. Physiology and biochemistry of fat body. In: Kerkut GA, Gilbert L (Eds.), *Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, **3**: 211-248.

Konig, A., Yatsenko, A. S., Weiss, M. & Shcherbata, H. R. 2011. Ecdysteroids affect *Drosophila* ovarian stem cell niche formation and early germline differentiation. *EMBO J.* **30**: 1549-1562

Kozlova, T. & Thummel, C.S. 2003. Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*, **301**: 1911-1914.

Krishnan, N. & Kodrík, D. 2011. Endocrine control of oxidative stress in insects. In: Farooqui, A.A., Farooqui, T. (Eds.), *Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell Signalling*, Wiley-Blackwell, pp 261-270.

Krishnan, N., Vecverva, J., Kodrík, D. & Sehnal, F. 2007. 20-Hydroxyecdysone Prevents Oxidative Stress Damage in Adult *Pyrrhocoris apterus*. *Arch Insect Biochem Physiol.* **65**: 114-124.

Kuo, T. H., Fedina, T. Y., Hansen, I., Dreisewerd, K., Dierick, H. A. & Yew, J. Y., et al. 2012. Insulin signaling mediates sexual attractiveness in *Drosophila*. *PLoS Genet* **8**: 1-11.

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

- 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.
- Lanot, R., Dorn, A., Günsten, B., Thiebold, J., Lagueux, M. & Hoffman, J. A. 1989.** functions of ecdysteroids in oocyte maturation and embryonic of Insects. In J. Koolmann (ed) : Ecdysone, from chemistry to mode of action. *Thieme Stuttgart*, pp 260-270
- Lehninger, A.L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. 1993.** In principles of Biochemistry, Worth publishers, New York, 400p.
- Loeb, M. j., Woods, C. W., Brandit, E. P. & Borkovec, A. B. 1982.** Larval testes of the tobacco bud worm: A new source of insect ecdysteroids. *Sciences. 218*: 896-898.
- Loeb, M.j., Brandit, E. P & Birnbaum, M. j. 1984.** Ecdysteroid production by testes of the tobacco bud worm, *heliothis virescens*, from last instar to adult. *J. Insect. Physiol.* **30**: 357-381.
- Lynn, D. E. & Ferkovich, S. M. 2004.** New cell lines from *Ephestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses. *J Insect Sci.* **4**: 9.
- Maniere, G., Rondot, I., Bullesbach, E.E., Gautron, F., Vanhems, E.& Delbecque, J.P. 2004.** Control of ovarian steroidogenesis by insulin-like peptides in the blowfly (*Phormia regina*). *J. Endocrinol.* **181**: 147-156.
- Mirth, C. K. & Shingleton, A. W. 2012.** Integrating body and organ size in *Drosophila*: recent advances and out standing problems. *Front. Exp. Endocrinol.* **3**: 1-13.
- Napierska, D. & Barsiene, J. 2009.** Biomarkers responses in flounder *Platichthys flesus* from the polish coastel area of the blatic sea and application in biomonitoring. *Ecotox.* **18** (7): 846-859.
- Neubueser, D., Warren, J. T., Gilbert, L.I. & Cohen, S. M. 2005.** Molting detective in required for ecdysone biosynthesis. *Devp. Biol.* **280** (2): 362-372.

- Niwa, R., Namiki, T., Ito, K., Shimada-Niwa, Y., Kiuchi, M. & Kawaoka, S. 2010.** Nonmolting glossy/shroud encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that the function in the 'Back' of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Develop.* **137**: 1991-1999.
- Ogihara, K., Horigane, M., Nakajima, Y., Moribayashi, A. & Taylor, D. M. 2007.** Ecdysteroid hormone titer and its relationship to vitellogenesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Gen Comp Endocrinol.* **150**: 371-380.
- Okada, Y., Miyazaki, S., Miyakawa, H., Ishikawa, A., Tsuji, K. & Miura, T. 2010.** Ovarian development and insulin-signaling pathways during reproductive differentiation in the queenless ponerine ant *Diacamma sp.* *J Insect Physiol.* **56**: 288-295.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C., & Cajaraville, M.P. 2002.** Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* **58**: 75-98.
- Parthasarathy, R. & Palli, S. R. 2011.** Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol.* **41**: 294-305.
- Parthasarathy, R., Sheng, Z., Sun, Z. & Palli, S. R. 2010.** Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol.* **40**: 429-439.
- Parvy, J. P., Blais, C., Bernard, F., Warren, J. T. & Petryk, A., 2005.** A role for β FTZ-F1 in regulating ecdysteroid titers during post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **282**: 84-94

- Patti, M. E. & Kahn, C. R. 1998.** The insulin receptor - A critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* **9**: 89-109.
- Petryk, A., Warren, J. T., Marques, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., Parvy, J. P., Li, Y.C, Dauphin-Villemant, M. B. & O'Connor. 2003.** Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci .* **100**: 13773-13778.
- Postlethwait, J. H & T. Jowett. 1980.** Genetic analysis of the hormonally regulated yolk polypeptide genes in *D. melanogaster*. *Cell.* **20** (3): 671-678.
- Puig, O. & Mattila, J. 2011.** Understanding Forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**: 635-647.
- Quinn, L., Lin, J., Cranna, N., Lee, J .E .A., Mitchell, N. & Hannan, R. 2012.** Steroid Hormones in *Drosophila*: How Ecdysone Coordinates Developmental Signalling with Cell Growth and Division. *In Tech.* **8**: 141-169.
- Raikhel, A. S. & Dhadialla, T. S. 1992.** Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Ann. Rev. Entomol.* **37**: 217-251.
- Rao, V. V., Chaitanya, R. K. & Dutta-Gupta, A. 2016.** 20-hydroxyecdysone mediates fat body arylphorin regulation during development of rice moth, *Corcyra cephalonica*. *Gene.* **575**: 747-754
- Rauschenbach, I. Y., Karpova, E. K., Adonyeva, N. V., Andreenkova, O. V., Faddeeva, N. V., Burdina, E. V., Alekseev, A. A., Menshanov, P. N. & Gruntenko, N. E. 2014.** Disruption of insulin signalling affects the neuroendocrine stress reaction in *Drosophila* females. *J Exp Biol.* **217**: 3733-3741
- Reinking, J., Lam, M. M., Pardee, K., Sampson, H. M. & Liu, S., et al. 2005.** The *Drosophila* nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive. *Cell.* **122**:195-207

- Rewitz, K. F., Yamanaka, N. & O'Connor, M. B. 2013.** Developmental Checkpoints and Feedback Circuits Time insect Maturation. *Curr Top Dev Biol.* **103:** 1-33.
- Rharrabe, K., Bouayad, N. & Sayah, F. 2009.** Effects of ingested 20 hydroxyecdysone on development and midgut epithelial cells of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Pest Biochem Physiol.* **93:** 112-119.
- Riehle, M. A. & Brown, M. R. 1999.** Insulin stimulates ecdysteroid production through a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* **29:** 855-860.
- Roma, G. C., Bueno, O. C. & Camargo-Mathias, M. I. 2010.** Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review Gillott, C., 1995. *Entomology.* Plenum Press, New York. **41:** 395-401
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M. & Girard, J.P. 2000.** Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* **48:** 185-194.
- Roy, S. G., Hansen, I. A. & Raikhel, A. S. 2007.** Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* **37:** 1317-1326.
- Rulifson ,E. J., Kim, S. K. & Nusse, R. 2002.** Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Sciences.* **296:** 1118-1120.
- Rusten, T. E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A. & Stenmark, H. 2004.** Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev. Cell.* **7:** 179-192.
- Ruvinsky. I. & Meyuhas, O. 2006.** Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci.* **31:** 342-48.

- Salem, H., Smagghe, G. & Degheele, D. 1997.** Effects of tebufenozide on oocyte growth in *Plidia interpunctella*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **62** (1): 9-13.
- Seixas, A., Friesen, K. J. & Kaufman, W. R. 2008.** Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *J. Insect Physiol.* **54**: 1175-1183
- Shahbazian, D., Roux, P. P., Mieulet, V., Cohen, M. S. & Raught, B., et al. 2006.** The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.* **25**: 2781-91
- Shibko, S. P., Koivistoinen, C., Tratynek, A., Newhall & L., Friedman. 1966.** A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellulae fraction. *Anal Biochem.* **19**: 415 - 528.
- Soltani, N. 1990.** Action du duflubenzuron et de la 20-hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hémolymphatiques chez les nymphes de *Tenebrio molitor*. *Ann Soc Entomol Fr.* **26** : 575-584.
- Soltani, N., Pitoizet, N., Soltani-Mazouni, N., Delachambre, J. & Delbeque, J.P. 1997.** Activity of an anti ecdysteroid compound (KK42) on ovarian development and ecdysteroid secretion in Mealworm. *Med. Fac. Landbouww.* **62** (2): 531-537.
- Soltani-Mazouni, N., Hami, M. & Gramdi, H. 2012.** Sublethal effects of methoxy - fenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia Kuehniella* Zeller. *J Invertebr Repr Dev.* **56**: 157-163.
- Song, Q. & Gilbert, L. I. 1994.** S6 phosphorylation results from prothoracicotropic hormone stimulation of insect prothoracic glands: a role for S6 kinase. *Dev. Genet.* **15**:332-338
- Song, Q. & Gilbert, L. I. 1995.** Multiple phosphorylation of ribosomal protein S6 and specific protein synthesis are required for prothoracicotropic hormone-stimulated

- ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol Biol.* **25**: 591-602.
- Sonobe, H. & Yamada, R. 2004.** Ecdysteroids during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: metabolism and functions. *Zoolog Sci.* **21** (5): 503-16
- Spindler, K.P. & Spindler, B. M. 1991.** Ecdysteroid production and metabolism by an epithelial cell line from *Chironomus tentanus*. *Naturwissenschaften.* **78** (2): 78-79.
- Sun, X., Baret, B. A. & Biddinger, D. J. 2000.** Fecundity and fertility reductions in adult leafrollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonist tebufenozide and methoxyfenoside. *Entomol. Exp. Appl.* **94**: 75-83.
- Suren-Castillo, S., Abrisqueta, M. & Maestro, J. L. 2012.** FoxO inhibits juvenile hormone biosynthesis and vitellogenin production in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol.* **42**: 491-498.
- Swevers, I. & Latrou, K. 1999.** The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid- induced regulatory cascade and arrests silkworm oogenesis at mid vitellogenesis. *Insect Biochem Mol Biol.* **29**: 955-963.
- Tatar, M., Bartke, A. & Antebi, A. 2003.** The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Sciences.* **299**: 1346-1351.
- Telfer, W. H. 2009.** Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect Sci.* **9**: 50.
- Tettweiler, G., Miron, M., Jenkins, M., Sonenberg, N. & Lasko, P. F. 2005.** Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP. *Genes Dev.* **19**: 1840-1843.
- Tian, L., Guo, E., Wang, S., Liu, S., Jiang, R. J., Cao, Y., Ling, E. & Li, S. 2010.** Developmental Regulation of Glycolysis by 20- hydroxyecdysone and Juvenile Hormone in Fat Body Tissues of the Silkworm, *Bombyx mori*. *J Mol Cel Biol.* **2**: 255-263.

- Ting, X. 2013.** Control of germline stem cell self-renewal and differentiation in the *Drosophila* ovary: concerted actions of niche signals and intrinsic factors. *Dev. Biol.* **2**: 261-273.
- Tu, M. P., Yin, C.M. & Tahar, M. 2002.** Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants. *Aging. Cell.*, **1**: 158-160.
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulent, N. P. E. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Review. Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13**:57-149.
- Van Handel, E. 1965.** Microseparation of glycogen, sugars and lipids. *Anal Biochem.***11**: 266-271.
- Van Hensden, H. C. & Law, J. H. 1989.** An insect transport particule promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J. Biochem.* **246**: 17287-17292.
- Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K. & Socha. R. 2011.** Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *Gen Comp Endocrinol.* **172**: 77-84.
- Wang, C.X. & Zhao, A. H. 2016.** Leptin receptor overlapping transcript (LepROT) gene participates in insulin pathway through FoxO. *Gene.* In Press
- Wang, S., Liu, S., Liu, H., Wang, J., Zhou, S., Jiang, R., Bendena, W. G. & Li, S. 2010.** 20-hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation. *J Mol Cell Biol.* **2**:128-138.
- White, M. F. 1998.** The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem.* **182**: 3-11.
- William, J. C. K. 1971.** Follicle cell protein synthesis in moth, *Ephestia kuehniella* oocytes. *Insect Physiol.* **17**: 217-232.

- Wu, Q. & Brown, M. R. 2006.** Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **51**: 1-24.
- Yamanaka, N., Rewitz, K. F. & O'Connor, M. B. 2013.** Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from *Drosophila* Research. *Annu. Rev. Entomol.* **58** :497-516.
- Yao, T. P., Seagraves, W. Q., Oro, A. E. & Evans, R. 1992.** *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell.* **71**: 36- 72.
- Yenush, L., Fernandez, R., Myers, M. G., Grammer, T. C., Sun, X. J. & Blenis, J. 1996.** The *Drosophila* insulin receptor activates multiple signaling pathways but requires insulin receptor substrate proteins for DNA synthesis. *Mol Cell Biol.* **16**: 2509-2517.
- Yezli-Touiker, S. & Soltani-Mazouni, N. 2011.** Profil des ecdysteroïdes durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae). *Synthèse.* **22**: 49-55.
- Yoshiyama-Yanagawa, T., Enya, S., Shimada-Niwa, Y., Yaguchi, S., Haramoto, Y., Matsuya, T. 2011.** The conserved Rieske oxygenase DAF-36/Neverland is a novel cholesterol-metabolizing enzyme. *J Biol Chem.* **286**: 25756-25762.
- Zhou, G. & Miesfeld, R. L. 2009.** Energy metabolism during diapause in *Culex pipiens* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* **55**: 40-46.
- Zimowska, G., Silhacek, D. L., Schaaya, E & Shirk, P. 1991.** Immuno-fluorescent analysis of follicular growth and development in whole ovaries of the Indian meal moth. *J Morphol.* **209**: 215-228.

**ANNEXE
PRODUCTION
SCIENTIFIQUE**

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publication :

H. Delhoum, N. Aribi, S. Kilani-Morakchi and N. Soltani. Effects of 20-hydroxyecdysone and insulin application on reproduction in *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Anim. Plant Sci.* 26(3):2016, page : 823-832.

Communications

Internationales

Delhoum H., Kilani-Morakchi S. & Aribi N., 2012. Interaction de la 20-hydroxyecdysone et de l'insuline sur la production de vitellogenines chez *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). 3^{ème} Journées Scientifiques de l'ATT, Tabarka, Tunisie 03-05 Février 2012.

Delhoum H., Kilani-Morakchi S. & Aribi N., 2014. Effets de la 20-hydroxyecdysone chez *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae) : Impact sur le métabolisme énergétique. II^{ème} Congrès de L'Association Tunisienne de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, Tabarka, Tunisie, 18-20 Mars 2014

Delhoum H., Kilani-Morakchi S. & Aribi N., 2015. Effets de l'insuline humaine sur les principaux métabolites dans le corps gras chez un insecte *Ephestia kuehniella* Zeller. (Lepidoptera-Pyralidae). 26^{ème} Forum des Sciences Biologiques et de Biotechnologie de l'ATSB. Monastir, Tunisie, 23 - 26 mars 2015.

Nationales

Delhoum H., Kilani-Morakchi S. & Aribi N., 2014. Effets de la 20 hydroxyecdysone chez *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae) : Impact sur le stress oxydatif. 1^{er} Congrès International de Biotoxicologie et Bioactivités Oran, Algérie, 26-27 novembre 2014.

