

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



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



Année 2013 - 2014

**THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT
Option: BIOLOGIE ANIMALE**

**Effet d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine le
captopril, sur le développement et la reproduction d'un
ravageur des denrées stockées, *Ephestia kuehniella*
(Lépidoptère, Pyralidae): Etude biochimique et
endocrinologique**

Présentée par M^{me} Samira YEZLI-TOUIKER

Directeur de thèse

M^{me} Nadia SOLTANI-MAZOUNI Professeur

Devant un jury composé de :

| | |
|------------------------------------|---|
| Président : Pr. N. SOLTANI | Université Badji-Mokhtar. Annaba |
| Examineur : Pr. L. BENFKIH | Université Blida |
| Examineur : Pr. O. DAAS | Université Badji-Mokhtar. Annaba |
| Examineur : MCA. F. DJEBAR | Université de Tébessa |
| Examineur : MCA. A. TADJINE | Université d'El-Tarf |

REMERCIEMENTS

J'exprimer tous mes remerciements à monsieur Nourreddine Soltani, Professeur (Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université Badji-Mokhtar, Annaba) pour son accueil dans son laboratoire, sa disponibilité, m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Ma gratitude et ma reconnaissance s'adresse à Mme Nadia Soltani-Mazouni ma Directrice de thèse Mme (Professeur au Département de Biologie, Université Badji-Mokhtar, Annaba) pour avoir accepté de diriger mes recherches. Je ne serai la remercier pour sa patience, sa disponibilité permanente et pour les conseils avisés qui n'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie infiniment Madame Leila Benfkih Professeur (Université de Blida), pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes plus vifs remerciements et toute ma considération à Madame Ouieded Daas-Maamcha (professeur au Département de Biologie, Université Badji-Mokhtar, Annaba) qui à bien voulu accepter d'être membre de ce même jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Madame Fouzia Tine-Djebar Maître de conférences (Université de Tébessa) pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail et de siéger à ce jury.

Toute ma considération à l'égard de Madame Aicha Tadgine Maître de conférences (Université El-Tarf) qui ma fait l'honneur de juger le présent travail.

Mille mercis à mon mari, pour m'avoir soutenu, aidé et encouragé pendant toute cette longue période de travail. A mes deux enfants Mina et Mohamed.

Ma reconnaissance va à toute ma famille et particulièrement à ma sœur Hacina en témoignage de leurs affections.

Enfin, à toute l'équipe de Biologie Animale Appliquée, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

SOMMAIRE

Page

| | |
|--|----------|
| 1. INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| 2. MATERIEL ET METHODE..... | 7 |
| 2.1. Présentation du matériel biologique et élevage..... | 7 |
| 2.1.1. Présentation de l'insecte..... | 7 |
| 2.1.2. Cycle biologique..... | 7 |
| 2.2. Présentation et application du traitement..... | 9 |
| 2.3. Etude morphométrique..... | 10 |
| 2.4. Microscopie électronique à transmission..... | 10 |
| 2.5. Potentiel reproducteur..... | 12 |
| 2.6. Extraction et dosage des métabolites..... | 12 |
| 2.7. Extraction et dosage des acides nucléiques..... | 16 |
| 2.8. Technique électrophorétique..... | 17 |
| 2.9. Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes..... | 22 |
| 2.10. Analyse statistique des données..... | 25 |

CHAPITRE 1 : Impact sur le développement

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCTION..... | 26 |
| 2. RESULTATS..... | 29 |
| 2.1. Effet du captopril sur le profil des ecdystéroïdes..... | 29 |
| 2.2. Effet du captopril sur le taux des acides nucléiques..... | 34 |
| 2.2.1. Effet du captopril sur le taux d'ADN..... | 35 |
| 2.2.2. Effet du captopril sur le taux d'ARN | 36 |
| 2.3. Effet du captopril sur le profil électrophorétique des protéines du tégument..... | 37 |
| 2.2. Effet du captopril sur la sécrétion cuticulaire durant la métamorphose..... | 40 |
| 3. DISCUSSION..... | 43 |
| 3.1. Effet du captopril sur le profil des ecdystéroïdes..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Effet sur le taux des acides nucléiques tégumentaires..... | 44 |
| 3.3. Effet sur le profil électrophorétique des protéines tégumentaires..... | 45 |
| 3.4. Effet sur la sécrétion cuticulaire..... | 47 |

CHAPITRE 2 : Impact sur la reproduction.....49

1. INTRODUCTION.....49

2. RESULTATS.....52

2.1. Effet du captopril sur la morphométrie de l’ovaire.....52

2.2. Effet du captopril sur l’épaisseur du chorion.....55

2.3. Effet du captopril sur les taux des ecdystéroïdes ovariens.....58

2.4. Effet du captopril sur la composition biochimique des ovaires.....60

2.4.1. Effet du captopril sur le taux des acides nucléiques ovariens.....60

2.4.1.1. Effet du captopril sur le taux d’ADN.....60

2.4.1.2. Effet du captopril sur le taux d’ARN.....62

2.4.2. Effet du captopril sur le taux des protéines ovariennes.....63

2.4.3. Effet du captopril sur la qualité des protéines ovariennes.....65

2.4.4. Effet du captopril sur le taux des glucides ovariens.....68

2.4.5. Effet du captopril sur le taux des lipides ovariens.....71

2.5. Effet du captopril sur le potentiel reproducteur73

3. DISCUSSION.....76

3.1. Effet sur la morphométrie des ovaires.....76

3. 2. Effet sur le chorion.....77

3. 3. Effet sur le taux des ecdystéroïdes ovariens.....79

| | |
|--|-----------|
| 3.4. Effet sur la composition biochimique des ovaires..... | 80 |
| 3.5. Effet du captopril sur le potentiel reproducteur..... | 84 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 86 |
| RESUMES..... | 89 |
| Français..... | 89 |
| Anglais..... | 91 |
| Arabe..... | 92 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 93 |
| ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE (publication et communication) | |

Sommaire des figures

| Figure | Titre | Page |
|---------------|---|-------------|
| 1 | Cycle de développement d' <i>Ephestia kuehniell.</i> | 8 |
| 2 | Structure du Captopril (Fernandez M. <i>et al.</i> , 2001). | 9 |
| 3 | Extraction (shibko <i>et al.</i> , 1966) et dosage des métabolites (glucides, lipides, protéines). | 14 |
| 4 | Principales étapes d'extraction des acides nucléiques : ADN, ARN selon Shibko <i>et al.</i> , 1966. | 18 |
| 5 | Principe du dosage EIA (d'après Porcheron <i>et al.</i> , 1989). | 24 |
| 6 | Contrôle de la métamorphose et la synthèse des hormones de développement chez les insectes (Delorme, 1989, <i>in</i> Cassier <i>et al.</i> , 1997). | 28 |
| 7 | Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20 hydroxyecdysone (20E). | 29 |
| 8 | Effet <i>in vivo</i> du Captopril (10µg/2µl d'acétone), sur le poids frais (mg) des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=10, ** : p<0,01, *** : p<0,001). | 31 |
| 9 | Effet <i>in vivo</i> du captopril, sur le taux des ecdystéroïdes (pg équivalent 20E/mg de tissu) chez les chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=6, *: p<0,05, **: p<0,01, *** : p<0,001). | 32 |
| 10 | Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ADN. | 33 |
| 11 | Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ARN. | 34 |

| Figure | Titre | Page |
|--------|---|------|
| 12 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux d'ADN (µg /mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n=6). | 35 |
| 13 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux d'ARN (µg /mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n=6). | 36 |
| 14 | Séparation électrophorétique des protéines cuticulaires: courbe de référence exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du logarithme décimal du poids moléculaire (kDa) des protéines standards (a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : ovalbumine, 50kDa, d : anhydrase carbonique, 37kDa). | 38 |
| 15 | Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines cuticulaires chez les chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose, comparée à celle des protéines marqueurs (St) (a : myosine b : phosphorylase; c : ovalbumine ; c : anhydrase cabonique). | 39 |
| 16 | Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines cuticulaires chez les chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose, comparée à celle des protéines marqueurs (St) (a : myosine b : phosphorylase; c : ovalbumine ; c : anhydrase cabonique). | 39 |
| 17 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s, n=6, *: p<0,05, **: p<0,01). | 41 |
| 18 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> (m ±s; n=6, *: p<0,05). | 42 |
| 19 | La structure (A) et les étapes de la biosynthèse de la chitine (B) (d'après Dhadialla <i>et al.</i> , 2005). | 46 |

| Figure | Titre | Page |
|--------|---|------|
| 20 | Représentation schématique des événements se produisant au niveau du tégument pendant le cycle de mue (d'après Hadley, 1986). | 48 |
| 21 | Contrôle endocrinien de la reproduction (Delorme, 1989, in Cassier <i>et al.</i> , 1997). | 51 |
| 22 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal sur le poids frais (mg) des ovaires chez <i>d'E. kuehniella</i> mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm s$, n= 6, **: $p<0,01$). | 52 |
| 23 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (µg/2ml d'insecte), administré par application topique à l'exuviation nymphal <i>d'E. kuehniella</i> sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires. ($m \pm s$, n=6, *** : $p<0,001$). | 53 |
| 24 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal <i>d'E. kuehniella</i> sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm s$, n=6, *** : $p<0,001$). | 54 |
| 25 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal <i>d'E. kuehniella</i> sur le volume de l'ovocyte basal (mm ³) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, *** : $p<0,001$). | 55 |
| 26 | Structure semi fine de l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux <i>d'E. kuehniella</i> . Témoin (A) (x489) et les séries traitées avec le captopril (B) (x366) (Ch : Chorion, Cf : Cellule folliculaire, Ov : Ovocyte). | 56 |
| 27 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal <i>d'E. kuehniella</i> sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal (µm) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, *** : $p<0,001$). | 57 |

| Figure | Titre | Page |
|--------|---|------|
| 28 | Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E). | 58 |
| 29 | Effet <i>in vivo</i> du Captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des ecdystéroïdes ovarien exprimé en pg équivalent E/ mg de tissu ovarien (µm) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6, *** : p<0,001). | 59 |
| 30 | Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ADN. | 60 |
| 31 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux d'ADN ovarien (µg/mg) mesuré l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6, * : p<0,05). | 61 |
| 33 | Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ARN. | 62 |
| 33 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux d'ARN ovarien (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6, *** : p<0,001). | 63 |
| 34 | Dosage des protéines ovariennes, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg) (BSA). | 64 |
| 36 | Effet <i>in vivo</i> du Captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6, *** : p<0,001). | 65 |
| 36 | Séparation électrophorétique des protéines ovariennes : Courbe de référence exprimant le rayon frontal (Rf) en fonction du logarithme décimal du Poids moléculaire (k Da) des protéines standards (a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : albumine bovine, 75 kDa, d : ovalbumine, 50kDa). | 67 |

| Figure | Titre | Page |
|--------|---|------|
| 37 | Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines ovariennes des femelles adultes d' <i>E. kuehniella</i> témoins et traitées avec le captopril (A), témoins (B) à l'émergence adulte (<8h). comparée à celle des protéines marqueurs (C : a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : albumine bovine, 75 kDa, d : ovalbumine, 50kDa). | 68 |
| 38 | Dosage des glucides ovariens: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité glucose standard (μg). | 69 |
| 39 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10 μg /2 μl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' sur le taux des glucides ovariennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, *** : $p<0,001$). | 70 |
| 40 | Dosage des lipides, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipides (μg). | 71 |
| 41 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10 μg /2 μl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des lipides ovariens ($\mu\text{g}/\text{mg}$) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, ** : $p<0,01$). | 72 |
| 42 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10 μg /2 μl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition. ($m \pm s$, n=6, * : $p<0,05$). | 73 |
| 43 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10 μg /2 μl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur la fécondité (nombre d'œufs/femelle) ($m \pm s$, n=6, *** : $p<0,001$). | 74 |
| 44 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10 μg /2 μl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur la viabilité des œufs (%) ($m \pm s$, n=6, *** : $p<0,001$). | 75 |

Sommaire des tableaux

| Tableau | Titre | Page |
|-----------|---|-----------|
| 1 | Dosage des glucides ovariens : Réalisation de la gamme d'étalonnage. | 15 |
| 2 | Dosage des lipides ovariens : Réalisation de la gamme d'étalonnage. | 15 |
| 3 | Dosage des protéines ovariennes: Réalisation de la gamme d'étalonnage. | 15 |
| 4 | Dosage de l'ARN : Réalisation de la gamme d'étalonnage. | 16 |
| 5 | Dosage de l'ADN : Réalisation de la gamme d'étalonnage. | 17 |
| 6 | Composition des gels (running gel, staking gel). | 20 |
| 7 | Composition du tampon de migration (running buffer). | 20 |
| 8 | Composition de sample buffer (Tampon d'échantillons). | 21 |
| 9 | Composition de la solution de la coloration. | 21 |
| 10 | Composition de la solution de rinçage. | 22 |
| 11 | Composition de la Solution de décoloration. | 22 |
| 12 | Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), expriment B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20hydroxyecdysone (20E). | 29 |
| 13 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur le poids frais (mg) des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=10). | 31 |
| 14 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux ecdystéroïdes (pg équivalent 20-E /mg de tissu) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm s$, n=6). | 32 |
| 15 | Gamme d'étalonnage des quantités d'ADN et leurs absorbances correspondantes. | 33 |
| 16 | Gamme d'étalonnage des quantités d'ARN et leurs absorbances correspondantes. | 34 |
| 17 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux d'ADN (µg /mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=6). | 35 |

| Tableau | Titre | Page |
|---------|---|------|
| 18 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux d'ARN (µg/mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=6). | 36 |
| 19 | Poids moléculaires (PM) en kDa et la mobilité relative (RF) des protéines standards. | 37 |
| 20 | Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM kDa) des différentes fractions protéiques détectés par électrophorèse dans le tégument des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> témoins et traitées au cours du temps (jours) durant la métamorphose. | 38 |
| 21 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg /2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm s$, n=6). | 41 |
| 22 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la nouvelle cuticule (adulte) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm s$, n=6). | 42 |
| 23 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le poids frais (mg) des ovaires mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm s$, n= 6). | 52 |
| 24 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires. ($m \pm s$, n=6). | 53 |
| 25 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm s$, n=6). | 54 |
| 26 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le volume (mm ³) de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm s$, n=6). | 55 |
| 27 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6). | 56 |

| Tableau | Titre | Page |
|---------|---|------|
| 28 | Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), expriment B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E). | 58 |
| 29 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des ecdystéroïdes ovarien exprimé en pg équivalent E/ mg de tissu ovarien (µm) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6). | 59 |
| 30 | Gamme d'étalonnage des quantités d'ADN et leurs absorbances correspondantes. | 60 |
| 31 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux d'ADN ovarien (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6). | 61 |
| 32 | Gamme d'étalonnage des quantités d'ARN et leurs absorbances correspondantes | 62 |
| 33 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux d'ARN ovarien (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6). | 63 |
| 34 | Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard. | 64 |
| 35 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6). | 65 |
| 36 | Poids moléculaires (PM) en kilo Da et la mobilité relative (RF) des protéines standards (a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : albumine bovine, 75 kDa, d : ovalbumine, 50kDa. | 66 |
| 37 | Effet <i>in vivo</i> du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> . Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM kDa) des différentes fractions protéiques dans les ovaires à l'émergence adulte (<8h). | 67 |

| Tableau | Titre | Page |
|---------|---|------|
| 38 | Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de glucose standard (μg). | 68 |
| 39 | Effet <i>in vivo</i> du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des glucides ovariens ($\mu\text{g}/\text{mg}$) mesuré à l'émergence adulte ($<8\text{h}$). ($m \pm s$, $n=6$). | 69 |
| 40 | Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipides. | 70 |
| 41 | Effet <i>in vivo</i> du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des lipides ovariens ($\mu\text{g}/\text{mg}$) mesuré à l'émergence adulte ($<8\text{h}$). ($m \pm s$, $n=6$). | 71 |
| 42 | Effet <i>in vivo</i> du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'émergence des chrysalides femelles d' <i>E. Kuehniella</i> sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition ($(m \pm s, n=6)$). | 72 |
| 43 | Effet <i>in vivo</i> du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'émergence des chrysalides femelles d' <i>E. Kuehniella</i> sur la fécondité des femelles (nombre d'œufs) ($m \pm s$, $n=6$). | 73 |
| 44 | Effet <i>in vivo</i> du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'émergence des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> sur la viabilité des œufs (%) ($m \pm s$, $n=6$). | 74 |

Introduction

I. INTRODUCTION GENERALE

Le grand nombre de gènes qui codent des protéases chez les animaux reflète l'importance de la protéolyse dans la physiologie et le développement des animaux (Puente *et al.*, 2003). La diversité fonctionnelle des protéases peut être attribuée à la variété des mécanismes et des structures catalytiques des protéines, dont certaines sont d'une conception modulaire, offrant différents niveaux de complexité structurale et fonctionnelle (Puente *et al.*, 2003). La base de données des protéases MEROPS (Rawlings *et al.*, 2002, 2012) énumère 551, 553, 563, 366, et 367 protéases pour l'être humain, la souris, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* et *Caenorhabditis elegans*, respectivement. La majorité de ces enzymes n'ont pas été étudiées ni au niveau physiologique ni au niveau biochimique, mais il a été possible de classer la plupart d'entre elles dans des familles en se basant sur des similitudes statistiquement significatives concernant la structure primaire de protéine (Rawlings *et al.*, 2002). L'enzyme de conversion de l'angiotensine est l'une de ces enzymes.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une métallopeptidase de zinc ancrée à la surface des cellules, fonctionnant principalement comme un dipeptidyl carboxy peptide (Marcous *et al.*, 2004). Chez les mammifères, l'ECA est impliquée dans la régulation homéostatique de la pression artérielle, l'équilibre électrolytique et il est fortement lié à un certain nombre de maladies cardio-vasculaires et rénales (Bernstein *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2008b). Par ailleurs, il est bien connu que cette enzyme joue un rôle clé dans le système rénine-angiotensine par la conversion de l'angiotensine I (AI) en angiotensine II (AII), un puissant vasoconstricteur, et dans l'inactivation métabolique de la bradykinine (BK) un peptide vasodilatateur (Corvol *et al.*, 2004).

Chez les vertébrés les ECA existent sous deux isoformes l'ECA somatique (sECA) avec un poids moléculaire de 140 à 180 kDa et deux domaines homologues (N et C- terminal), et l'ECA testiculaire (tACE) qui a un poids moléculaire de 90 à 110 kDa (Corvol *et al.*, 1995).

Chez la majorité des insectes, l'ECA existe sous deux à trois isoformes (Leimir *et al.*, 2007) et ces dipeptidases dipeptidyle ont des propriétés enzymatiques très semblables au ECA des mammifères (Lamango & Isaac, 1994 ; Wigffels *et al.*, 1996; Schoofs *et al.*, 1998).

Plus récemment, des extraits cellulaires d'insectes ont été isolés et leur activité inhibitrice de l'hypertension a été mise en évidence *in vivo* sans digestion supplémentaire (Staljanssens *et al.*, 2011). Chez *Drosophila melanogaster*, la structure cristalline d'un homologue de l'ECA en complexe avec un produit naturel phosphonotripeptide K-26 (Akif *et al.*, 2010) ou avec les nouveaux médicaments inhibiteurs de l'hypertension artérielle (Akif *et al.*, 2011) ont été présentés. De plus, il a été rapporté que la perte de la peptidase de l'ECA perturbe la durée du sommeil nocturne chez *D. melanogaster* (Carhan *et al.*, 2011). L'inhibition de l'activité ACE peut interférer avec le système endocrinien et perturber la croissance, le développement et la reproduction (Isaac *et al.*, 2007). Le rôle physiologique de ces enzymes n'est pas entièrement déterminé.

De nouveaux composés ont été introduits dans le but d'approfondir le mécanisme d'action au niveau cellulaire. Ces composés sont des médicament connus tels que le captopril (D-3 mercapto-2-methyl-propionyl-L-proline), un puissant et spécifique inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle chez les mammifères ; ce dernier montre le même pouvoir inhibiteur de l'ECA (William *et al.*, 1996). Plusieurs inhibiteurs de l' ECA ont été testés chez les insectes. Leimir *et al.* (2008) ont rapporté que le captopril et l'énalapril appliqués par injection à des larves de *Spodoptera littoralis* stoppent leur alimentation et diminuent leur poids. Chez *Manduca sexta*, l'injection du captopril provoque un ralentissement du rythme de croissance des larves (Isaac *et al.*, 2007). Le captopril augmente à la fois la quantité de trypsine et le taux de vitellogénine chez *Neobellieria bullata* (Vandingenen *et al.*, 2001), alors que chez *Spodoptera littoralis*, il régule négativement la ponte par deux chemins indépendants, l'un par la régulation de la biosynthèse des ecdystéroïdes, et l'autre par son effet sur l'activité de la trypsine (Vercruysse *et al.*, 2004). Chez *Tenebrio molitor*, il a été démontré que ce composé affecte la morphométrie de l'ovaire et aucun effet significatif n'a été observé sur l'épaisseur et la structure fine du chorion (Soltani-Mazouni *et al.*, 2007) ; cependant, il augmente le contenu des ecdystéroïdes dans le corps entier des chrysalides d'*Ephestia kuehniella* (Amrani- Kirane & Soltani-Mazouni, 2012).

Chez les insectes la présence d'un exosquelette, formé de chitine et de protéines, implique un mode de croissance post-embryonnaire discontinu, ponctué par des mues. Les Lépidoptères sont des insectes évolués à métamorphose complète ou Holométaboles, présentent successivement trois phénotypes différents : larve, nymphe et adulte (Smiths, 1985 ; Lafont *et al.*, 2005). La mue est un processus complexe qui implique des changements hormonaux et comportementaux ainsi que des changements aux niveaux de l'épiderme et de la cuticule (Gullan & Cranston, 2000). Le cycle cuticulaire débute par l'apolyse de l'ancienne cuticule, qui sera digérée partiellement par les enzymes protéolytiques et chitinolytiques du liquide de mue. Après la synthèse de l'épicuticule et des assises pré-exuviales, la synthèse se poursuit par le dépôt des assises post- exuviales (Hadeley, 1986). La métamorphose des Lépidoptères implique un stade nymphal, pendant lequel les structures adultes sont élaborées à partir des structures larvaires. A la fin de la période nymphale se produit l'émergence des adultes capables de se reproduire (Evans, 1984 ; Gullan & Cranston, 2005). Les changements morphologiques, physiologiques et comportementaux de l'organisme durant la métamorphose des insectes résultent de la régulation de l'expression des gènes par l'hormone de mue (20E), en l'absence ou en présence de l'hormone juvénile JH (Riddiford, 1996 ; Gilbert *et al.*, 2002 ; Lafont *et al.*, 2005).

Les ecdystéroïdes sont des stéroïdes polyhydroxylés, leur biosynthèse est assurée par les glandes prothoraciques au cours des stades post-embryonnaires sous l'effet d'une neurohormone prothoracicotrope (PTTH) ou ecdysiotrope (Rees, 1985, Gäde, 1997, Gäde & Hoffman, 2005, Niwa *et al.*, 2010 ; Rewitz *et al.*, 2013); cette neurohomone est sécrétée par les cellules neurosécrétrices cérébrales en réponse à des facteurs neuraux, hormonaux ou environnementaux (Neubueser *et al.*, 2005), qui sont ensuite stockés dans le complexe corps cardiaques-corps allates (CC-CA), (Marchal *et al.*, 2010).

L'ecdysone, libérée dans l'hémolymph, est rapidement convertie en une hormone active la 20 hydroxyecdysone (20E), dans les organes périphériques tels que le corps gras, le tube digestif ou les tubes de malpighie (Gilbert *et al.*, 1997, 2002 ; Rybezynski, 2005 ; Huang *et al.*, 2008 ;Yoshiyama-Yamagawa *et al.*, 2011), par l'enzyme ecdysone- 20-monooxygénase (Smith, 1985 ; Gilbert *et al.*, 2002 ; Rewitz *et al.*, 2006 a et b ; Gilbert & Rewitz ., 2009). La 20E joue un rôle essentiel dans la vittellogénèse, l'expression des gènes de la vitellogénèse dans le corps gras (Gilbert *et al.*, 2002 ; Yamanaka *et al.*, 2013), la réinitiation méiotique et

l'activation de la choriogénèse (Li *et al.*, 2000). Elle contrôle également l'embryogénèse et le développement post-embryonnaire (Mirth *et al.*, 2012).

L'hormone juvénile (HJ) est un sesquiterpène synthétisé par les corps allates (glandes subsphériques situées dans la tête en arrière du cerveau) (Riddiford 1994 ; Yin, 1994 ; Ho *et al.*, 1995 ; Kou & Tu 1998, Kou & Chen 2000), dont la sécrétion est contrôlée par des neuropeptides, activateurs, allatotropines ou inhibiteurs, allatostatines (Bellés & Maestro, 2005) et des neurotransmetteurs tel que la dopamine (Granger *et al.*, 2000) et l'octopamine (Schulz *et al.*, 2002). L'HJ est libérée dans l'hémolymphe puis transportée vers les tissus grâce à des protéines vectrices spécifiques appelées (juvenile hormone binding proteins) qui les protègent contre les JH-estérases (Goodman & Chang 1985; Kort & Granger, 1996). L'HJ est une hormone qui contrôle la métamorphose chez les insectes par le maintien des caractères juvéniles et la programmation des mues larvaires (Cassier *et al.*, 1997). Par ailleurs, elle a aussi un rôle très important chez l'insecte adulte, où elle régule la reproduction, en particulier, la vitellogénèse (Riddiford, 2011). Chez la plupart des espèces d'insectes, cette hormone induit la synthèse de la vitellogénine dans le corps gras de l'insecte et leur incorporation dans les ovocytes en perméabilisant le follicule ovarien à leur passage (Cassier *et al.*, 1997). Ces vitellogénines sont sécrétées dans l'hémolymphe puis absorbées par l'ovaire, et stockées dans les œufs pour constituer le vitellus chez les femelles (Gilbert *et al.*, 2000). L'hormone juvénile joue également un rôle dans l'activité des glandes annexes et des glandes à phéromones (Cassier *et al.*, 1997 ; Riddiford *et al.*, 2010).

Bien que le système nerveux de l'insecte soit à l'origine de l'orchestration des activités reproductives, le système endocrinien n'en joue pas moins un rôle clé. En effet, de nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré l'implication de l'hormone juvénile, de l'ecdysone (les deux hormones régissant la croissance et la métamorphose chez les insectes), ainsi que certaines neurohormones dans le contrôle de la physiologie reproductive (Barth & Lester, 1973; Koeppe *et al.*, 1985; Hagedorn, 1985; Raina & Klun, 1984).

Le potentiel reproducteur des insectes reste un des facteurs les plus importants de leur indéniable pullulation. L'étude de la reproduction est donc nécessaire pour toute approche raisonnée visant une diminution sensible des dégâts causés par les prédateurs (Soltani-Mazouni & Soltani, 1995). Selon Berry (1985), le contrôle de la capacité reproductrice des

insectes est un élément fondamental auquel le physiologiste peut apporter une contribution significative. Ainsi, de nombreuses études tant histochimiques qu'ultrastructurales (Gerber, 1967; Laverdure, 1972; Soltani, 1987 ; Soltani-Mazouni & Soltani, 1994, 1995 ; Soltani *et al.*, 1996 ; Soltani *et al.*, 1998 ; Khebbab *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012 ; Bensalem & Soltani-Mazouni. 2013).

Toutes ces connaissances acquises en physiologie des arthropodes et des insectes (Smith 1985 ; Cassier 1997) ont permis de développer ces dernières années des composés alternatifs, non polluants et plus sélectifs qui perturbent des éléments vitaux dans le développement des organismes non visés (Altstein *et al.*, 1993; Dhadialla *et al.*, 2005), les régulateurs de croissance des insectes (IGR_s) terme donné à un groupe de composés qui interfère avec la croissance et le développement des insectes (Staal, 1982) . Ils perturbent l'activité normale du système endocrinien, affectant ainsi, la reproduction et la métamorphose des insectes cibles (Dhadialla *et al.*, 1998, 2005). Par ailleurs, l'application massive et abondante des insecticides conventionnels a fait apparaître chez les insectes des modifications physiologiques et biochimiques, induisant l'apparition des souches de plus en plus résistantes (Devonshire, 1989; Cochran, 1991; Siegfried & Scott, 1992 ; Anspaugh *et al.*, 1994; Scharf *et al.*, 1997, 1999; Saito & Hama, 2000, Nauen & Albert, 2003). Cette résistance est due à la réduction des taux de pénétration cuticulaire (Bull et Patterson, 1993; Pasteur & Reymont, 1996), à l'altération des sites cibles tels que l'acétylcholinestérase (Hemingway & Abesal., 1993; Habes *et al.*, 2005) et l'intervention des systèmes de détoxification (Sun *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2007).

Récemment *E. kuehniella* a fait l'objet de recherches sur les ecdystéroïdes et leur rapport avec la sécrétion de la cuticule au cours de la métamorphose (El Ouar *et al.*, 2010 ; Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011) et Telfer (2009) a contribué à la connaissance de la formation des œufs chez les lépidoptères. Les données acquises ont servi de base pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces xénobiotiques comme les IGRs et les médicaments comme les inhibiteurs de l'ECA sur le développement et la reproduction chez les insectes.

Ces nouveaux composés tels que le captopril ont été testés dans le but d'approfondir le mécanisme au niveau cellulaire. L'ECA devrait être considéré comme cible potentielle pour le développement de nouveaux régulateurs de croissance (Issac, 2007).

La présente recherche a pour but d'étudier l'inhibition de ces enzymes par l'application topique du captopril, et connaître l'effet de cette inhibition sur le développement et la

reproduction d'un modèle de laboratoire, ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*.
L'étude a été réalisée *in vivo* et comporte 2 parties :

La première partie concerne le développement ; elle comprend d'une part le profil de l'hormone de mue déterminé dans les extraits du corps entier des chrysalides femelles durant la métamorphose, la composition biochimique des cuticules périphériques et la sécrétion cuticulaire.

La deuxième partie traite la reproduction des femelles et examine plus particulièrement le taux des ecdystéroïdes ovarien, les aspects morphométriques de l'ovaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux, la biochimie de l'ovaire et le potentiel reproducteur.

Matériel et méthodes

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation du matériel biologique et élevage

2.1.1. Présentation de l'insecte

Ephestia kuehniella (Zeller), appelée communément « Pyrale de la farine » est une espèce cosmopolite dont les larves s'attaquent essentiellement à la farine, aux grains de céréales (Blé, Mais, Riz), la semoule, les flacons d'avoine, les pâtes alimentaires et aux fruits secs (raisins, figues, abricots). Elle est aussi une source allergique qui provoque l'asthme et les rhinites (Bataille *et al.*, 1995 ; Cipolla *et al.*, 1996). Sa position systématique est la suivante :

| | |
|-----------------|----------------------------|
| Règne : | Animalia |
| Embranchement : | Arthropoda |
| Classe : | Insecta |
| Sous classe : | Pterygota |
| Super ordre : | Endopterygota |
| Ordre : | Lepidoptera |
| Famille : | Pyralidae |
| Genre : | <i>Ephestia</i> |
| Espèce : | <i>kuehniella</i> (Zeller) |

2.1.2. Cycle biologique

Le cycle de développement dure 75 jours à une température de 27°C et une humidité relative de 70 %. *E. kuehniella* est un lépidoptère holométabole. De mœurs nocturnes, durant le jour, l'insecte se tient au repos contre les murs ou caché dans la farine (Balachowsky, 1972). L'insecte adulte a une petite tête globulaire, il mesure de 20 à 25 mm d'envergure, les ailes antérieures sont grisâtres satinées, avec des points noirs, les ailes postérieures sont blanchâtres finement frangées.

Les femelles adultes pondent juste après l'accouplement qui aura lieu quelques heures après l'émergence et la fécondité est de 200-300 œufs blancs et de forme elliptique. La larve de couleur blanche virant légèrement au rosé, mesure de 1 à 1,5 mm, après six mues, elle peut atteindre 15 à 20 mm, elle s'entoure d'un cocon blanc soyeux et devient une chrysalide qui donne des adultes après 8 à 12 jours (Fig. 1).

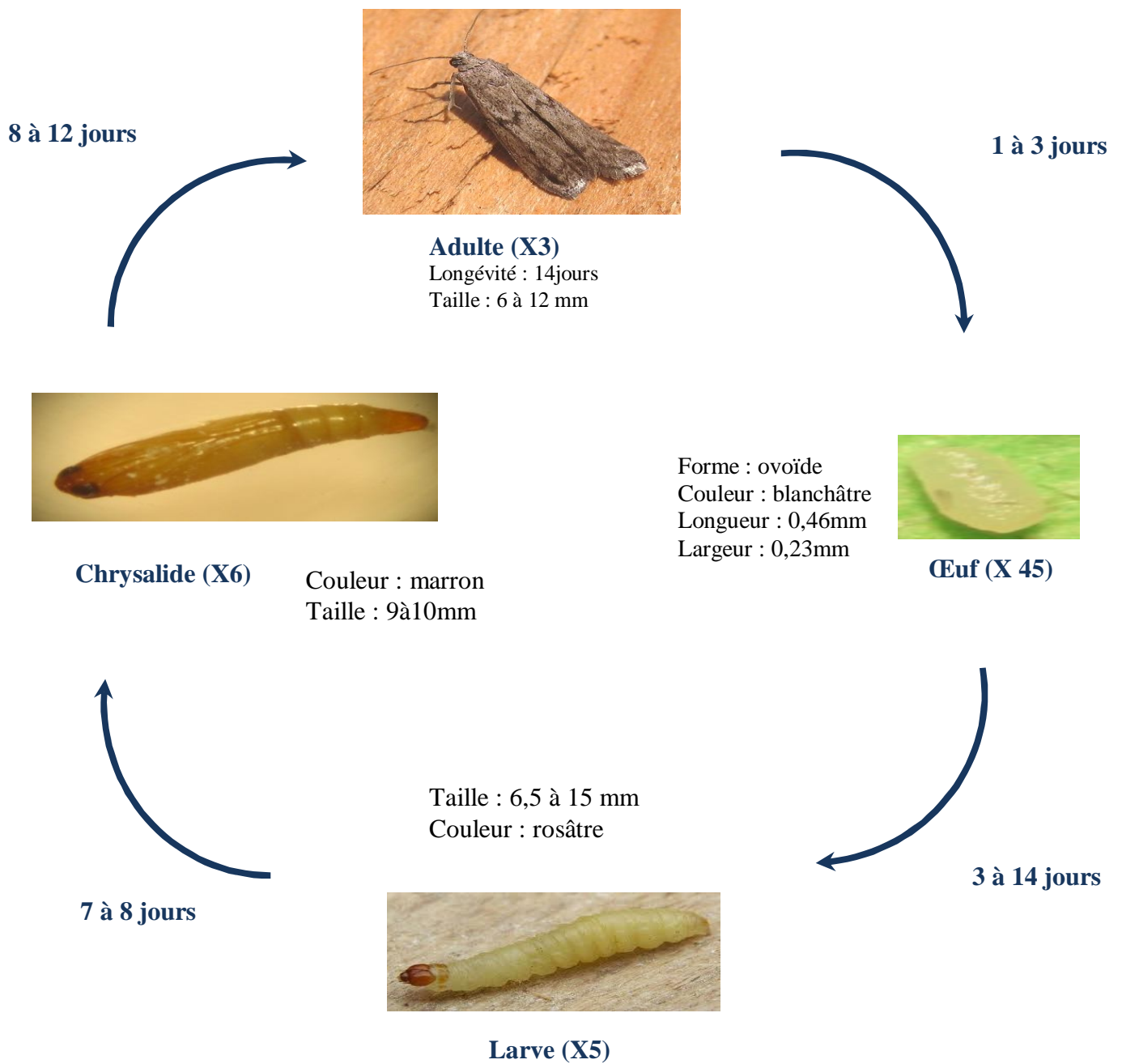


Figure 1. Cycle de développement d'*E. kuehniella*.

2. 2. Présentation et application du traitement

Le captopril (D-3-mercapto-2-méthyl-propionyl-L-proline (s.s) a un poids moléculaire de 217 g et un point de fusion de 104-108 C°. Sa formule empirique est : C₉H₁₅NO₃S et sa structure est présentée dans la figure 2. Le captopril a été utilisé *in vivo* par application topique à la dose de 10 µg/2µl d'acétone déposé sur la face ventrale de l'abdomen des chrysalides femelles nouvellement exuviées (<8 h).

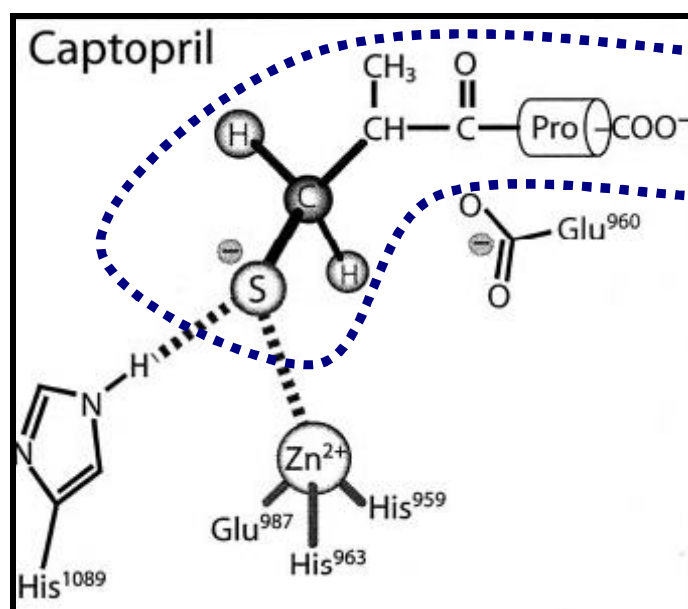


Figure 2. Structure du captopril (Fernandez M *et al.*, 2001)

2. 3. Etude morphométrique

Les ovaires sont prélevés des séries témoins et traitées avec le captopril à l'émergence des femelles dans le but de voir les différents paramètres morphométriques :

- Le nombre des ovocytes par paire d'ovaires, la longueur (L) et la largeur (l) de l'ovocyte basal, qui sont mesurées.
- Le poids frais des ovaires sera déterminé à l'aide d'une balance Sartorius Handy, avec une précision de $\pm 0,1$ mg. .
- Le volume (V) exprimé en mm^3 est obtenu grâce à la formule suivante (Lumbreas *et al.*, 1991):

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

2. 4. Technique de microscopie électronique à transmission

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

2.4.1. La fixation, le rinçage et la post fixation

Les quatre premiers sternites abdominaux prélevés des chrysalides âgées de 0, 1, 3, 5, 7 et 9 jours des séries témoins et traitées, ainsi que les ovocytes basaux sont fixés dans un mélange de para formaldéhyde (5 %), glutaraldéhyde (25 %), ces molécules ont pour rôle de former des liaisons covalentes avec les groupements aminés des protéines et relient des

molécules adjacentes (Bruce *et al.*, 1987), elles sont additionnées d'eau distillée (7 ml), de sucrose (1ml) et de tampon cacodylate 0,4 M (5ml).

La fixation se pratique par immersion des pièces dans des tubes eppendorfs bien fermés et étiquetés. Le volume du fixateur doit être 20 fois le volume des pièces. Le rinçage se fait dans un mélange cacodylate 0,4 M (10 ml), eau distillée (8 ml) et sucrose (12 ml) avec deux bains de 20 minutes chacun et un troisième jusqu'au lendemain. Si la fixation est prolongée, le rinçage sera également. La post-fixation se fait dans un mélange tétroxyde d'osmium (2,5 ml), cacodylate 0,4 M (2,5 ml), sucrose et eau distillée (2 ml), pendant une heure. Le tétroxyde d'osmium fixe et stabilise les doubles couches lipidiques et les protéines tissulaires en créant des ponts disulfures.

2.4.2. La déshydratation et l'inclusion

La déshydratation se fait dans des bains d'alcool éthylique à différents degrés croissants. Les pièces subissent ensuite des bains d'oxyde de propylène qui permet l'éclaircissement des pièces. A ce stade les échantillons sont encore mous pour être coupés, et doivent être inclus dans un milieu rigide qui est la résine dont la composition est la suivante : 60 ml de DDSA (dodecyl sulfate aldéhyde), 25 ml d'épikote et 20 ml d'araldite auxquels on ajoute le DMP30 (2, 4, 6-diméthyl-amino-méthyl-phénol) accélérateur de polymérisation. Trois bains sont réalisés à cet effet : le premier bain pendant une heure avec des quantités égales d'oxyde de propylène et de résine additionnés de 4 % d'accélérateur DMP 30, le deuxième bain se fait dans un mélange de résine et d'accélérateur à 4 % jusqu'au lendemain matin, on effectue un troisième bain réalisé avec la résine et l'accélérateur 4 % pendant une heure.

La mise en bloc des pièces se fait dans des moules appropriés en forme de pyramide. Les pièces sont orientées et les références des échantillons sont placées à la partie opposée des pyramides. Les moules sont ensuite mis dans une étuve à 37° C pendant trois heures. Les pièces déplacées sont réorientées, et les moules sont remis dans l'étuve à 60° pendant trois jours.

2.4. 3. Confection des coupes et coloration

Au moment de l'emploi, le bloc devra être taillé, mis dans le porte objet puis débité en coupe à l'aide d'un ultra microtome LKB 2088 qui utilise des couteaux en verre réalisés par un kniffe Maker LKB 7800. Les coupes semi-fines doivent avoir une épaisseur de 1 à 2 µm ; elles sont déposées sur des lames propres en verre, séchées et colorées au bleu de toluidine (bleu de toluidine à 1%et borax de sodium 1%dans l'eau distillée) pendant 3 à 5 minutes. Les coupes sont observées au microscope photonique, l'épaisseur du chorion et de la cuticule sont mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire préalablement étalonné.

2.5. Etude du potentiel reproducteur

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

- La durée de la période de pré-oviposition : déterminée par le nombre de jours séparant l'émergence et le début de la ponte.
- La durée de la période de l'oviposition correspond à la durée (en jours) de la période ponte.
- La fécondité des femelles exprime le nombre total d'œufs pondus par femelle durant toute la période d'oviposition.
- La viabilité des œufs est le nombre d'œufs éclos parmi la totalité des œufs pondus par femelle.

2.6. Extraction et dosage des constituants biochimiques

Les femelles des séries témoins et traitées sont disséquées sous une loupe binoculaire et les ovaires prélevés sont débarrassés du corps gras puis conservés dans des tubes eppendorfs contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20%. L'extraction des différents métabolites (lipides, glucides et protéines) a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1966) et les différentes étapes sont résumées dans la figure 3.

2. 6. 1. Dosage des glucides

Les glucides ovariens sont dosés selon la méthode de Duchateau & Florkin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée), qui donne un complexe vert dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des glucides présents dans l'échantillon. L'absorbance est lue à 620 nm contre un blanc de gamme. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (Tab. 1).

2. 6.2. Dosage des lipides totaux

Les lipides ont été déterminés selon la méthode Goldsworthy *et al.* (1972), utilisant la vanilline comme réactif et une solution mère des lipides (2,5 mg d'huile de tournesol (Cevital, Algérie), 99 % de triglycérides dans 1 ml de solvant éther /chloroforme V/V) comme standard (Tab. 2). Les absorbances ont été lues après 30 minutes à une longueur d'onde de 530 nm contre un blanc de gamme.

2.6.3. Dosage des protéines ovariennes

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976), qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie (G250, Sigma-Aldrich, Allemagne), comme réactif (50 mg de BBC, 25 ml d'éthanol (95%), 50 ml d'acide orthophosphorique (85%) et compléter à 500 ml avec l'eau distillée) et l'albumine de bœuf (Sigma Life Science, Allemagne) comme standard (1mg/ml) (Tab. 3). Les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme.

Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µl et les taux des différents constituants biochimiques ovariens ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références.

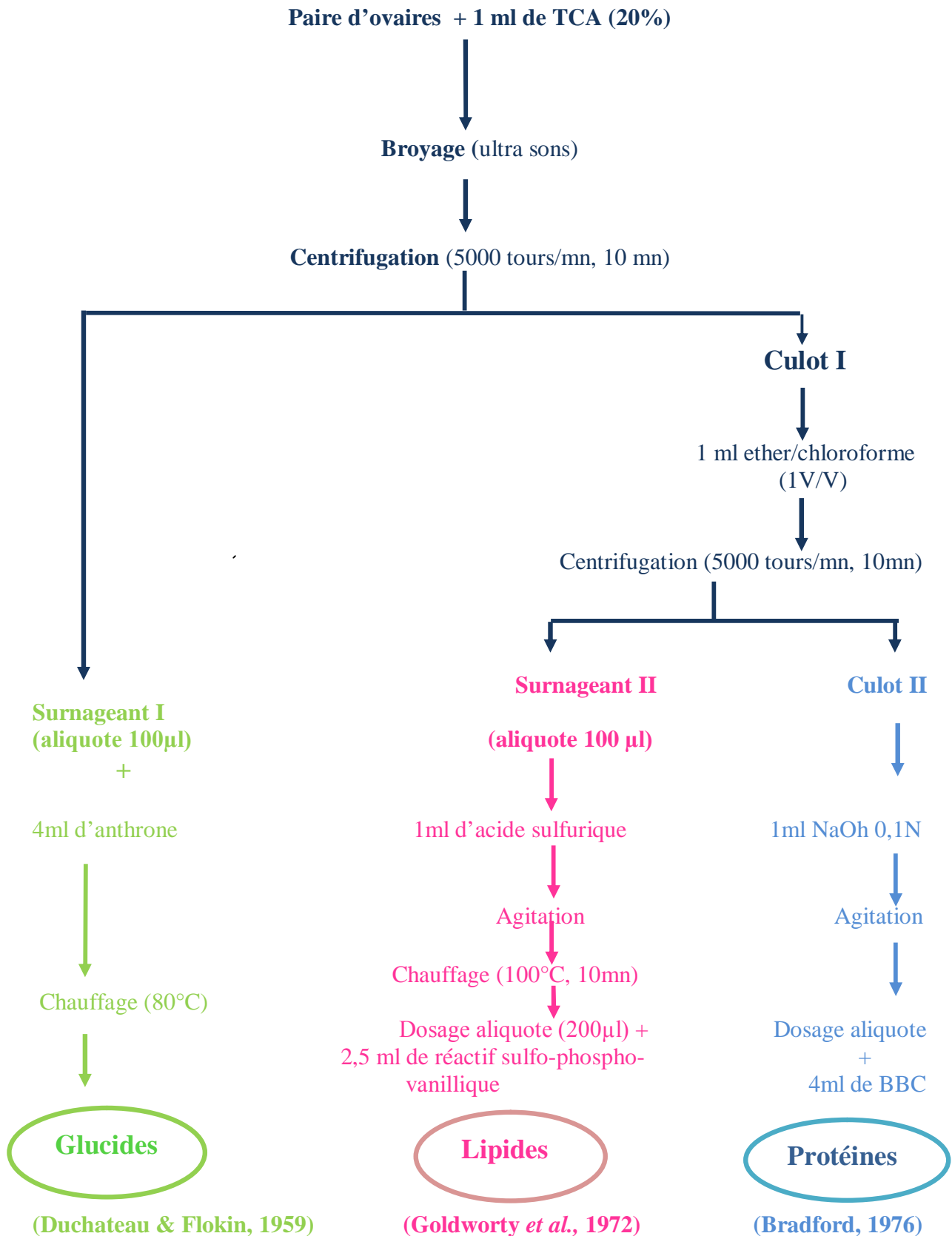


Figure 3: Méthodes d'extraction (Shibko *et al.*, 1966) et dosage des principaux constituants biochimiques (glucides, lipides, protéines).

Tableau 1 : Dosage des glucides ovariens : réalisation de la gamme d'étalonnage.

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Glucose (µg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Quantité de glucose (µg) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| Eau distillée (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Réactif Anthrone (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Tableau 2: Dosage des lipides ovariens : Réalisation de la gamme d'étalonnage.

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Solution mère de lipides (µg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Quantité de lipides (µg) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| Solvant Ether/Chloroforme (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Vanilline (ml) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

Tableau 3 : Dosage des protéines ovariennes : 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 |

2.7. Extraction et dosage des acides nucléiques

Le tégument prélevé des chrysalides au cours de la métamorphose est soigneusement nettoyé ainsi que les ovaires sont conservés dans une solution de phényle méthyle sulfonylfluoride (PMSF) à 0,1 % (45 mg de PMSF/ 1 ml d'éthanol) puis stockés au congélateur à -20°C jusqu'au jour du dosage (Fig. 4)

2.7.1. Dosage de l'ARN

Le dosage de la quantité totale des acides ribonucléiques (ARN) a été déterminé selon Burton (1956) utilisant l'orcinol comme réactif et l'ARN de levure de boulanger (Sigma, Allemagne) comme standard. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 660 nm, (Tab. 4).

Tableau 4 : Dosage de l'ARN : Réalisation de la gamme d'étalonnage.

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ARN standard (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Orcinol (ml) | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |

Le dosage de l'ARN a été effectué sur des fractions aliquotes 100 µl des extraits biologiques auxquelles sont additionnés 1,5 ml d'orcinol. Les tubes, après agitation, sont chauffés au bain marie à 90 C° pendant 10 minutes. Il se forme alors une coloration bleu clair.

2. 7. 2. Dosage de l'ADN :

Le dosage de la quantité totale des acides désoxyribonucléiques (ADN) a été fait selon la méthode de Schneider (1957) utilisant le diphenylamine comme réactif et l'ADN de thymus de veau (Sigma, Allemagne) comme standard. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 602 nm. (Tab. 5).

Tableau 5 : Dosage de l'ADN : Réalisation de la gamme d'étalonnage

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|-----|----|----|----|----|-----|
| ADN standard (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Diphénylamine (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Le dosage de l'ADN a été effectué sur des fractions aliquotes (100 µl) des extraits biologiques auxquelles est additionné 1 ml de réactif de diphénylamine.

2. 8. Technique électrophorétique

2.8.1. Extraction et dosage des protéines :

Les ovaires (pool de 12 paires) sont prélevés des femelles adultes d'*E. kuehniella* témoins et traitées *in vivo* avec le captopril 10 µg/2µl d'acétone , ainsi que le tégument (pool de 3 téguments) des chrysalides à différents âges 0, 1, 3, 5, 7 et 9 jours , les échantillons sont conservés dans une solution de PMSF à 0,1 % dans l'eau distillée.

L'extraction est effectuée à 4°C sous agitation pendant 24 heures. L'homogénat est centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Le surnageant est alors récupéré et une fraction aliquote (100 µl) est destinée à la quantification des protéines et l'autre fraction est lyophilisée et servira à l'étude électrophorétique des protéines.

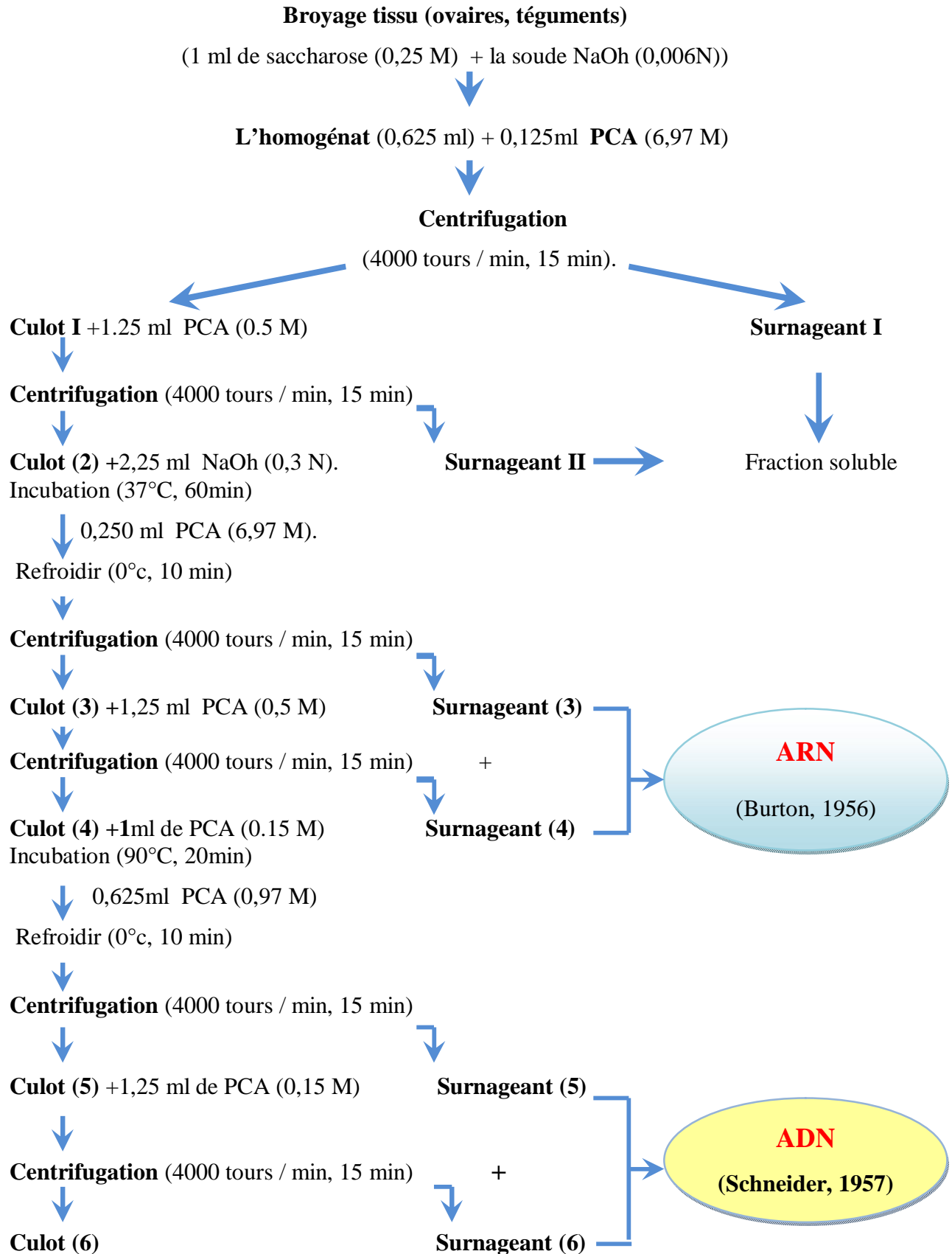


Figure 4. Principales étapes d'extraction des acides nucléiques (Shibko *et al.*, 1966).

2.8.2. Principe de l'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de séparation fondée sur le fait que les molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. La vitesse de migration dépend également du poids moléculaire, de la configuration, ainsi que des propriétés amphotères de la protéine (Lemoine, 1980; .Mauer, 1991). La séparation électrophorétique des protéines est réalisée selon la technique de Laemmli, (1970). Il s'agit d'une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide (PAGE) à 30 %. Ce gel joue le rôle d'un tamis moléculaire additionné de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 10%. Le SDS est un détergent anionique qui dénature les protéines et leur donne une charge négative ce qui donne une densité de charge équivalente par unité de longueur de polypeptide. Par conséquent, les protéines vont migrer dans le gel et la distance parcourue sera en corrélation avec leur poids moléculaire (Kaufman, 1995).

2.8.3. Montage de l'appareil

L'appareil est composé d'une mini cuve de 7 x 8 cm avec deux faces identiques comportant deux plaques d'alumine, deux plaques de verre, deux espaceurs d'une épaisseur de 1,5 mm, 4 pinces, 2 peignes, un chapeau avec électrodes et une cuve à tampon de migration.

Avant de couler le gel, on met de l'agarose à 2% préalablement chauffée au bain marie sur une plaque de verre afin de boucher le vide entre la plaque d'alumine et la plaque de verre.

Les gels sont préparés extemporanément. On coule d'abord le gel de séparation ou running gel (12,5 %) entre la plaque d'alumine et la plaque de verre et on laisse polymériser pendant 30 mn (Tab. 6).

On prépare ensuite le gel de concentration (4,5%) ou stacking gel, que l'on fait couler jusqu'aux bords des plaques. On place enfin les peignes qui serviront au moulage des dix chambres de dépôt, puis on laisse polymériser pendant 30 mn (Tab. 6).

Après polymérisation du gel de concentration, on remplit la cuve de tampon de migration ou running buffer (Tab. 7). On enlève délicatement le peigne, les puits sont prêts pour le dépôt des échantillons.

Tableau 6: Composition des gels (running gel, staking gel).

| Produits | Stacking gel | Running gel |
|-------------------------|--------------|-------------|
| Acrylamide 30% (ml) | 1,5 | 5,3 |
| Eau distillée (ml) | 5,7 | 6,8 |
| Upper buffer (ml) | 1,2 | - |
| SDS 10% (ml) | - | 0,2 |
| Sucrose 55% (ml) | - | 2,5 |
| Lower buffer (ml) | - | 5,0 |
| Amonium persulfate (ml) | 0,3 | 0,2 |

Tableau 7 : Composition du tampon de migration (running buffer)

| Produits | Running buffer |
|--------------|----------------|
| Tris bas (g) | 6,00 |
| Glycine (g) | 28,80 |
| SDS (g) | 1,00 |
| H2O (ml) | 1000 |

2.8.4. Dépôt des échantillons et migration

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans une solution tampon (Tab. 8). La détermination du volume de l'échantillon a été obtenue à partir du dosage des protéiques dans les échantillons. Au niveau de chaque chambre de dépôt, on introduit 10 à 15 μ l d'échantillon biologique à l'aide d'une micro seringue.

L'appareil est branché à un générateur (50 volts pendant 30min; puis à 100 volts pendant deux heures). Une fois la migration finie, on procède à la coloration.

Tableau 8 : Composition du tampon d'échantillons.

| Produits | Sample buffer |
|-----------------------------------|---------------|
| Upper gel buffe (ml) | 6,25 |
| Mercaptoethanol (ml) | 2,50 |
| SDS 10 % (ml) | 7,14 |
| Bleu de bromophénol à 0,05 % (ml) | 5,00 |
| Glycérol (ml) | 5,00 |
| EDTA (mg) | 18,60 |

2.8.5. Coloration

A la fin de la migration, les gels sont placés dans la solution de coloration (Tab. 9) pendant 24 heures sous agitation. Elle permet la révélation des bandes protéiques. Les gels subissent ensuite 2 à 3 bains successifs d'acide acétique à 10 % afin d'éliminer l'excès de colorant. Un dernier bain est effectué dans une solution de rinçage pour obtenir une meilleure visualisation des bandes protéiques. La décoloration du fond du gel est effectuée avec deux bains d'acide acétique à 10% (1heure chacun). La procédure prend fin lorsque l'acide devient clair. Le gel est alors fixé pendant 15 min dans la solution de rinçage (Tab. 10).

Tableau 9 : Composition de la solution de la coloration.

| Produits | Quantité |
|-----------------------------|----------|
| Propanol 2 (ml) | 250 |
| Acide acétique 10% (ml) | 100 |
| Bleu de coomassie R250 (mg) | 250 |
| H2O (ml) | 1000 |

Tableau 10: Composition de la solution de rinçage.

| Produits | Quantité |
|---------------------------|----------|
| Méthanol (4,5%) (ml) | 45 |
| Acide acétique (10%) (ml) | 100 |
| Glycérol (2,5%) (ml) | 25 |
| Ethanol (10%) (ml) | 100 |
| H2O (ml) | 1000 qsp |

2.7. 6. Décoloration

Tableau 11 : Composition de la Solution de décoloration

| Produits | Quantité |
|---------------------------|----------|
| Méthanol (4,5%) (ml) | 45 |
| Acide acétique (10%) (ml) | 100 |
| Glycérol (2,5%) (ml) | 25 |
| Ethanol (10%) (ml) | 100 |
| H2O (ml) | 1000 |

2.9. Dosage immuno-enzymatique

2.9.1. Extraction des ecdystéroïdes

Les ovaires et les chrysalides des séries témoins et traitées *in vivo* préalablement pesés, ont été conservés dans 500µl de méthanol qui permet l'extraction des ecdystéroïdes. Après broyage aux ultrasons et centrifugation à 2700 tours pendant 10 minutes, le surnageant a été récupéré et évaporé et les extraits secs ont été récupérés dans 500µl de tampon EIA (100 ml

tampon phosphate 0,1M, pH 7,4 ; 23,4g Na Cl ; 0,37 Ethylène diamine Tétra Acétique acide (EDTA) ; 1g sérum Albumine bovine (BSA) et ajustés à 1l d'eau distillée).

2.9.2. Principe du dosage des ecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes ont été dosés selon la technique enzymo-immunologique (EIA) adaptée par Porcheron *et al.* (1989) (Fig. 5), puis modifiée par De Reggi *et al.* (1992). Cette technique repose sur la compétition entre le traceur enzymatique qui est la peroxydase couplé à la 2-succinyl 20 hydroxyecdysone et les ecdystéroïdes des extraits biologiques pour les sites limités d'un anticorps anti- ecdystéroïdes appelé anticorps primaire.

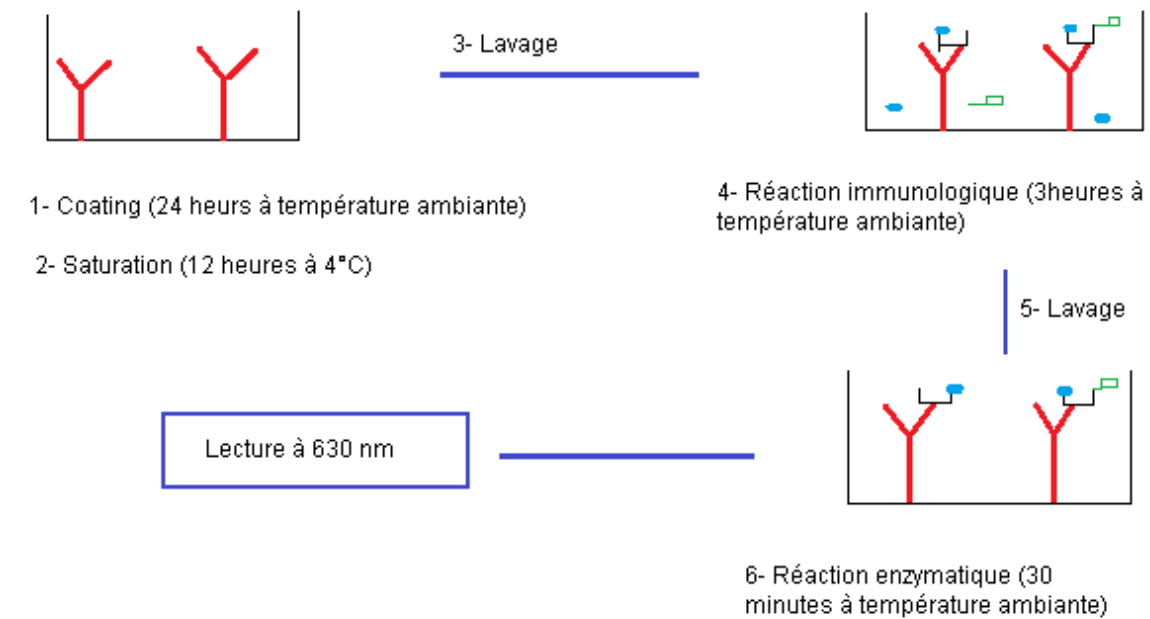
Les complexes formés seront ensuite fixés par un second anti corps anti immunoglobuline de lapin (Jackson Immunoresearch) retenu sur une microplaque à 96 puits (NUCN Immunoplate F96 , Danemark). Après trois heures d'incubation, les éléments non retenus seront éliminés au cours d'un rinçage des plaques. Un réactif de révélation de la peroxydase, la tétraméthylbenzidine (TMB) (Sigma, France) est utilisée. Celle-ci se fait sous agitation pendant 15-20 minutes et les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (Labsystem, Finlande) à 630 nm. La mesure de la quantité de la peroxydase fixé permet de déterminer la quantité des ecdystéroïdes contenue dans les échantillons biologiques a partir d'une courbe de référence réalisée avec des solutions standards d'ecdysone et de 20 hydroxyecdysone , le signal colorimétrique (exprimé par les absorbances) sera inversement proportionnel à la quantité des ecdystéroïdes contenus dans les échantillons et exprimé sous forme d'un rapport :

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

B : Absorbance de l'échantillon ou du standard.

B₀ : Absorbance en absence de l'hormone et de l'anticorps.

T : Absorbances en absence d'hormone et d'anticorps.



Y : Anticorps anti-immunologiques ; • : Hormone ; — : Anticorps de lapin ou de rat ; —□ : Traceur, conjugué de la peroxydase ecdysone).

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

2.10. Analyse statistique des données

Les données de nos résultats ont été exprimées par la moyenne des différentes répétitions plus ou moins l'écart-type ($m \pm SD$) et l'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Minitab (Weinberg, 1985), version fr 13.31 pour Windows (X, 2000). Les moyennes des séries témoins et traitées ont été comparées deux à deux en utilisant le test « t » de Student, avec un seuil de signification ($p \leq 5\%$).

Chapitre 1:

Impacts sur la reproduction

1. INTRODUCTION

Le contrôle endocrine de la mue chez les insectes a été établi en grande partie par les travaux de physiologie expérimentale menés par Kopec (1922) sur *Lymantria dispar* et par Wigglesworth (1934) sur *Rhodnius prolixus*, démontrant que le cerveau est le centre organisateur de la mue et de la métamorphose. Ils ont également contribué à la connaissance des neurosécrétions ainsi que leur rôle dans le contrôle des processus morphogénétiques et métaboliques. L'endocrinologie des insectes a été focalisée sur deux principales hormones, les ecdystéroïdes et les hormones juvéniles (HJs) ; mais il existe également des neurohormones de nature peptidique qui sont impliquées dans le contrôle des processus physiologiques fondamentaux tels que les métabolismes glucidique et lipidique, la contraction des muscles, la reproduction, la croissance et le développement (Gäde *et al.*, &1997 ; Wang *et al.*, 2004 ; Bellés, 2005). Aussi il existe des neuropeptides qui sont directement ou indirectement impliquées dans le processus de l'exuviation et de l'éclosion telles que l'hormone de d'éclosion (HE), l'hormone de déclenchement de la pré-exuviation (PETH), l'hormone de déclenchement de l'exuviation (ETH), le bursicon est un peptide activant la biosynthèse des phéromones (PBAN) (Gäde & Hoffmann, 2005) (Fig. 6).

Au niveau du tégument, la cuticule est un véritable exosquelette qui sert de barrière sélective entre le milieu intérieur et l'environnement. Cet exosquelette peu extensible formé de chitine et de protéines, implique un mode de croissance post-embryonnaire discontinue, ponctué par des mues et caractérisé par le rejet périodique de l'ancienne cuticule et son remplacement par une nouvelle. Chez les insectes à métamorphose complète (holométabole), le développement post-embryonnaire, présente trois phénotypes différents et trois types de cuticules sont successivement sécrétées par l'épiderme: cuticule larvaire, nymphale et adulte. Les analyses électrophorétiques et la détermination des acides aminés de ces différentes cuticules ont démontré leur hétérogénéité (Srivartrava, 1970; Robert & Willis 1980; Chihara *et al.*, 1982).

Ces modifications cuticulaires impliquent une régulation très fine de la synthèse des protéines, et donc d'importants changements au niveau de l'expression génique de l'épiderme, qui sont régulés par des hormones. Chez les insectes, les ecdystéroïdes contrôlent divers processus physiologiques liés à la croissance (mues, métamorphose) et à la reproduction (Gäde *et al.*, 1997). La biosynthèse des ecdystéroïdes est assurée par les glandes prothoraciques ou glandes de mue. A maturité sexuelle, la production de ces hormones est

assurée par les cellule folliculaires des ovaires (Soltani-Mazouni *et al.*, 1999) et les cellules interstitielles des testicules (Hagedorn, 1989).

Récemment *E. kuehniella* a fait l'objet de recherches sur les ecdystéroïdes et leur rapport avec la sécrétion de la cuticule au cours de la métamorphose (El ouar & *al.*, 2010 ; Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011 ; Kirane- Amrani & Soltani-Mazouni 2012) et Telfer (2009) a contribué à la connaissance de la formation des œufs chez les lépidoptères.

Facteurs extrinsèques et intrinsèques

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

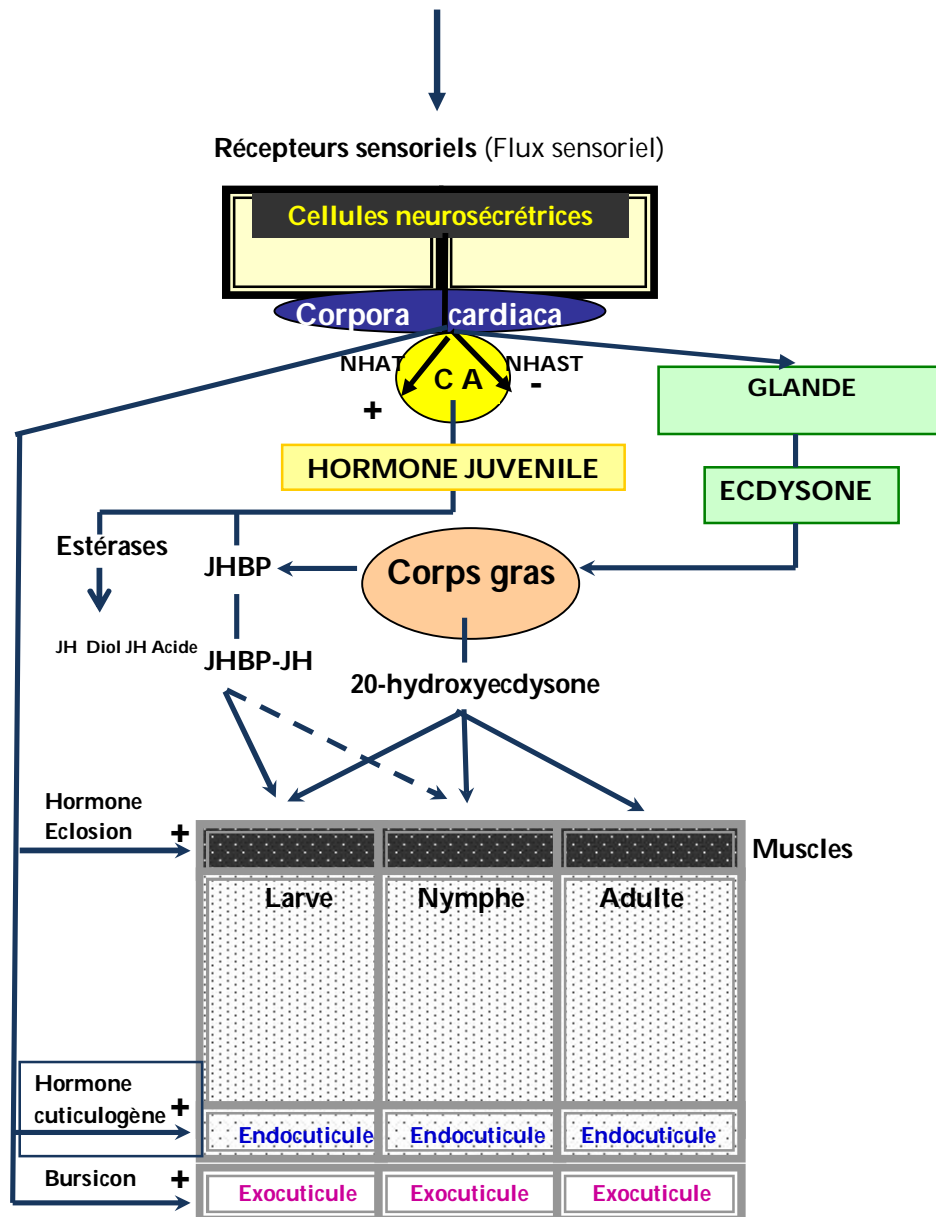


Figure 6 : Contrôle de la métamorphose chez les insectes, **NHAT**: neurohormone allatotrope, **NHAST**: neurohormone allatostatique, **JHBP**: juvenil hormone binding proteins, (Cassier *et al.*, 1997).

2. RESULTAT

2.1. Effet du captopril sur le des ecdystéroïdes

La quantité des ecdystéroïdes dans le corps entier des chrysalides femelles témoins et traitées à différents âges au cours du temps (jours) durant la métamorphose a été déterminée à partir d'une courbe de référence réalisée avec des solutions standards de 20-hydroxyecdysone (Tab. 12, Fig. 7).

Tableau 12 : Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20-hydroxyecdysone (20E).

| Solution standard | Concentration (M) | B/B ₀ |
|-------------------|-------------------|------------------|
| 1 | 10 ⁻¹² | 76 |
| 2 | 10 ⁻¹¹ | 68 |
| 3 | 10 ⁻¹⁰ | 48 |
| 4 | 10 ⁻⁹ | 30 |
| 5 | 10 ⁻⁸ | 18 |
| 6 | 10 ⁻⁷ | 16 |

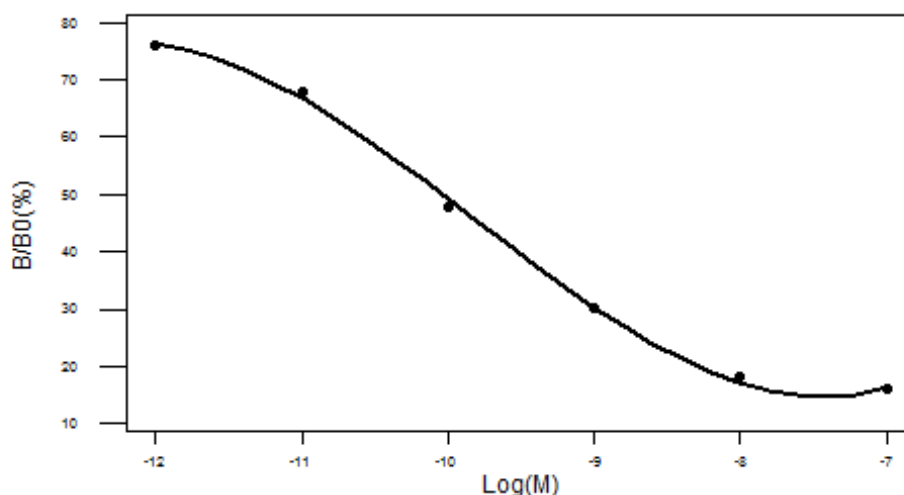


Figure 7 : Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20 hydroxyecdysone (20E).

Les ecdystéroïdes ont été déterminés dans le corps entier des chrysalides femelles témoins et traitées à différents âges au cours du développement nymphal. Ils sont exprimés en pg d'équivalent 20-hydroxyecdysone par mg de poids frais corporel. La variation du poids des chrysalides femelles (Tab. 13, Fig. 8) montre que le poids des chrysalides femelles diminue légèrement au cours du temps durant la métamorphose. Le captopril diminue le poids des chrysalides de manière hautement significative au troisième jour de la vie nymphale ($p=0,00$), significative au cinquième jour ($p=0,036$) et très significative au neuvième jour ($p=0,005$). Les taux hormonaux enregistrés à 0 et 1 jour ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$) ; ils augmentent dès le troisième jour de la vie nymphale pour atteindre un pic (243,50 pg équivalent 20E/mg chez les témoins et 388,80 pg équivalent 20E/mg chez les traitées) localisé à cinq jours, une diminution significative ($p < 0,05$) est ensuite observée dès le septième.

Le captopril entraîne une modification du profil hormonal, comparé avec les témoins. En effet, l'analyse statistique montre que le captopril entraîne une augmentation hautement significative des valeurs hormonales à partir du premier jour de la vie nymphale, jusqu'au cinquième ($p=0,000$) et très significative à sept jour ($p=0,016$) (Tab. 14, Fig. 9).

Tableau 13: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur le poids frais (mg) des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=10).

| Temps (jours) | Témoins | Traitées |
|---------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 15,10 \pm 0,1 a | 14,80 \pm 0,3 a |
| 1 | 14,20 \pm 0,2 a | 14,40 \pm 0,2 a |
| 3 | 13,40 \pm 0,1 a | 12,10 \pm 0,1 b |
| 5 | 13,30 \pm 0,1 a | 11,93 \pm 0,2 b |
| 7 | 12,30 \pm 0,2 a | 11,70 \pm 0,1 a |
| 9 | 11,60 \pm 0,2 a | 10,30 \pm 0,2 b |

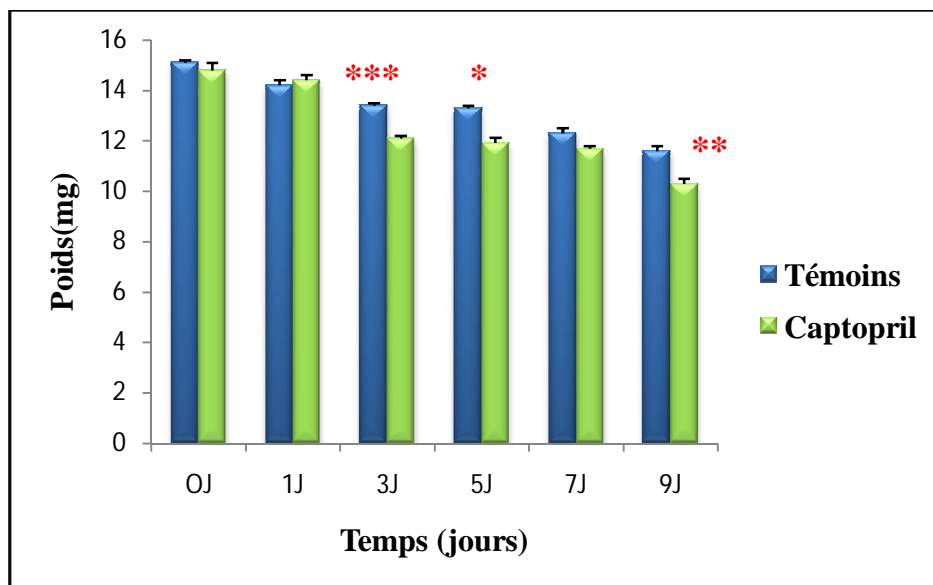


Figure 8: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur le poids frais (mg) des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=10, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Tableau 14: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux ecdystéroïdes (pg équivalent 20-E /mg de tissu) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des femelles d'*E. kuehniella* (m ± s, n=6).

| Temps (jours) | Témoins | Traitées |
|---------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 105,10 ± 23 a | 104,80 ± 12 a |
| 1 | 116,45 ± 15 a | 211,40 ± 6,26 b |
| 3 | 190,12 ± 15,8 a | 339,80 ± 21,9 b |
| 5 | 243,50 ± 13,9 a | 388,80 ± 22,6 b |
| 7 | 133,91 ± 5,83 a | 168,70 ± 15,8 b |
| 9 | 50,09 ± 6,20 a | 56,30 ± 4,2 a |

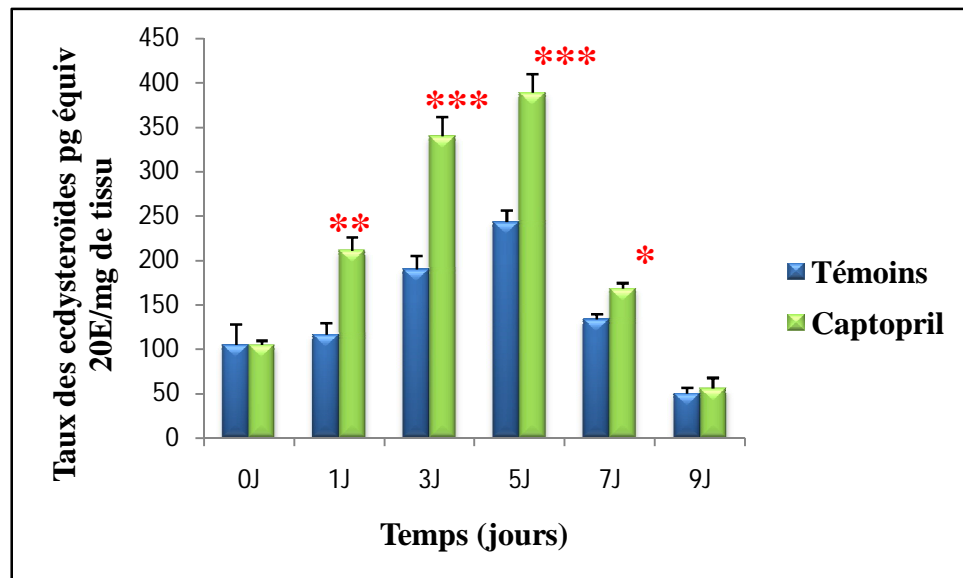


Figure 9: Effet *in vivo* du captopril, sur le taux des ecdystéroïdes (pg équivalent 20E/mg de tissu) chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n=6, *: p<0,05, **: p<0,01, *** : p<0,001).

2.2. Effet du captopril sur le taux des acides nucléiques

La détermination des quantités d'ADN et d'ARN ont été réalisées à partir des courbes de références exprimant l'absorbance en fonction des quantités d'ADN (Tab. 15, Fig. 10) et d'ARN. (Tab. 16, Fig. 11).

Tableau 15 : Gamme d'étalonnage des quantités d'ADN et leurs absorbances correspondantes.

| Quantité (µg) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance | 0,058 | 0,125 | 0,171 | 0,214 | 0,261 |

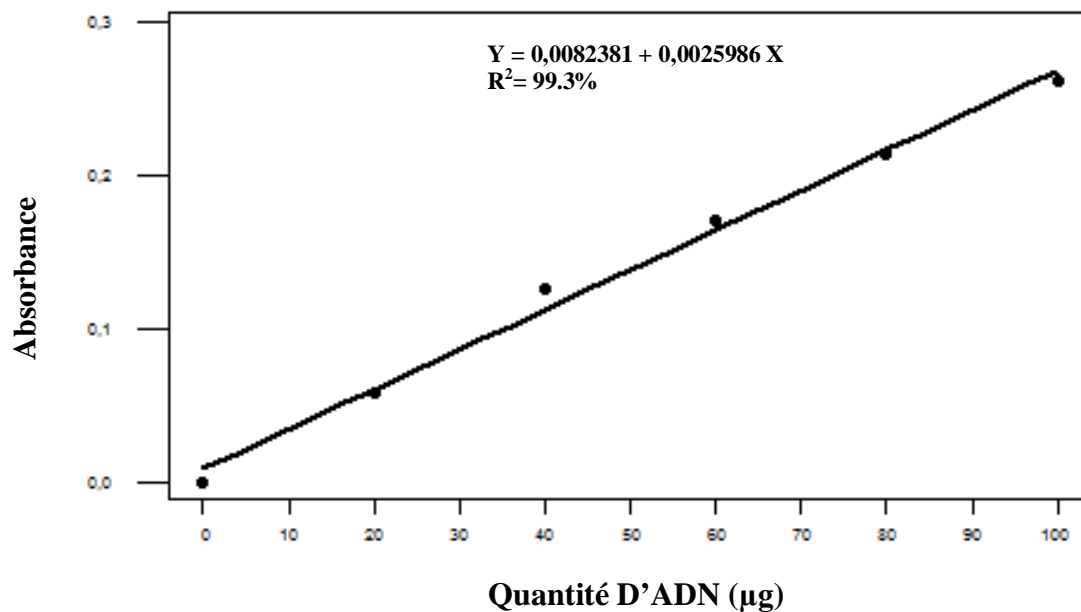


Figure 10 : Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ADN (µg).

Tableau 16 : Gamme d'étalonnage des quantités d'ARN et leurs absorbances correspondantes.

| Quantité (µg) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance | 0,070 | 0,165 | 0,274 | 0,339 | 0,413 |

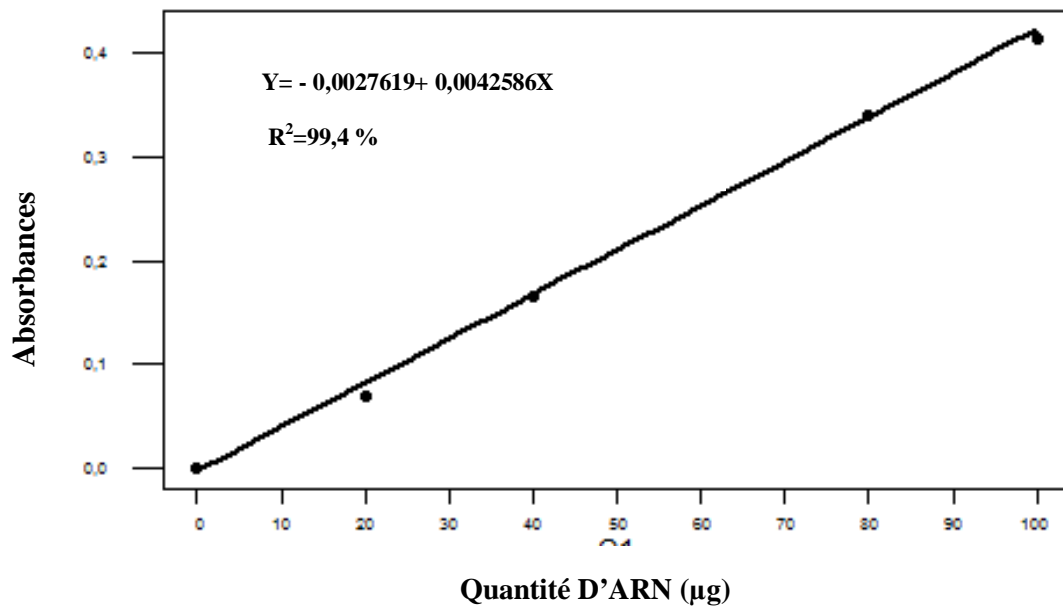


Figure 11: Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ARN (µg).

2.2.1. Effet du captopril sur le taux d'ADN tégumentaire

L'évolution des taux d'ADN, présente 1 seul pic situé au troisième jour de la vie nymphale, ces taux diminuent ensuite. D'après les résultats obtenus le captopril n'a aucun effet significatif ($p > 0,05$) sur les taux d'ADN dans le tégument (Tab. 17, Fig. 12).

Tableau 17: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux d'ADN (µg /mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=6).

| Age (jours) | Témoins | Traitées |
|-------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 7.05 ± 0.32 a | 7.10 ± 0.17 a |
| 1 | 8.84 ± 0.41 a | 8.25 ± 0.10 a |
| 3 | 9.01 ± 0.20 a | 8.38 ± 0.4 a |
| 5 | 6.97 ± 0.10 a | 7.00 ± 0.09 a |
| 7 | 6.32 ± 0.20 a | 6.84 ± 0.06 a |
| 9 | 5.16 ± 0.10 a | 5.12 ± 0.10 a |

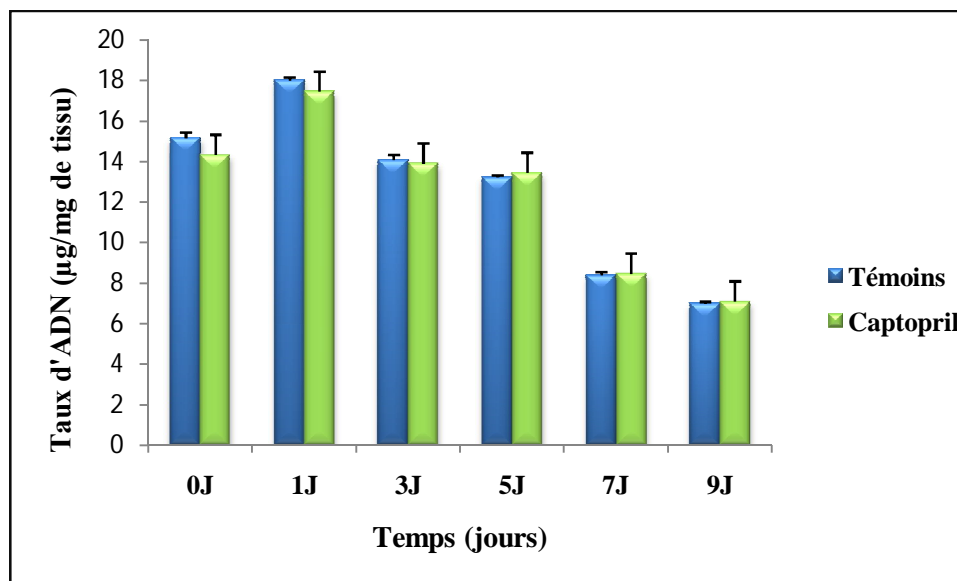


Figure 12: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur les taux d'ADN (µg /mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, n=6).

2.2.2. Effet du captopril sur le taux d'ARN tégumentaire

L'évolution des taux d'ARN, présente 1 seul pic situé au premier jour de la vie nymphale, ces taux diminuent ensuite. D'après les résultats obtenus le captopril n'a aucun effet significatif ($p > 0,05$) sur les taux d'ARN dans le tégument (Tab. 18, Fig. 13).

Tableau 18: Effet *in vivo* du captopril (10 μ g/2 μ l d'acétone), sur les taux d'ARN (μ g /mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, $n=6$).

| Age (jours) | Témoins | Traitées |
|-------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 15.16 \pm 0.20 a | 14.33 \pm 0.10 a |
| 1 | 18.01 \pm 0.16 a | 17.45 \pm 0.21 a |
| 3 | 14.08 \pm 0.27 a | 13.91 \pm 0.08 a |
| 5 | 13.22 \pm 0.10 a | 13.45 \pm 0.15 a |
| 7 | 8.38 \pm 0.17 a | 8.47 \pm 0.23 a |
| 9 | 7.10 \pm 0.09 a | 7.12 \pm 0.07 a |

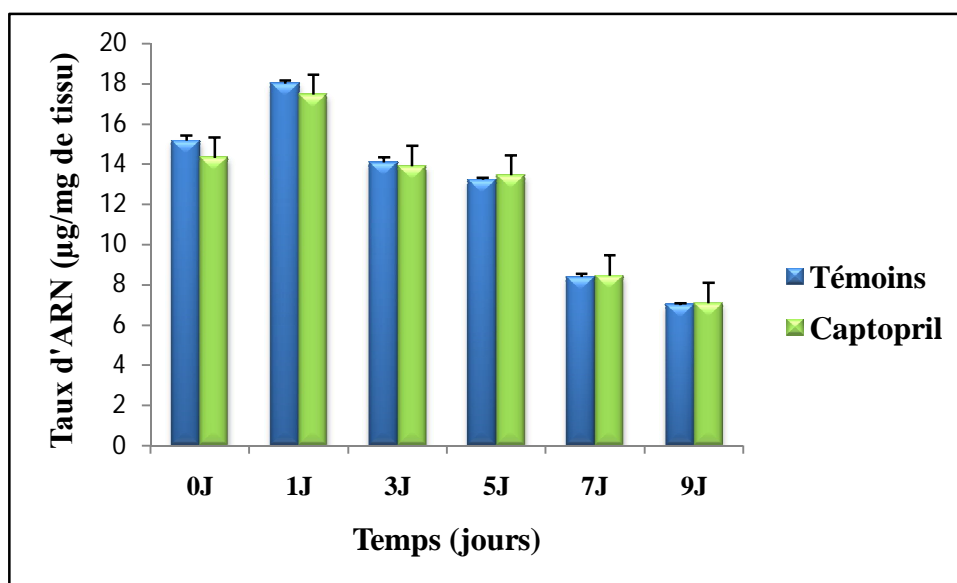


Figure 13: Effet *in vivo* du captopril (10 μ g/2 μ l d'acétone), sur les taux d'ARN (μ g /mg du poids du tégument) chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, $n=6$).

2.3. Effet du captopril sur le profil électrophorétique des protéines tégumentaires

L'étude électrophorétique sur PAGE-SDS a été menée *in vivo* sur les protéines cuticulaires des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées à différent âge 0, 1, 3, 5, 7 et 9 jours.

La courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (PM) des protéines standards en fonction du rapport frontal (Rf) a été établi avec quatre protéines standards à poids moléculaire connue (Tab. 19, Fig. 14).

L'étude électrophorétique sur PAGE-SDS (12%), met en évidence 10 fractions protéiques tégumentaires chez les femelles témoins. Ces fractions sont caractérisées par leur rapport frontal (RF) et leur poids moléculaires (PM) qui varient de 35,93 Kda à 247,68 Kda. La comparaison des profils électrophorétique révèle une différence entre les témoins et traitées. En effet il y'a l'apparition de la fraction n° 9 (PM=42,95 kDa) chez les traitées dès le premier jour de la vie nymphale alors que chez les témoins cette fraction apparait dès le troisième jour de la vie nymphale, (Tab. 20, Fig. 15, 16).

Tableau 19: Poids moléculaires (PM) en kDa et la mobilité relative (RF) des protéines standards.

| Poids moléculaire (kDa) | 200 | 100 | 50 | 37 |
|-------------------------|-------|--------|-------|-------|
| Log PM | 2,17 | 2.00 | 1,69 | 1,59 |
| Rapport frontal | 0,351 | 0 ,500 | 0,703 | 0,792 |

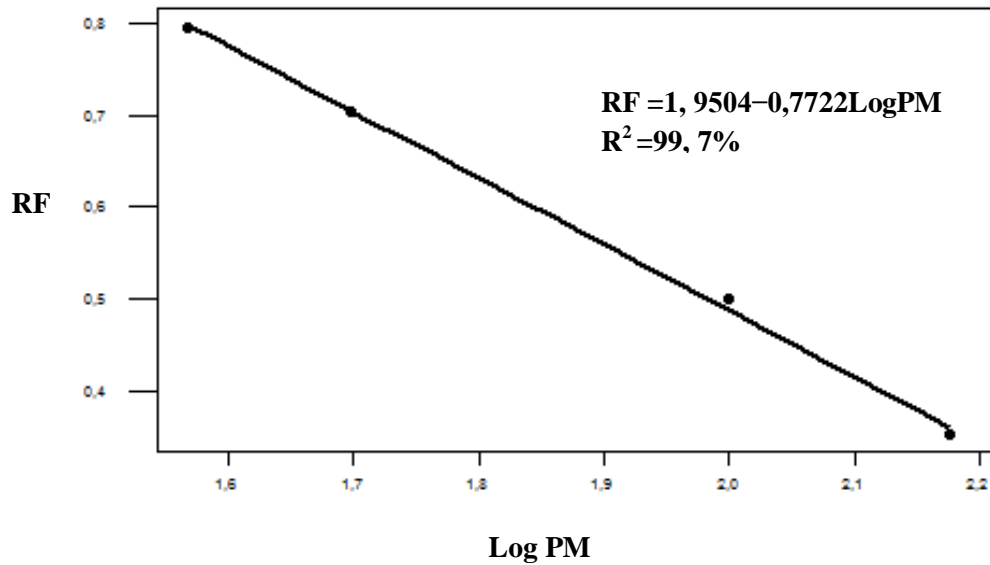


Figure 14 : Séparation électrophorétique des protéines cuticulaires: courbe de référence exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du logarithme décimal du poids moléculaire (kDa) des protéines standards (a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : ovalbumine, 50kDa, d : anhydrase carbonique, 37kDa).

Tableau 20. Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM kDa) des différentes fractions protéiques détectés par électrophorèse dans le tégument des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées au cours du temps (jours) durant la métamorphose.

| N° de fraction | RF | PM (kDa) | 0Jrs | | 1Jrs | | 3Jrs | | 5Jrs | | 7Jrs | | 9Jrs | |
|----------------|-------|----------|------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|
| | | | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C |
| 1 | 0,055 | 274,66 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | 0,098 | 247,68 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + |
| 3 | 0,148 | 207,44 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 | 0,222 | 167,45 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | 0,259 | 148,11 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 6 | 0,358 | 113,97 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 7 | 0,462 | 91,51 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8 | 0,550 | 65,78 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9 | 0,681 | 42,97 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10 | 0,740 | 35,93 | 0 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

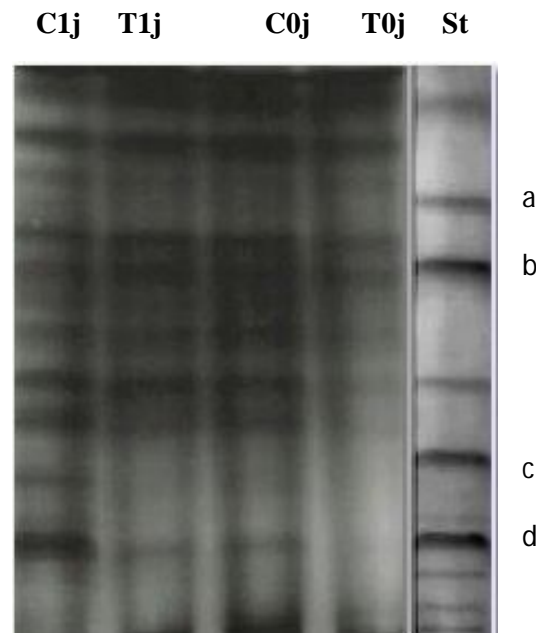


Figure 15: Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines cuticulaires chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées au cours du temps (jours) durant la métamorphose, comparée à celle des protéines marqueurs (St) (a : myosine b : phosphorylase; c : ovalbumine ; c : anhydrase carbonique).

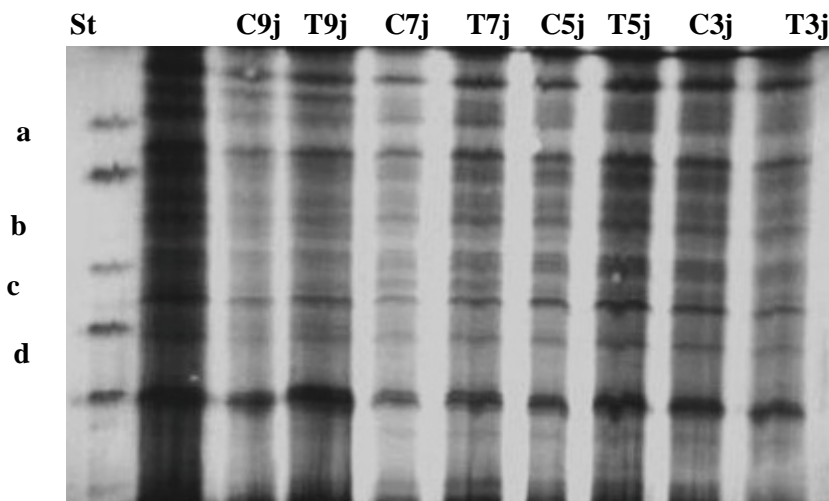


Figure 16: Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines cuticulaires chez les chrysalides femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées au cours du temps (jours) durant la métamorphose, comparée à celle des protéines marqueurs (St) (a : myosine b : phosphorylase; c : ovalbumine ; c : anhydrase carbonique).

2.4. Effet du captopril sur la sécrétion cuticulaire

Les épaisseurs de la cuticule totale nymphale (ancienne cuticule) et de la nouvelle (cuticule pré-exuviale adulte) ont été estimées sur des coupes semi-fines du tégument périphérique à différents âges au cours du stade nymphal. Les résultats sont représentés dans les tableaux.21, 22, et les figures. 17, 18.

L'épaisseur de la cuticule nymphale augmente significativement avec l'âge pour atteindre un maximum au troisième jour $13.83 \pm 0.10 \mu\text{m}$ pour la série de témoins et $14.90 \pm 0.20 \mu\text{m}$ pour les traités et décroît significativement par la suite en raison de la digestion des couches profondes de l'ancienne cuticule. L'analyse statistique montre que le captopril augmente l'épaisseur de la cuticule nymphale de façon hautement significative au premier et troisième jour ($p=0,001$) et significative au cinquième jour de la vie nymphale ($p=0,04$).

La nouvelle cuticule ou cuticule pré-exuviale adulte est sécrétée immédiatement après l'apolyse (troisième jour), les épaisseurs augmentent progressivement pour atteindre un maximum de $7.27 \pm 0.05 \mu\text{m}$ pour les témoins et $7.58 \pm 0.10 \mu\text{m}$ pour les traités. Le captopril augmente significativement l'épaisseur de la nouvelle cuticule seulement au cinquième jour ($p=0,04$).

Tableau 21: Effet *in vivo* du captopril (10µg /2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* (m ± s, n=6).

| Age (jours) | Témoins | Traitées |
|-------------|----------------|----------------|
| 0 | 7.80 ± 0.05 a | 7.50 ± 0.10 a |
| 1 | 11.00 ± 0.10 a | 12.12 ± 0.01 a |
| 3 | 13.83 ± 0.10 a | 14.90 ± 0.20 b |
| 5 | 12.27 ± 0.07 a | 13.06 ± 0.15 b |
| 7 | 10.90 ± 0.20 a | 11.29 ± 0.03 a |
| 9 | 8.03 ± 0.05 a | 8.46 ± 0.07 a |

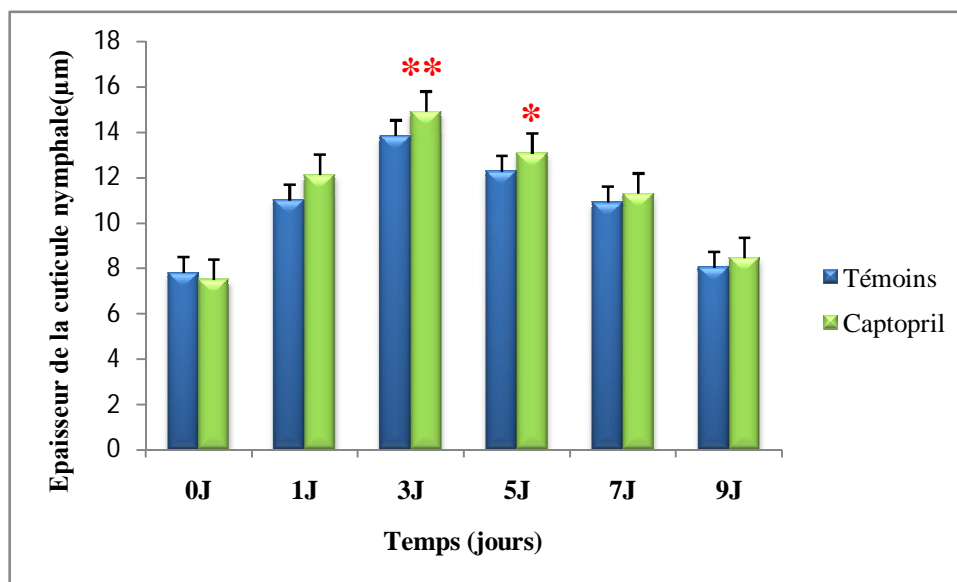


Figure 17: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* (m ± s, n=6, *: p<0,05, **: p<0,01).

Tableau 22: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la nouvelle cuticule (adulte) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* (m ± s, n=6).

| Age (jours) | Témoins | Traitées |
|-------------|---------------|---------------|
| 3 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 5 | 5.05 ± 0.10 a | 5.98 ± 0.01 b |
| 7 | 6.10 ± 0.02 a | 6.30 ± 0.10 a |
| 9 | 7.27 ± 0.05 a | 7.58 ± 0.10 a |

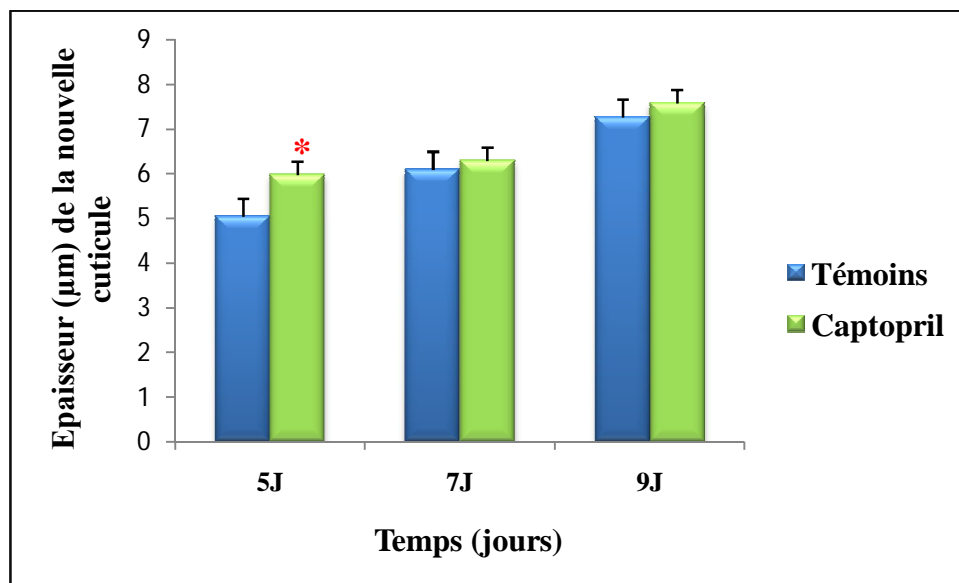


Figure 18: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), sur l'épaisseur (µm) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* (m ± s; n=6, *: p<0,05).

3. DISCUSSION

3.1. Effet sur le taux des ecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes et l'hormone juvénile présentent des taux hémolymphatiques fluctuants tout au long du développement des insectes (Hagedorn, 1985 ; Riddiford, 1985, 1994 ; Rees, 1995 ; Romana *et al.*, 1995), les pics hormonaux sont associés à des événements importants dans le développement, notamment les mues (apolyse et synthèse de la cuticule), la métamorphose (Gäde *et al.*, 1997 ; Aribi *et al.*, 1997) et la reproduction (Hagedorn, 1984 ; Cassier, 1996). Selon les espèces un ou deux pics sont détectés durant la métamorphose : *Pieris brassicae* (Lafont *et al.*, 1974), *Leptinotarsa decemlineata* (Hsiao *et al.*, 1975) et *T. molitor* (Delbecq *et al.*, 1978) présentent un seul pic, tandis que *Galleria mellonella* (Bollenbacher *et al.*, 1978) et *cydia pomonella* (Soltani, 1986) ont en deux pics. Les ecdystéroïdes exercent leurs effets sur les tissus cibles via l'interaction avec les récepteurs nucléaires EcR qui forme un hétérodimère avec la protéine ultraspirale USP (Yao *et al.*, 1992; Bonneton *et al.*, 2003; Henrich, 2005). Durant la phase ascendante du pic, la fixation de la molécule 20E sur le complexe EcR-USP entraîne l'expression d'une cascade de gènes appelés "up regulated genes" il s'agit de BR-C (Broad complexe), E74, E75 (Kokoza *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2007) qui codent pour la division des cellules épidermiques, la sécrétion du fluide exuvial, la digestion cuticulaire, la synthèse de la cuticule et l'épicuticule, la synthèse de l'hormone d'éclosion au niveau des cellules neurosecrétrices ventro-médiales ainsi que son stockage dans les nerfs proctodéales. La phase descendante du pic de la 20E et en conséquence de la faible concentration ou l'absence de l'hormone, une autre série de gènes "down regulated genes" s'exprime permettant ainsi, la libération de l'hormone d'éclosion et la sclérotisation (Retnakakaran *et al.*, 2003).

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes au cours du stade nymphale dans le corps entier des chrysalides d'*Ephesthia kuehniella* révèle la présence de deux augmentations dans les taux des ecdystéroïdes, l'une au troisième jour et l'autre au cinquième jour de la vie nymphale (Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011). Le pic à 5 jours est responsable du développement imaginal puisqu'il coïncide avec la synthèse de la cuticule pré-exuviale adulte qui débute au quatrième jour et se poursuit jusqu'à la veille de l'exuviation adulte (Maamcha, 1997, Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011), ce pic est retrouvé également chez les mâles d'*E. kuehniella* (El Ouar *et al.*, 2010). Il est également l'équivalent du pic unique retrouvé chez *T. molitor* (Aribi *et al.*, 2001; Soltani *et al.*, 2002) et *Zophabas atratus*

(Aribi *et al.*, 1999). Pour le pic du troisième jour, il est retrouvé chez la plupart des insectes (Zimowska *et al.*, 1991). Ainsi le pic à 3 jours paraît d'origine ovarienne, alors que celui du 5^{ème} jour est d'origine prothoracique. Lépidoptère, comme *Bombyx mori* (Swevers & Latrou, 1999), *C. pomonella* (Soltani *et al.*, 1989). Il est lié au processus de la reproduction. En effet, il coïncide avec le début de la vitellogénèse.

Le traitement *in vivo* des chrysalides d'*Ephesthia kuehniella* avec le captopril modifie le profil hormonal des ecdystéroïdes en augmentant les valeurs hormonales dès le premier jour du stade nymphal. Le captopril, augmente les taux des ecdystéroïdes via la stimulation du cerveau qui sécrète la PTTH qui à son tour stimule la synthèse des ecdystéroïdes (Tunaz & Ugan, 2004), ou *via* la stimulation directe des glandes prothoraciques (Rees, 1985 ; Gäde, 1997 ; Niwa, 2010 ; Rewitz, 2013). Kirane-Amrani & Soltani-Mazouni (2012) ont rapporté que l'énalapril, le lisinopril et le captopril administrés par application topique à des chrysalides d'*E. kuehniella* nouvellement exuviées réduits de manière significative les contenus des ecdystéroïdes dans les extraits du corps entier au 3^{ème} jour. Les mêmes résultats ont été trouvés chez *E. kuehniella* traitée avec le holofénoside (RH-0345) mais avec une avancée du pic qui s'étale entre deux et quatre jours (El ouar, 2005), des résultats similaires ont été trouvés avec la même molécule le halofénoside (RH-0345), qui entraîne des augmentations dans le contenu des ecdystéroïdes chez les nymphes de *T. moitor* (Aribi, 2001 ; Soltani, 1999, 2002 ; Berghiche, 2007) en gardant la position du pic qui n'a pas été affectée. D'autres études montrent que le traitement des chrysalides d'*E. kuehniella* avec le pyriproxifène augmente les valeurs hormonales avec une avancée du pic (El ouar, 2005). Le halofénoside testé sur des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* entraîne une modification du profil hormonal comparé aux témoins, les contenus hormonaux augmentent dès les six premiers jours de la vie nymphale et une diminution est observée au septième jour (Taïbi, 2007).

3.2. Effet sur les acides nucléiques tégumentaires

La cuticule est un édifice macromoléculaire complexe, tant par sa structure que par sa composition chimique. Elle est principalement constituée de fibres cristallines de chitine (polymère de N-acétylglucosamine) auxquelles s'associent des protéines sous forme d'un complexe glycoprotéique; ces fibres chitino-protéiques sont elles-mêmes entourées par une matrice protéique (Neville, 1975; Hepburn, 1976, 1985) (Fig. 19 A). Sa biosynthèse s'effectue à partir de glycogène stocké dans le corps gras (Fig. 19 B). Les propriétés mécaniques variées

de la cuticule sont dues à la grande diversité des protéines qui la composent ainsi qu'à son degré de sclérification. D'après nos résultats, les taux d'ARN tégumentaire quelle que soit la série, témoins et traitée, est en parfaite corrélation avec les taux d'ADN tégumentaire.

Les résultats concernant l'effet *in vivo* du captopril sur les taux d'ADN et ARN dans le tégument des chrysalides femelles au cours du temps durant la métamorphose montrent que cette molécule n'a aucun effet significatif.

L'impact de cette molécule sur le tégument est peu abordé mais des résultats similaires ont été trouvés avec des régulateurs de croissance, en effet le halofenozide et le méthoxyfénozide augmentent considérablement le contenu en protéines cuticulaires (Berghiche *et al.*, 2007). La JH inhibe la synthèse des protéines hémolymphatiques chez les larves de *B. mori* (Bosquet *et al.*, 1989 a, b) et le pyriproxifène inhibe la synthèse de deux protéines hémolymphatiques spécifique aux larves chez *Locusta migratoria*, (De Kort & Koopmanschap, 1991). La comparaison des taux de protéines entre les nymphes témoins et traitées de *T. molitor* montrent que le pyriproxifène induit une augmentation des protéines de l'hémolymph chez les séries traitées. Cette augmentation a lieu aux 2^{ème} et 3^{ème} jour de la vie nymphale (Aribi *et al.*, 2001)

3.3. Effet sur le profil électrophorétique des protéines tégumentaires

L'étude électrophorétique menée sur les protéines cuticulaires a permis de séparer 10 fractions protéiques de poids moléculaires variant entre 35,93kDa et 274,66 kDa. La comparaison des profils électrophorétiques révèle qu'il n'y a pas de différence qualitative entre les protéines des cuticules témoins et traitées, de plus il n'y a pas de différence significative au niveau de l'intensité des fractions protéiques entre le profil des témoins et traité. Des résultats similaires ont été trouvés avec d'autres molécules, le halofenozide (RH-0345) et la 20E testés *in vitro* chez *T. molitor* n'affectent pas le pattern des protéines cuticulaires (Soltani *et al.*, 2000; Soltani & Berghiche 2001), le pyriproxifène, testé *in vivo* chez les nymphes de *T. molitor*, n'a aucun effet sur le profil électrophorétique des protéines hémolymphatiques (Aribi & Lakbar, 2001).

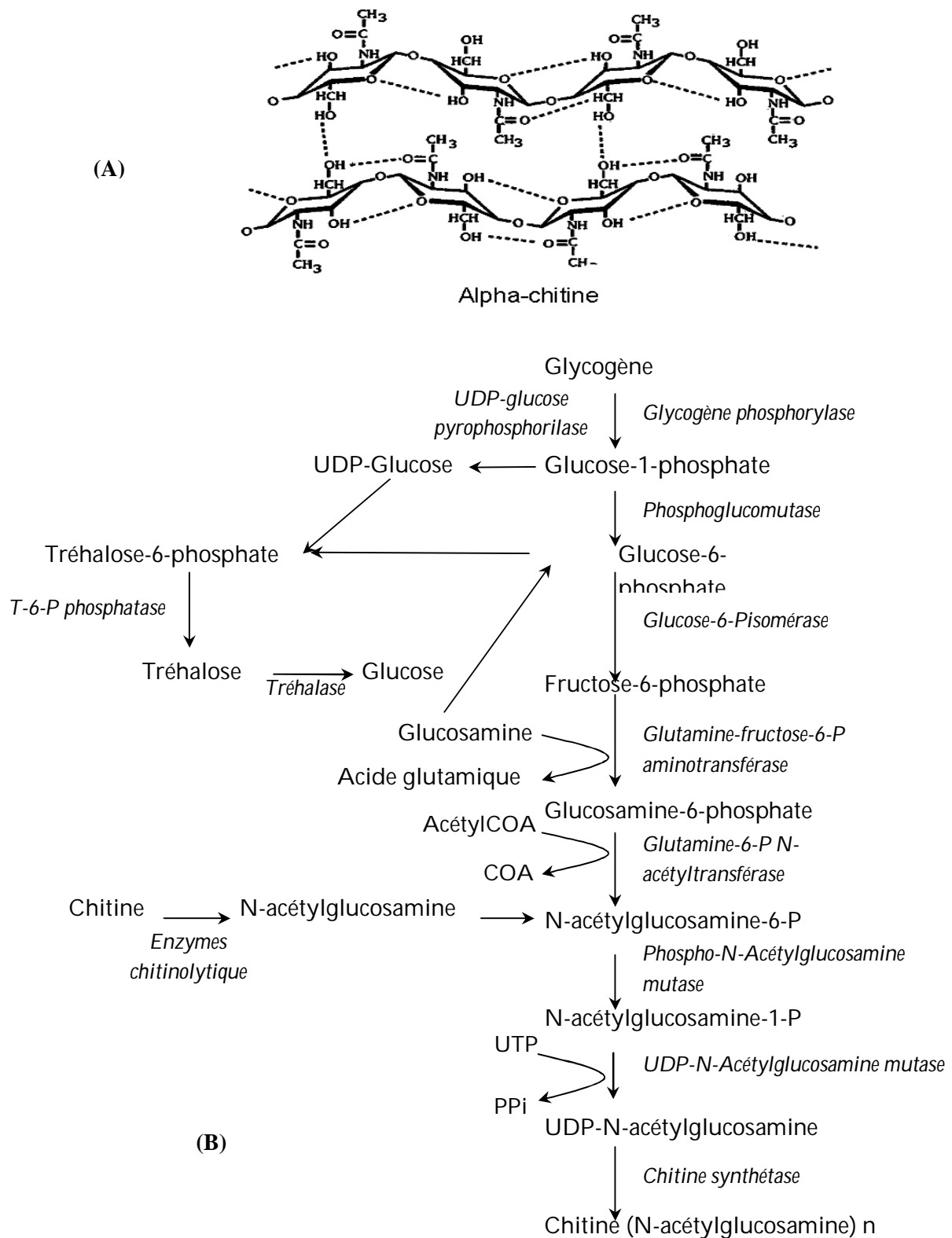


Figure 19: La structure (A) et les étapes de la biosynthèse de la chitine (B) (d'après Dhadialla et al., 2005).

3.4. Effet sur la sécrétion cuticulaire

Les insectes possèdent un exosquelette inextensible pour croître, ils doivent se débarrasser périodiquement de leur ancienne cuticule et en secréter une autre cuticule, c'est le phénomène de la mue. La mue se produit en deux étapes principales : l'apolyse et l'ecdysis. A l'apolyse, l'épiderme se sépare de la cuticule du stade précédent. Entre l'apolyse et l'ecdysis, l'insecte « nouveau » est à l'état pharate, caché sous sa vieille cuticule. C'est cette étape, parfois difficile à observer, qui sert à identifier le début et la fin de chaque stade. L'ecdysis est l'étape où l'insecte se débarrasse de son ancienne cuticule, ou exuvie (Fig. 20). Ce sont les cellules épidermiques qui produisent consécutivement de minces couches cuticulaires et de nombreuses lamelles particulières pour former l'exosquelette de l'insecte (Riddifort, 1985). La cuticule constitue une acquisition fondamentale dans l'évolution des arthropodes. Cette cuticule est composée d'une couche fine externe ou epicuticule, riche en lipides cuticulaires (Vincent & Wegst 2004) qui assure aux insectes une protection contre la déshydratation, une régulation de la perméabilité cuticulaire et une régulation contre les micro-organismes et les champignons entomopathogènes (De Renobales *et al.*, 1991), et une couche interne la procuticule (exocuticule et endocuticule) plus épaisse composée de protéines et de chitine.

Rare sont les études qui ont abordé l'effet des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur la sécrétion cuticulaire chez les insectes, les résultats de nos observations au microscope photonique, portant sur l'épaisseur de la cuticule nymphale et nouvelle cuticule au cours du stade nymphal chez *E. kuehniella*, montrent que le captopril augmente significativement l'épaisseur de la cuticule totale à l'apolyse (troisième jour), au premier et au cinquième jour du traitement. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés avec d'autres molécules (Smaghe *et al.*, 1999, Smaghe 1999a).

L'épaisseur induite par un agoniste des ecdystéroïdes le halofenozide *in vitro* en milieu hormonal (addition 20E) est significativement supérieure, les mensurations des cuticules sécrétées par le tégument sternal abdominal nymphal de *T. molitor* indiquent que l'épaisseur de la nouvelle cuticule traitée avec le halofenozide augmente au cours des différents temps (Soltani *et al.*, 2002).

Contrairement à nos résultats, le flucycoxuron administré à des chrysalides d'*E. kuehniella* perturbe la sécrétion cuticulaire, réduit l'épaisseur de la cuticule et retarde légèrement l'apolyse, (Bendjedou *et al.*, 1998).

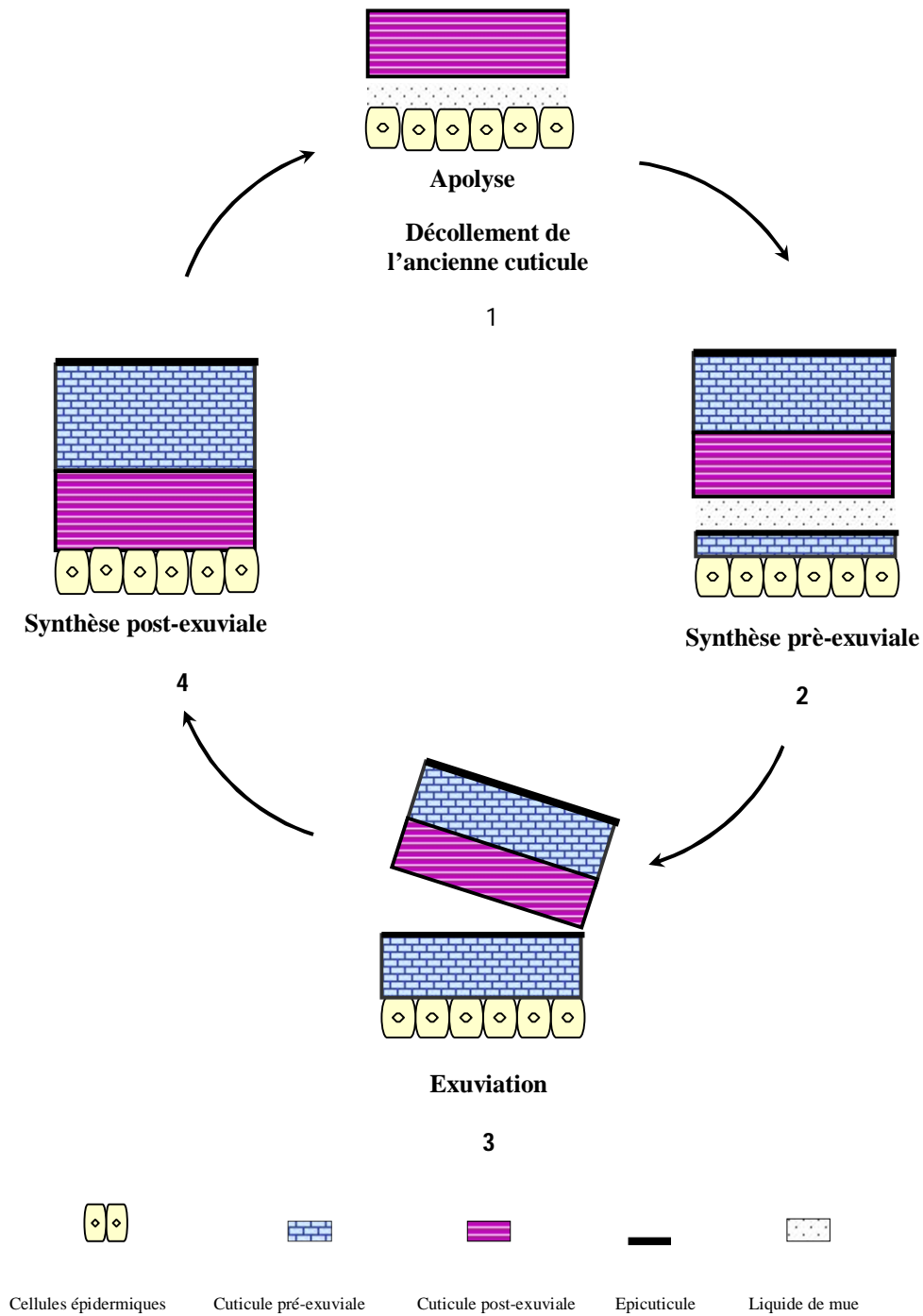


Figure 20: Représentation schématique des événements se produisant au niveau du tégument pendant le cycle de mue (d'après Hadley, 1986).

Chapitre 2 :

Impacts sur le développement

1. INTRODUCTION

Chaque année, près de 20000 espèces d'insectes menacent la production agricole mondiale (McEwin, 1978). La connaissance des mécanismes qui contrôlent la reproduction ou le développement de ces insectes nuisibles présente donc à la fois un intérêt fondamental et un intérêt économique très important.

Chez *E. kuehniella*, l'ovaire est de type méroïstique polytrophique. Il comprend de 8 à 10 ovarioles, il est constitué par un tube épithélial mésodermique dans lequel les ovocytes sont en succession linéaire reflétant 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 se différencie le premier, il contient des cellules germinales primordiales qui engendrent par division deux catégories de cellules sœurs, des ovocytes et des cellules nourricières ou trophocytes et des cellules somatiques (Cassier *et al.*, 1997). Le vitellarium permet aux ovocytes, entourés par une assise de cellules folliculaires, dont l'ensemble forme un follicule, d'accumuler des réserves (vitellus) et d'acquérir des enveloppes protectrices, sécrétées par le follicule, appelées enveloppe vitelline et chorion (Raikhel & Dhadialla, 1992).

La phase d'accroissement correspondant à l'accumulation de matériaux plastiques et énergétiques variés: lipides (triglycérides, lipoprotéines), glucides (glycogène), protéines et sels minéraux correspond à la vitellogénèse (Cassier *al.*, 1997). Toute modification dans la concentration en protéines au cours de la vitellogénèse peut conduire à une altération de la reproduction (Robker *et al.*, 2009). Dans ce processus, la protéine essentielle est la vitellogénine, protéines précurseur du vitellus dans les ovocytes (Attardo *et al.*, 2005) ; elle est généralement élaborée par le corps gras qui un lieu de stockage des métabolites (protéines, glucides et lipides), mais aussi de synthèse de la majorité des protéines hémolyphatiques (Roma *et al.*, 2010), et secrétés dans l'hémolymphe puis captée par endocytose par les ovocytes en voie de développement sous l'effet de l'hormone juvénile JH (Engelmann, 1983; Kunkel & Nordin, 1985, Gilbert *et al.*, 2000, Telfer 2009), elles sont ensuite stockées et prennent le nom de vitellines (Engelmann, 1979).

Les glucides possèdent un rôle essentiel dans la détermination, le développement et la maturation ovocytaire (Sutton-Mc Dowal *et al.*, 2010), source d'énergie, Les taux de glycogène, dans les tissus et l'hémolymphe, sont étroitement liés aux événements physiologiques comme la mue et la reproduction (Wiens & Gilbert, 1968). Les lipides

ovariens représentent une partie importante de ces réserves une faible partie est synthétisée par l'ovocyte et les follicules et une autre partie provient de l'hémolymph sous forme de lipoprotéines (Cassier *et al.*, 1997); les lipides, principale source d'énergie chez les insectes, sont synthétisés et stockés dans le corps gras (Beenakers *et al.*, 1985) puis transportés vers les organes utilisateurs, notamment les ovaires via l'hémolymph pour être utilisés lors de la vitellogénèse (Wigglesworth, 1972).

Chez *E. kuehniella*, les étapes de la vitellogénèse s'effectuent pendant la vie nymphale, l'accouplement et la fécondation ont lieu les 12 premières heures après l'exuviation adulte (période de préoviposition) et la période d'oviposition dure de 3 à 4 jours (Taibi, 2007 ; Khebeb *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2011)

De nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré l'implication de l'hormone juvénile, de l'ecdysone ainsi que certaines neurohormones dans le contrôle de la physiologie reproductive (Engelmann, 1979; Davis *et al.*, 1990; Cusson *et al.*, 1994; Gäde & Hoffmann, 2005).

L'activité ovarienne est régulée par des facteurs intrinsèques, neurohormones et hormones (Ou *et al.*, 2011), mais aussi extrinsèques environnementaux (Garelli *et al.*, 2012 ; Rideout *et al.*, 2012), comme l'accouplement, la prise de nourriture, les phéromones et la température, qui déterminent de manière directe ou indirecte l'activation des voies endocrines et neuroendocrines conduisant à la reproduction (Fig. 21).

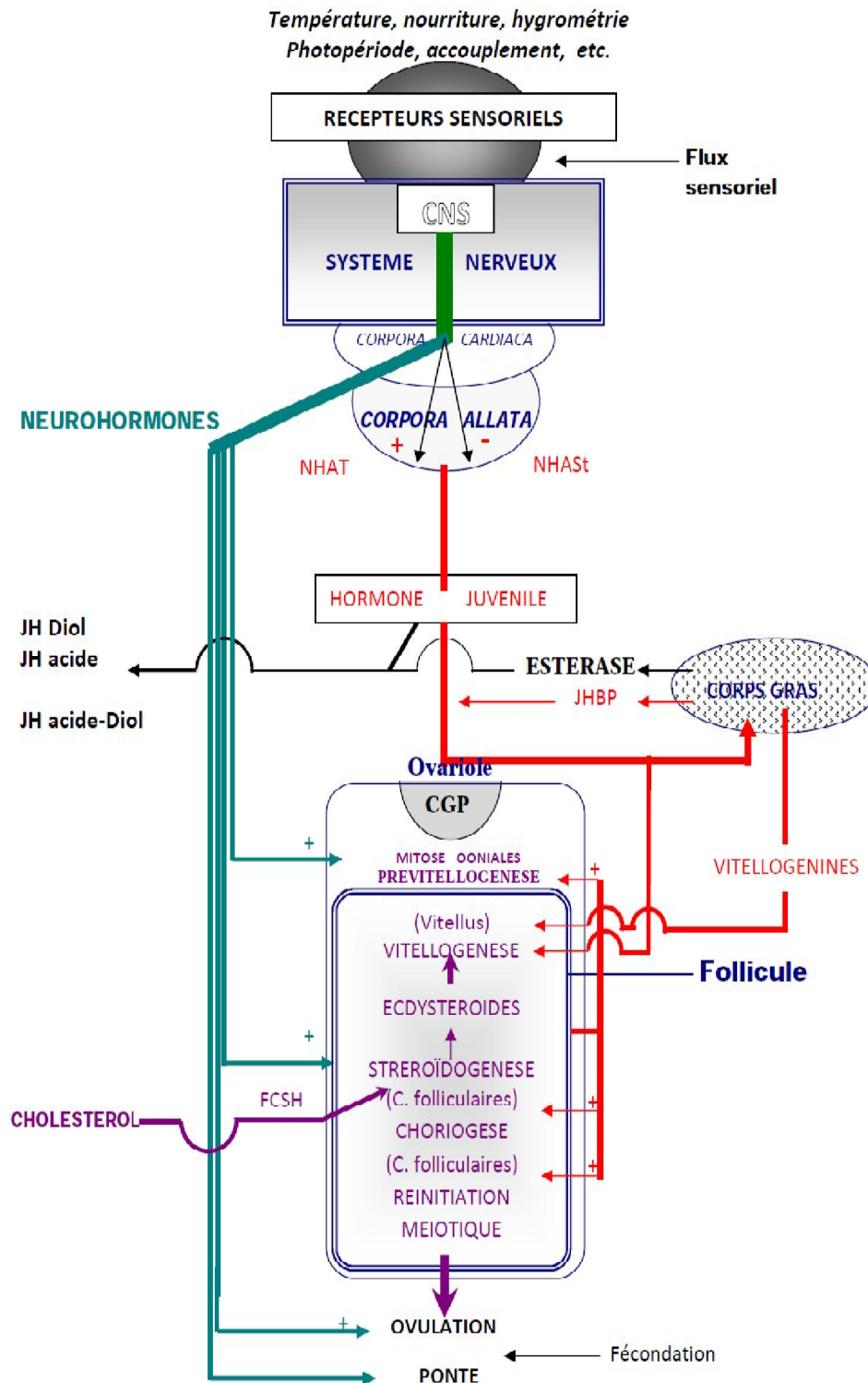


Figure 21: Contrôle de la reproduction chez les insectes. CNS: cellules neurosécrétrices, NHAT: neurohormone allatotrope, NHATst: neurohormone allatostatique, JHBP: juvenil hormone binding proteins, FCSH: follicle cells stimulating hormone, CGP: cellules germinales primordiales (Cassier *et al.*, 1997).

2. RESULTATS

2.1. Effet du captopril sur la morphométrie de l'ovaire

Les résultats obtenus montrent que le captopril entraîne une réduction très significative ($p= 0,004$) du poids frais des ovaires mesuré à l'émergence adulte ($<8h$) par apport aux témoins puisque il passe de $5,16 \pm 0,4$ mg chez les témoins à $2,13 \pm 0,55$ mg chez les traités (Tab.23, Fig. 22).

Tableau 23: Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le poids frais (mg) des ovaires mesuré à l'émergence adulte ($<8h$) ($m \pm s$, $n= 6$).

| Traitement | Poids des ovaires (mg) |
|------------|------------------------|
| Témoins | $5,16 \pm 0,40$ a |
| Captopril | $2,13 \pm 0,55$ b |

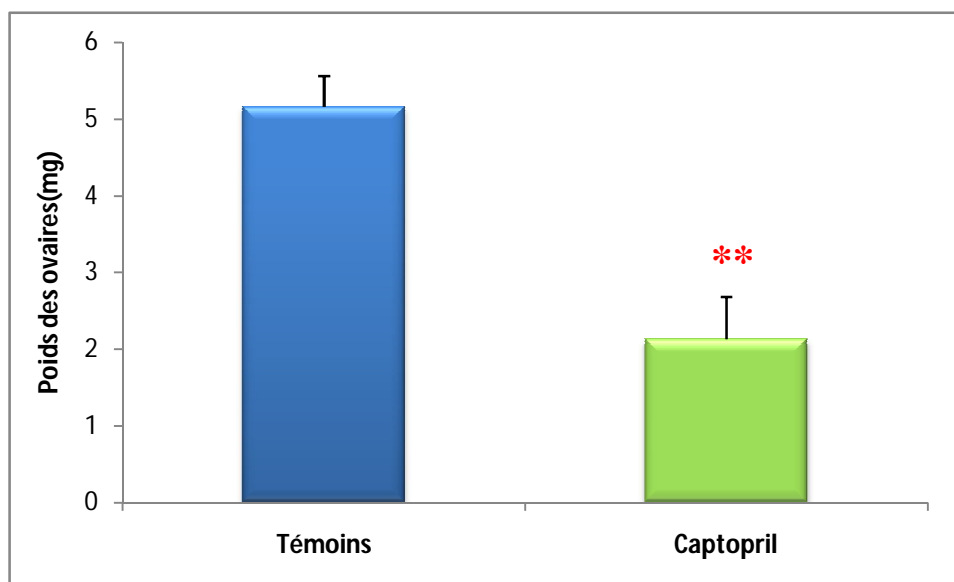


Figure 22. Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal sur le poids frais (mg) des ovaires chez d'*E. kuehniella* mesuré à l'émergence adulte ($<8h$) ($m \pm s$, $n= 6$, **: $p<0,01$).

Le captopril réduit significativement le nombre d'ovocytes ($P= 0,000$) chez les femelles traitées par rapport aux témoins (tab. 24, Fig. 23).

Tableau 24: Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires. ($m \pm s$, $n=6$).

| Traitement | Nombre d'ovocytes |
|------------|----------------------|
| Témoins | $189,00 \pm 13,60$ a |
| Captopril | $73,00 \pm 12,20$ b |

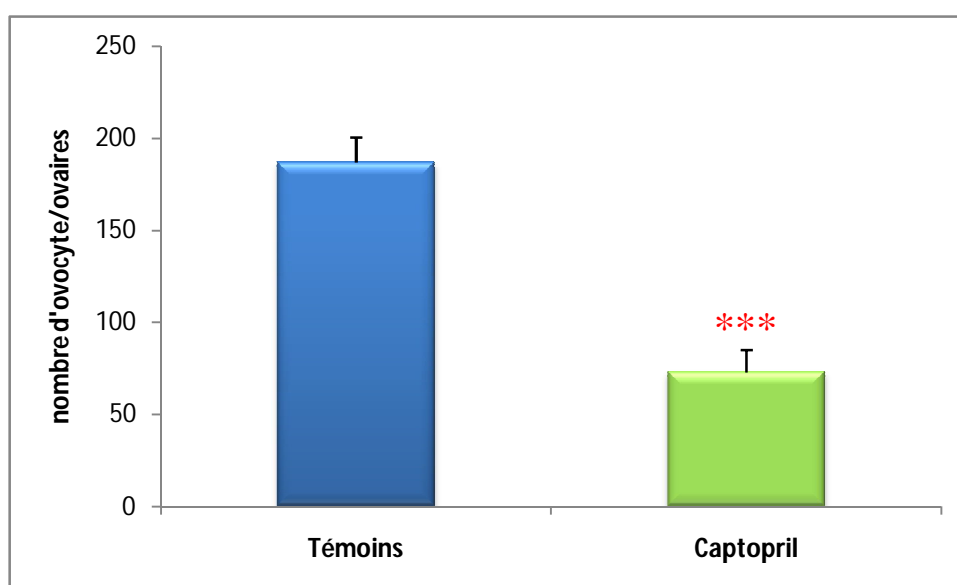


Figure 23 : Effet *in vivo* du captopril ($\mu\text{g}/2\text{ml}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires. ($m \pm s$, $n=6$, *** : $p<0,001$).

L'analyse statistique révèle un effet hautement significatif ($p=0,000$) sur la longueur et très significatif ($p=0,003$) sur la largeur de l'ovocyte basal ainsi que sur le volume des ovocytes basaux par rapport aux témoins (Tab. 25, Fig. 24).

Tableau 25: Effet *in vivo* du captopril (10 μ g/2 μ l d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm s$, n=6).

| Traitement | Longueur (μ m) | Largeur (μ m) |
|------------|---------------------|---------------------|
| Témoins | 431,44 \pm 6,39 | 297,15 \pm 6,37 a |
| Captopril | 317,10 \pm 7,00 | 237,10 \pm 3,40 b |

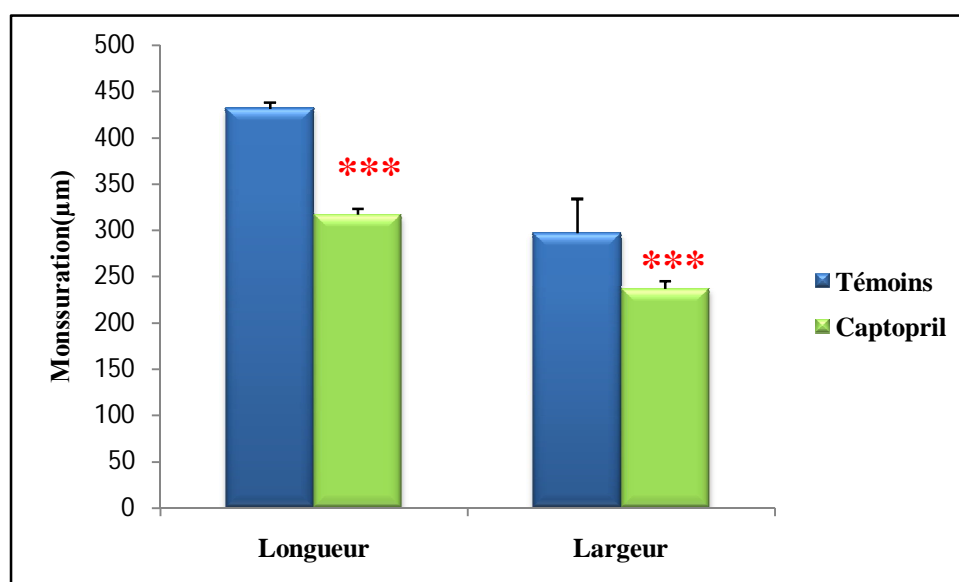


Figure 24 : Effet *in vivo* du captopril (10 μ g/2 μ l d'acétone) administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm s$, n=6, *** : $p < 0,001$).

La comparaison des valeurs moyennes obtenues dans les séries traitées révèle que le captopril provoque une réduction hautement significative ($p=0,000$) dans le volume de l'ovocyte basal (Tab. 26, Fig. 25).

Tableau 26: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le volume (mm³) de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± s, n=6).

| Traitement | Volume (mm ³) |
|------------|---------------------------|
| Témoins | 0,015 ± 0,0057 a |
| Captopril | 0,007 ± 0,0011 b |

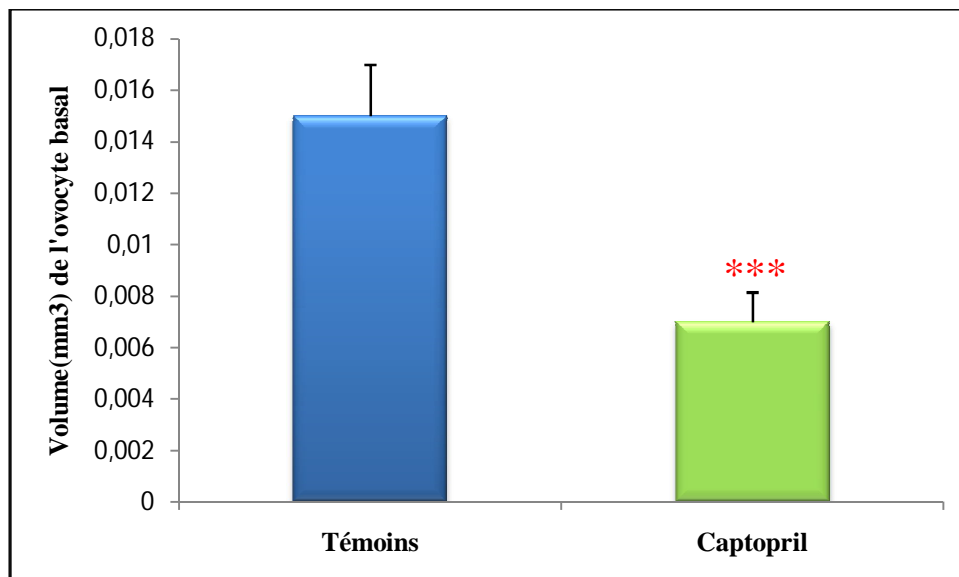


Figure 25 : Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le volume de l'ovocyte basal (mm³) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6, *** : p<0,001).

2.2. Effet du captopril sur l'épaisseur du chorion

Les observations au microscope photonique des coupes semi-fines, réalisées selon la technique de microscopie électronique à transmission, ont permis de mesurer l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux des femelle témoins et traitées (Fig. 26). Le captopril, réduit de manière hautement significative (p=0, 000) l'épaisseur du chorion chez les traitées

comparativement aux témoins. En effet, l'épaisseur passe de $2,89 \pm 0,22 \mu\text{m}$ chez les témoins à $1,29 \pm 0,23 \mu\text{m}$ chez les femelles traitées avec le captopril (Tab. 27, Fig. 27).

Tableau 27: Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, $n=6$).

| Traitement | Epaisseur du chorion (μm) |
|------------|--|
| Témoins | $2,89 \pm 0,22$ a |
| Captopril | $1,29 \pm 0,23$ b |

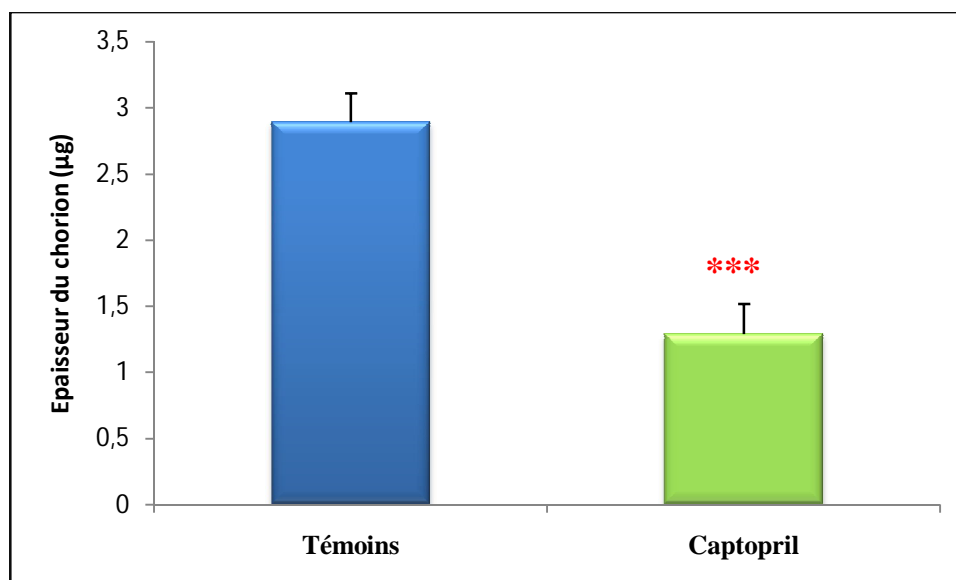


Figure 27 : Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal (μm) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, $n=6$, *** : $p<0,001$).

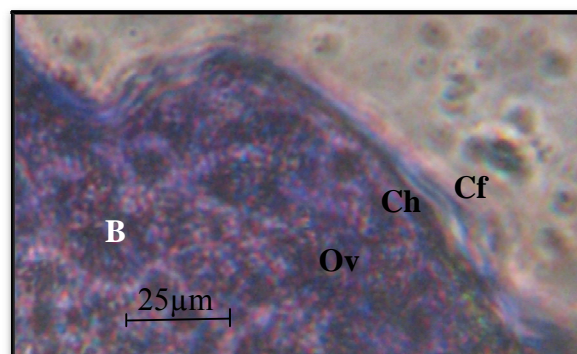
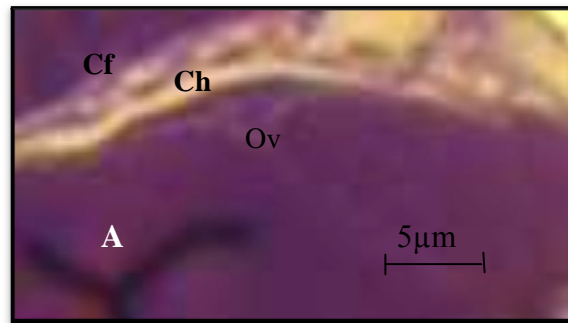


Figure 26: Structure semi fine de l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux d'*E.kuehniella*. Témoins (A) (x489) et traitées avec le captopril (B) (x366) (Ch : Chorion, Cf : Cellule folliculaire, Ov : Ovocyte).

2. 3. Effet du captopril sur les taux des ecdystéroïdes ovariens

La quantité des ecdystéroïdes ovariens des témoins et traitées a été déterminée à partir d'une courbe de référence réalisée avec des solutions standards d'ecdysone (Tab. 28, Fig. 28).

Tableau 28 : Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E).

| 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 |

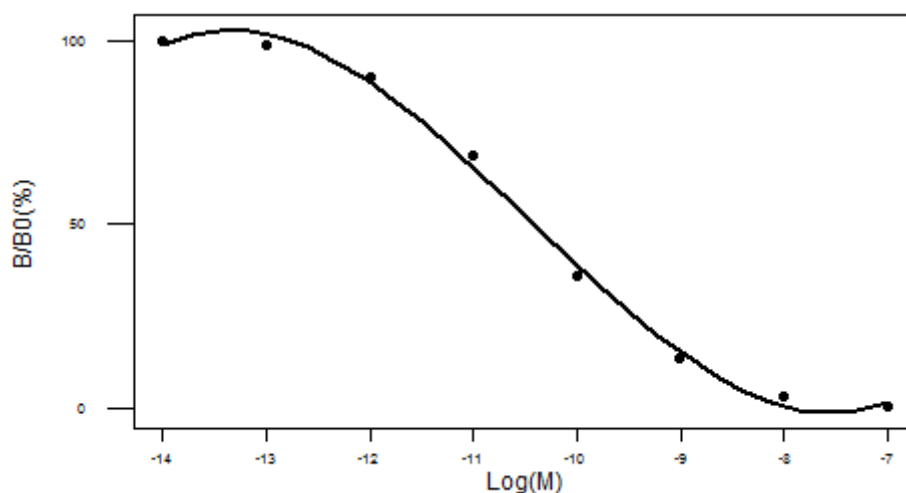


Figure 28: Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E).

Chez les témoins, le taux des ecdystéroïdes ovariens est de $15,66 \pm 0,94$ pg équivalent E/mg de tissu ovarien mesuré à l'émergence adulte (<8h). Ce taux augmente significativement ($p=0,001$) après traitement des chrysalides femelles avec le captopril à $32,89 \pm 2,70$ pg equiv.E/ mg de tissu ovarien (Tab. 29, Fig. 29).

Tableau 29: Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des ecdystéroïdes ovarien exprimé en pg équivalent E/ mg de tissu ovarien (μm) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, $n=6$).

| Traitement | Taux des ecdystéroïdes libres |
|------------|-------------------------------|
| Témoins | $15,66 \pm 0,94$ a |
| Captopril | $32,89 \pm 2,70$ b |

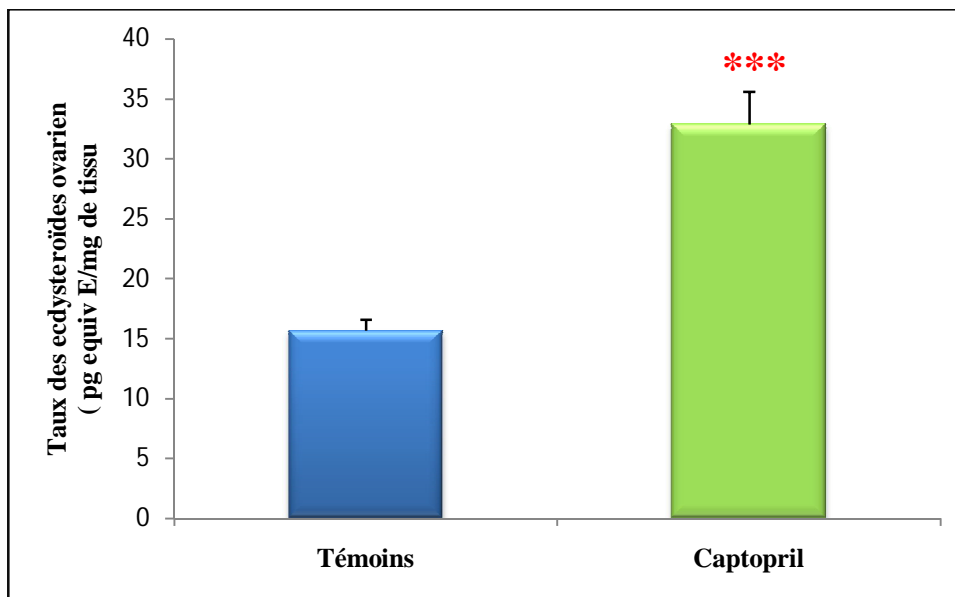


Figure 29: Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des ecdystéroïdes ovarien exprimé en pg équivalent E/ mg de tissu ovarien (μm) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, $n=6$, *** : $p<0,001$).

2. 4. Effet du captopril sur la composition biochimique des ovaires

Le traitement a été réalisé à l'exuviation nymphale et les ovaires ont été prélevés à l'émergence adulte (<8h).

2.4.1. Effet du captopril sur le taux des acides nucléiques ovariens

La détermination des quantités d'ADN et d'ARN ont été réalisées à partir des courbes de références exprimant l'absorbance en fonction des quantités d'ADN (Tab. 30, Fig.30) et d'ARN (Tab. 32, Fig. 31).

2.4.1.1. Effet du captopril sur le taux d'ADN

Concernant les taux d'ADN les résultats obtenus montrent une différence significative ($p=0,02$) entre les témoins et traités (Tab. 31, Fig.31).

Tableau 30: Gamme d'étalonnage des quantités d'ADN et leurs absorbances correspondantes.

| Quantité (µg) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance | 0,058 | 0,125 | 0,171 | 0,214 | 0,261 |

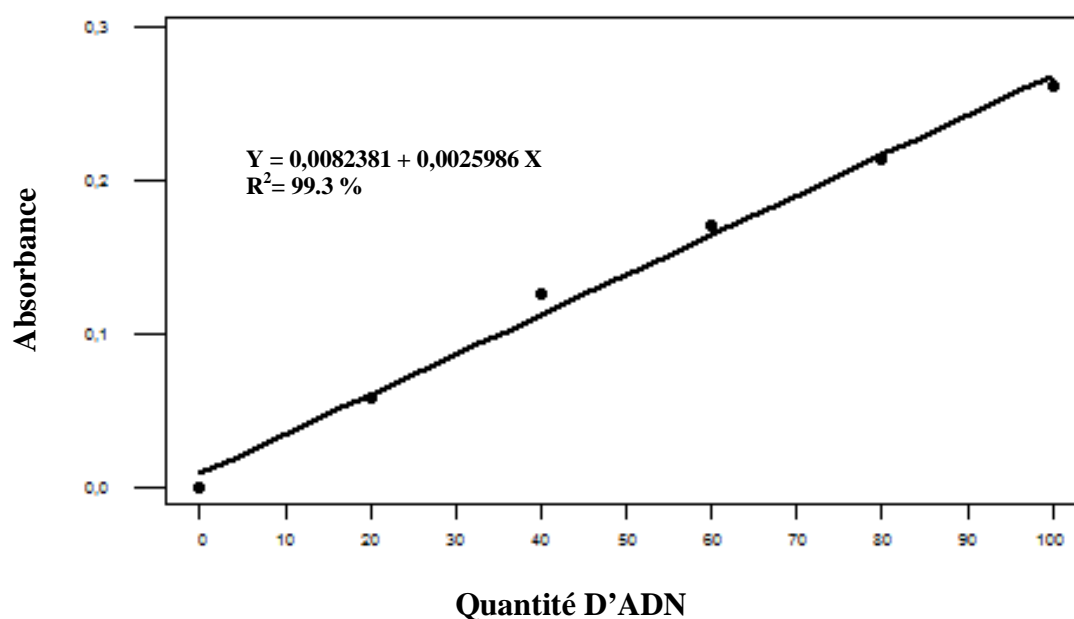


Figure 30 : Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ADN.

Tableau 31: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux d'ADN ovarien (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6).

| Traitement | Taux d'ADN (µg/ mg) |
|------------|---------------------|
| Témoins | 4,85 ± 0,30 a |
| Captopril | 3,69 ± 0,19 b |

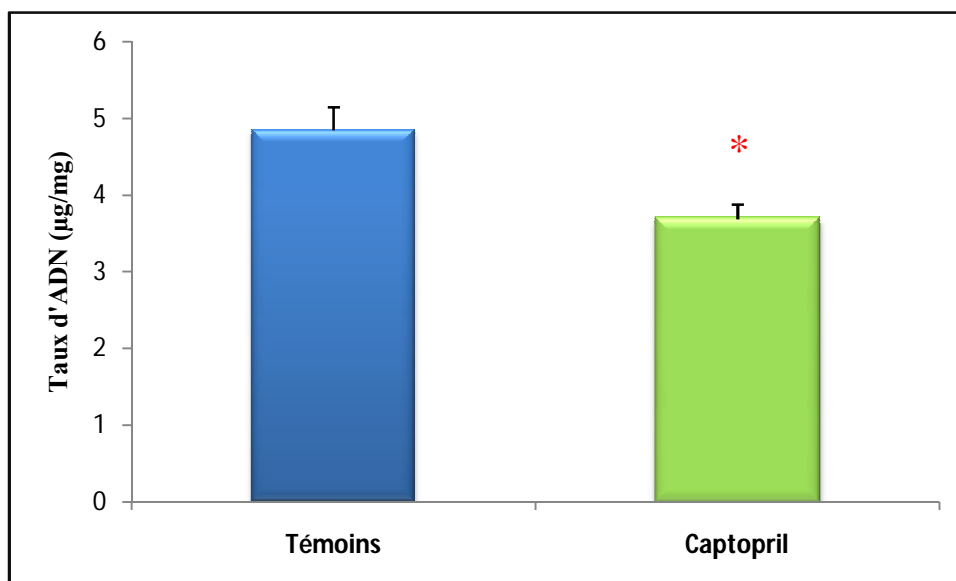


Figure 31: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux d'ADN ovarien (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n=6, * : p<0,05).

2.4.1.2. Effet du captopril sur le taux d'ARN

Le captopril entraîne une réduction hautement significatives dans le taux d'ARN ovarien ($p=0,000$) (Tab. 33, Fig. 33).

Tableau 32 : Gamme d'étalonnage des quantités d'ARN et leurs absorbances correspondantes.

| Quantité (µg) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance | 0,070 | 0,165 | 0,274 | 0,339 | 0,413 |

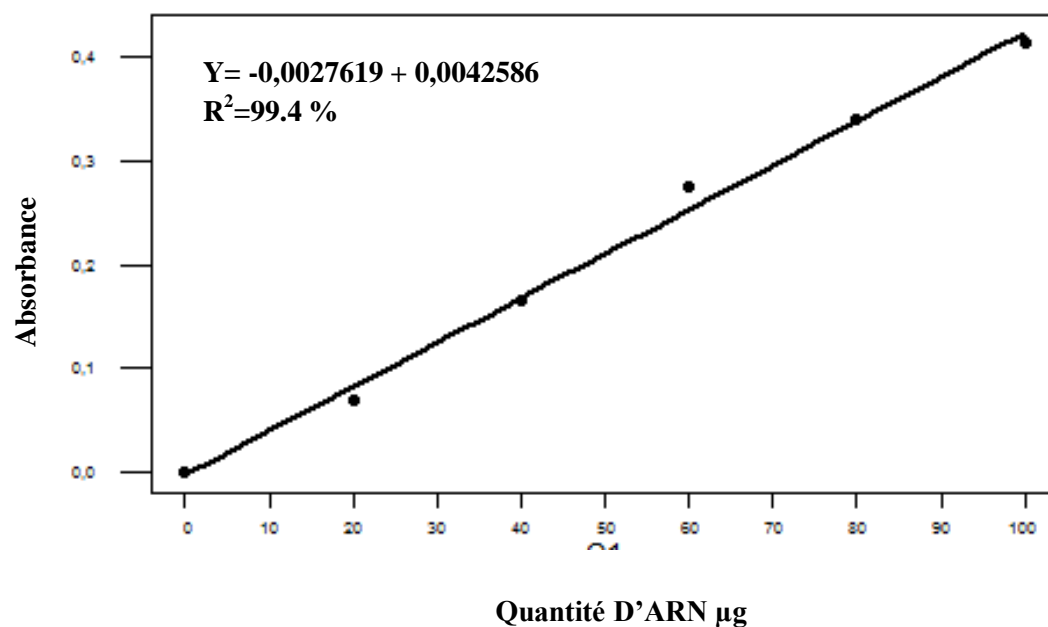


Figure 32: Courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des quantités d'ARN.

Tableau 33: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux d'ARN ovarien (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6).

| Traitement | Taux d'ARN (µg /mg) |
|------------|---------------------|
| Témoins | 12,76± 0,38 a |
| Captopril | 8,91 ± 0,37 b |

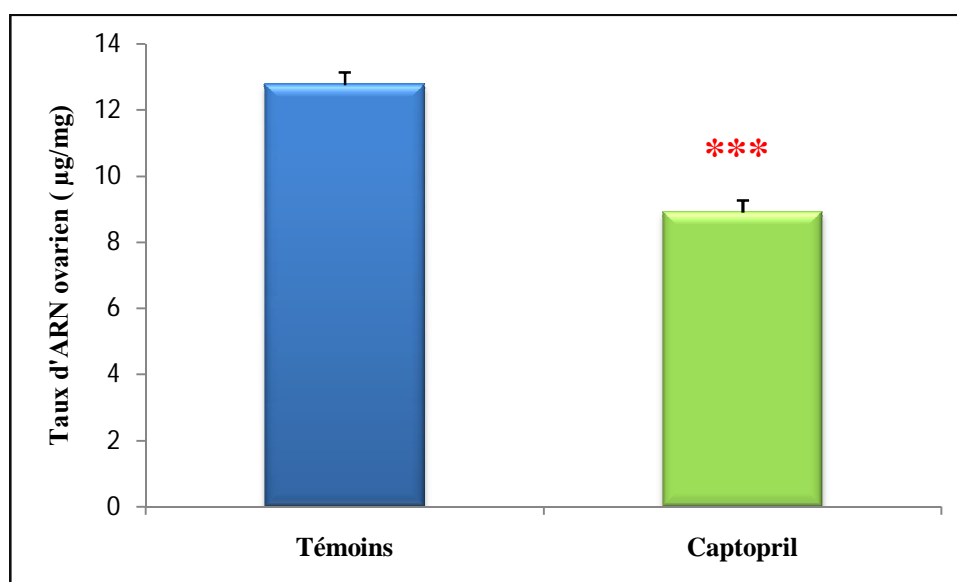


Figure 33: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux d'ARN ovarien (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, *** : $p < 0,001$).

2.4.2. Effet du captopril sur le taux des protéines ovariennes

La quantification des protéines dans les ovaires des adultes nouvellement émergées a été réalisée à partir d'une courbe de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard (Tab. 34, Fig. 34).

Tableau 34: Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard.

| Quantité des protéines (µg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|-----------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance | 0 | 0,276 | 0,487 | 0,767 | 0,933 | 1,016 |

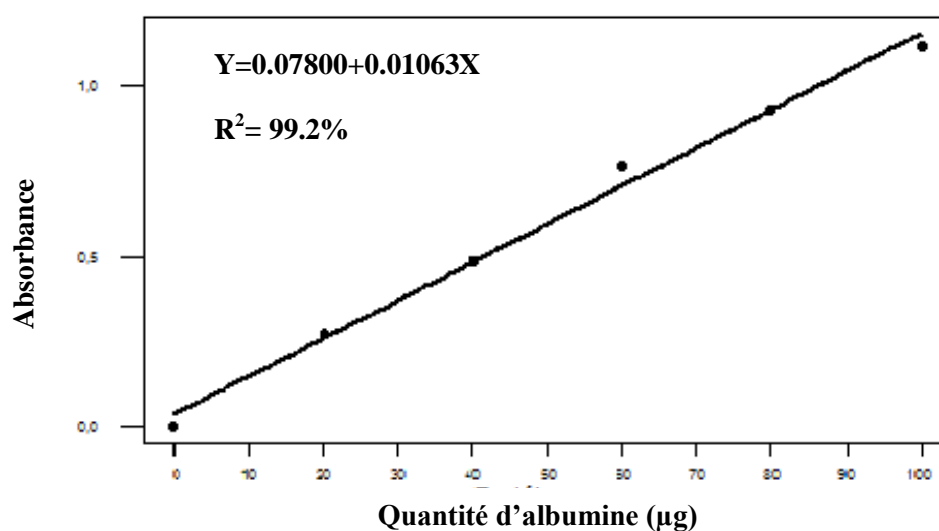


Figure 34 : Dosage des protéines ovariennes, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg) (BSA).

Une diminution hautement significative ($p= 0.000$) est enregistrée chez les femelles traitées par comparaison avec les témoins. En effet, chez les témoins on enregistre un taux protéique de $28,72 \pm 1,06$ (µg/mg) qui sera réduite à $10,02 \pm 0,64$ (µg/mg) chez les femelles traitées (Tab. 35, Fig. 35).

Tableau 35: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6).

| Traitement | Taux des protéines ovariennes (µg/mg) |
|------------|--|
| Témoins | 28,72 ± 1,06 a |
| Captopril | 10,02 ± 0,64 b |

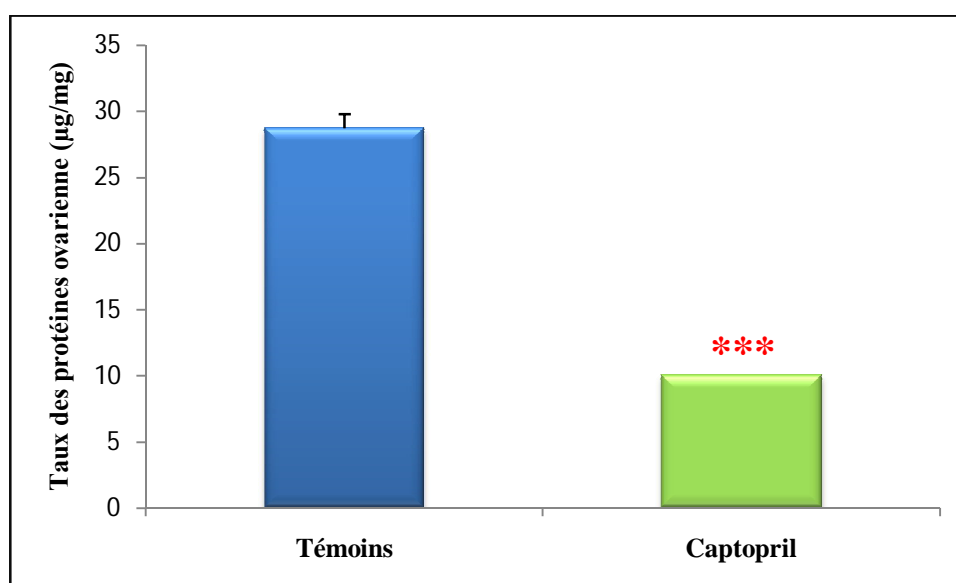


Figure 35: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, *** : $p < 0,001$).

2.4.3. Effet du captopril sur la qualité des protéines ovariennes

L'étude électrophorétique sur PAGE-SDS a été menée sur la qualité des protéines ovariennes des adultes d'*E. kuehniella* témoins et traitées *in vivo* par le captopril par application topique à l'émergence des chrysalides.

La courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (PM) des protéines standards en fonction de la mobilité relative (Rf) a été établie avec cinq protéines standards à poids moléculaire connue (Tab. 36, Fig. 36).

L'étude électrophorétique sur PAGE-SDS (12%), met en évidence 12 fractions protéiques ovariennes chez les femelles témoins. Ces fractions sont caractérisées par leur mobilité relative (RF) et leur poids moléculaires (PM) qui varient de 29,04 kDa à 233,88 kDa.

La comparaison des profils électrophorétique révèle une différence entre les témoins et les traitées. En effet il y'a une réduction de trois fractions chez les traitées, se sont les fractions 3, 5 et 10 dont les poids moléculaires sont respectivement 206,06 kDa, 150,31 kDa et 42,46 kDa (Tab. 37, Fig. 37).

Tableau 36: Poids moléculaires (PM) en kilo Da et la mobilité relative (RF) des protéines standards (a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : albumine bovine, 75 kDa, d : ovalbumine, 50kDa).

| Poids moléculaire (kDa) | 200 | 100 | 75 | 50 |
|-------------------------|-------|-------|--------|-------|
| Log PM | 2,39 | 2,17 | 1.87 | 1,69 |
| Rayon frontal | 0.166 | 0,309 | 0 ,642 | 0,738 |

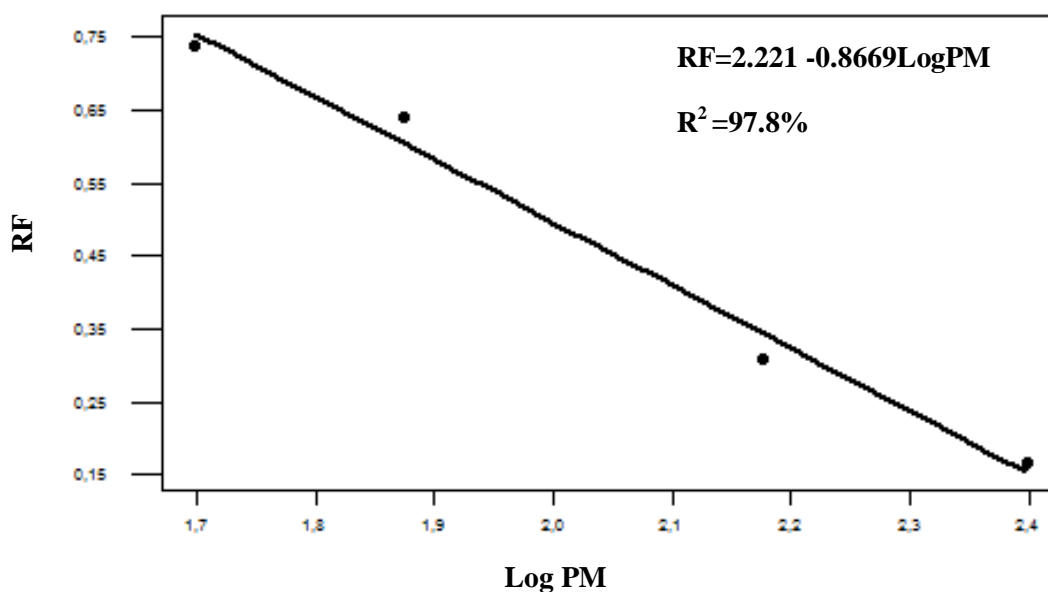


Figure 36 : Séparation électrophorétique des protéines ovariennes : Courbe de référence exprimant le rayon frontal (Rf) en fonction du logarithme décimal du Poids moléculaire (kDa) des protéines standards (a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : albumine bovine, 75 kDa, d : ovalbumine, 50kDa).

Tableau 37. Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella*. Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM kDa) des différentes fractions protéiques dans les ovaires à l'émergence adulte (<8h).

| Traitement | Témoins | | Captopril | |
|---------------------|---------|---------|-----------|---------|
| Nombre de fractions | Rf | PM | Rf | PM |
| 1 | 0.1666 | 233 ,88 | 0.1666 | 233 ,88 |
| 2 | 0.1904 | 219,78 | 0.1904 | 219,78 |
| 3 | 0.2142 | 206,06 | - | - |
| 4 | 0.2619 | 181,55 | 0.2619 | 181,55 |
| 5 | 0.3333 | 150,31 | - | - |
| 6 | 0.4047 | 124,45 | 0.4047 | 124,45 |
| 7 | 0.5000 | 96,60 | 0.5000 | 96,60 |
| 8 | 0.5952 | 76,03 | 0.5952 | 76,03 |
| 9 | 0.6190 | 70,30 | 0.6190 | 70,30 |
| 10 | 0.809 | 42 ,46 | - | - |
| 11 | 0.880 | 35 ,07 | 0.880 | 35 ,07 |
| 12 | 0.952 | 29,04 | 0.952 | 29,04 |

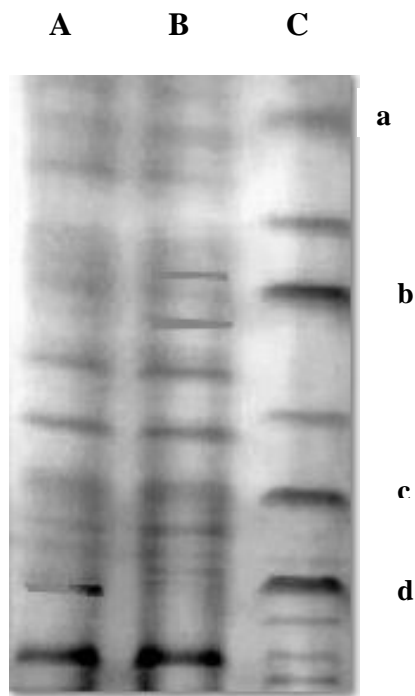


Figure 37 : Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines ovariennes des femelles adultes d'*E.kuehniella* témoins et traitées avec le captopril (A), témoins (B) à l'émergence adulte (<8h). comparée à celle des protéines marqueurs (C : a : myosine, 200 kDa ; b : phosphorylase, 100kDa, c : albumine bovine, 75 kDa, d : ovalbumine, 50kDa).

2. 4. 4. Effet du captopril sur le taux des glucides ovariens

La quantification des glucides ovariens a été réalisée à partir d'une courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité des glucides (μg) obtenue par la gamme d'étalonnage (Tab. 38, Fig. 38).

Tableau 38: Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de glucose standard (µg).

| Quantité de glucose (µg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|--------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance | 0 | 0,200 | 0,418 | 0,688 | 0,820 | 1,069 |

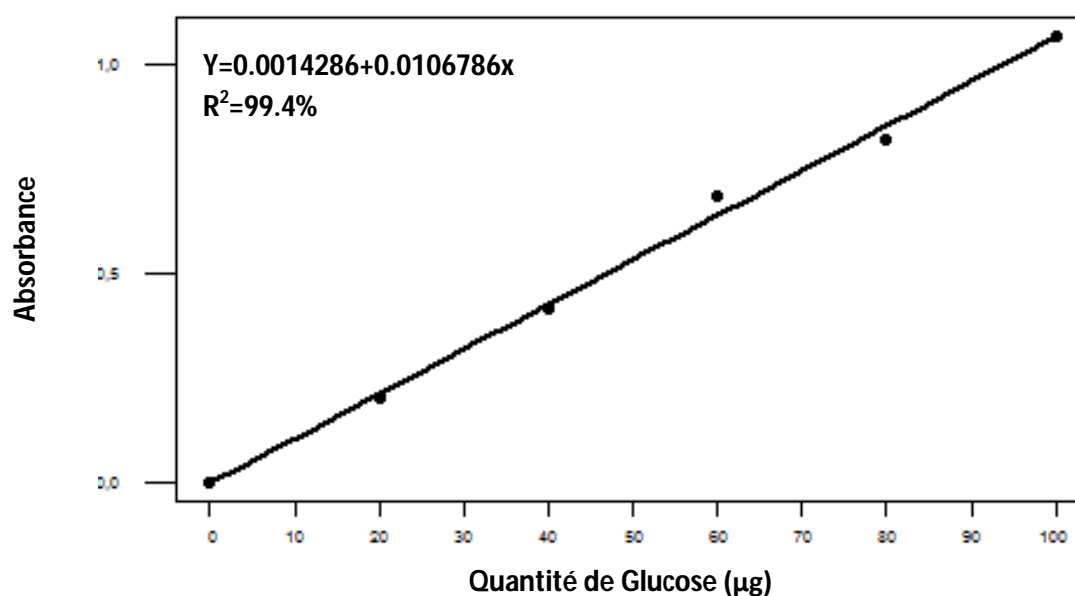


Figure 38: Dosage des glucides ovariens, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité glucose standard (µg).

Les taux des glucides ovariens enregistrés après traitement avec le captopril révèlent une diminution hautement significative ($p=0,000$) par apport aux témoins (Tab. 39, Fig. 39).

Tableau 39: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des glucides ovariens (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6).

| Traitement | Taux des glucides ovariens (µg/mg) |
|------------|------------------------------------|
| Témoins | $30,61 \pm 0,38$ a |
| Captopril | $18,88 \pm 1,10$ b |

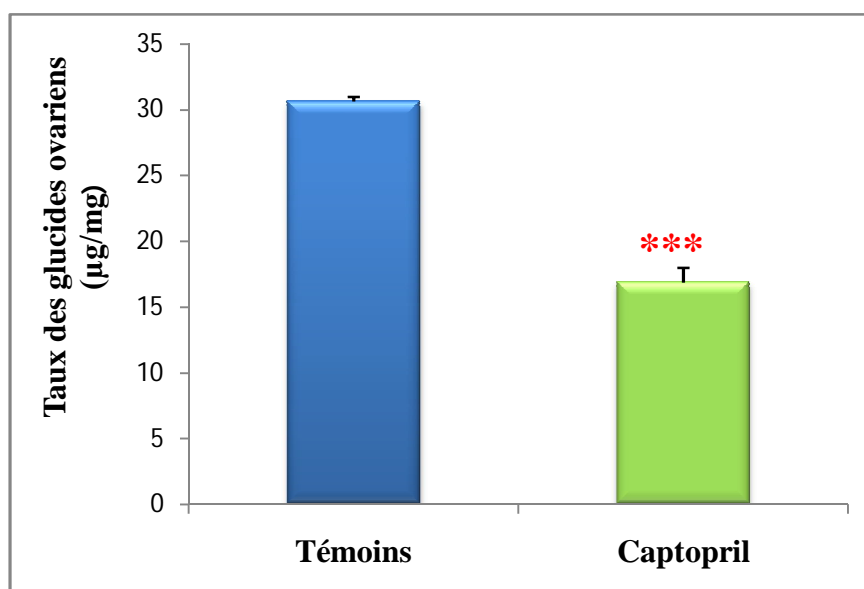


Figure 39: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des glucides ovariens (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, *** : $p < 0,001$).

2.4.5. Effet du captopril sur le taux des lipides ovariens

La quantité des taux des lipides a été faite à partir d'une droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité des lipides (huile de table) (μg), (Tab. 40, Fig. 40).

Tableau 40: Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipides.

| Quantité de lipides (μg) | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
|---------------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbances | 0 | 0,110 | 0,198 | 0,306 | 0,383 | 0,490 |

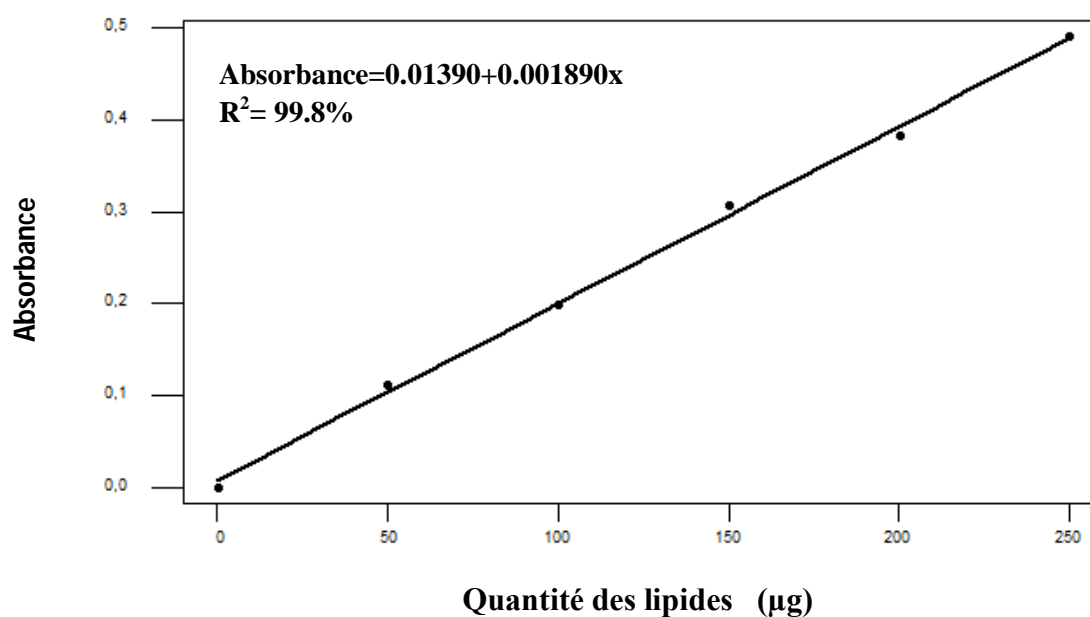


Figure 40: Dosage des lipides, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipides (μg).

Le captopril diminue également le taux des lipides ovarien de manière très significative ($p = 0,004$) (Tab. 41, Fig. 41).

Tableau 41: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des lipides ovariens (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6).

| Traitement | Taux des lipides ovariens (µg/mg) |
|------------|-----------------------------------|
| Témoins | 71,09 ± 4,21 a |
| Captopril | 47,21 ± 4,19 b |

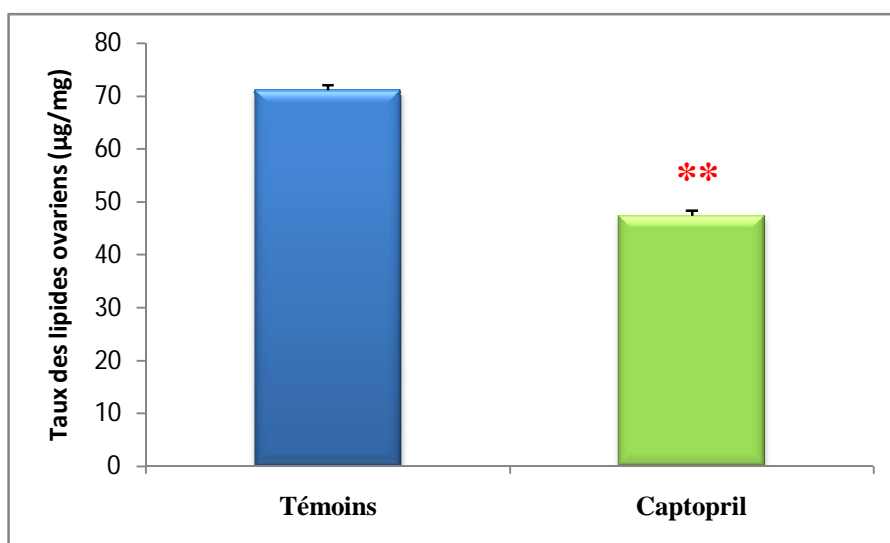


Figure 41: Effet *in vivo* du Captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des lipides ovariens (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, n=6, ** : $p < 0,01$).

2.5. Effet du captopril sur le potentiel reproducteur

Un suivi régulier des couples permet de déterminer les périodes de préoviposition et d'oviposition, le nombre d'œufs pondus et le pourcentage d'éclosion des œufs.

Dans nos conditions expérimentales (température 27°C, humidité relative à 80%), la ponte débute à $1,01 \pm 0,017$ jour après l'émergence des adultes et se poursuit jusqu'à $3,50 \pm 0,30$ jours chez les femelles témoins. Le captopril n'affecte pas la période de préoviposition mais il réduit significativement ($p=0,01$) la période d'oviposition (Tab. 42, Fig. 42).

Tableau 42 : Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'émergence des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition ($m \pm s$, $n=6$).

| Traitement | Témoin | Captopril |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| Période de préoviposition | $1,01 \pm 0,01$ a | $1,19 \pm 17$ a |
| Période d'oviposition | $3,5 \pm 0,17$ a | $3,1 \pm 0,14$ b |

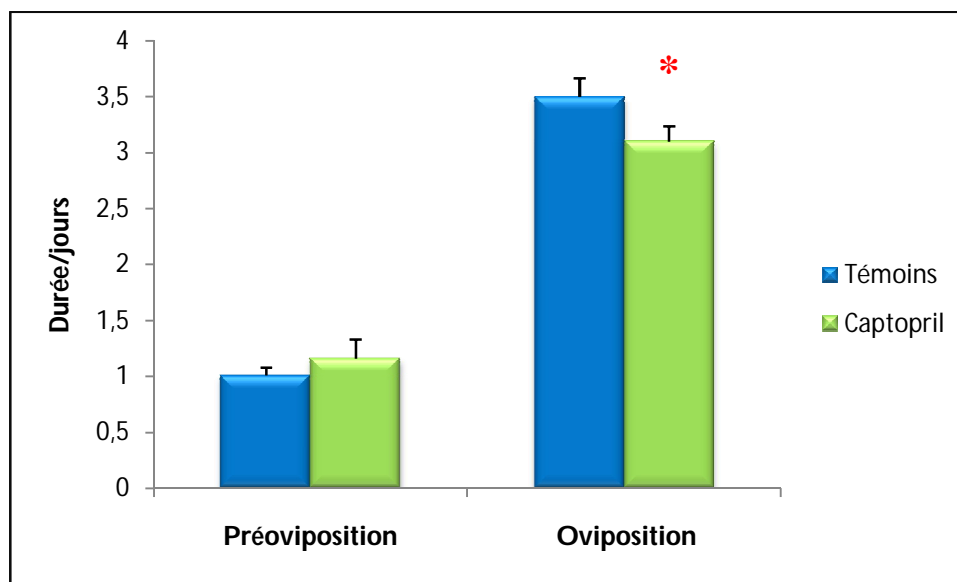


Figure 42: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition. ($m \pm s$, $n=6$, * : $p<0,05$).

Le nombre d'œufs pondus par une femelle témoin est de $165,00 \pm 2,16$ pendant toute la période d'oviposition. Ce nombre est très significativement ($p= 0,001$) affecté par le captopril puisqu'il atteint seulement $155,70 \pm 1,1$ œufs /femelle (Tab.43, Fig. 43), ainsi que le pourcentage d'éclosion ($p=0,000$) (Tab. 44, Fig. 44).

Tableau 43 : Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'émergence des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sur la fécondité des femelles (nombre d'œufs) ($m \pm s$, $n=6$).

| Traitement | Fécondité (œufs /femelle) |
|------------|---------------------------|
| Témoins | $165,00 \pm 2,16$ a |
| Captopril | $155,70 \pm 1,10$ b |

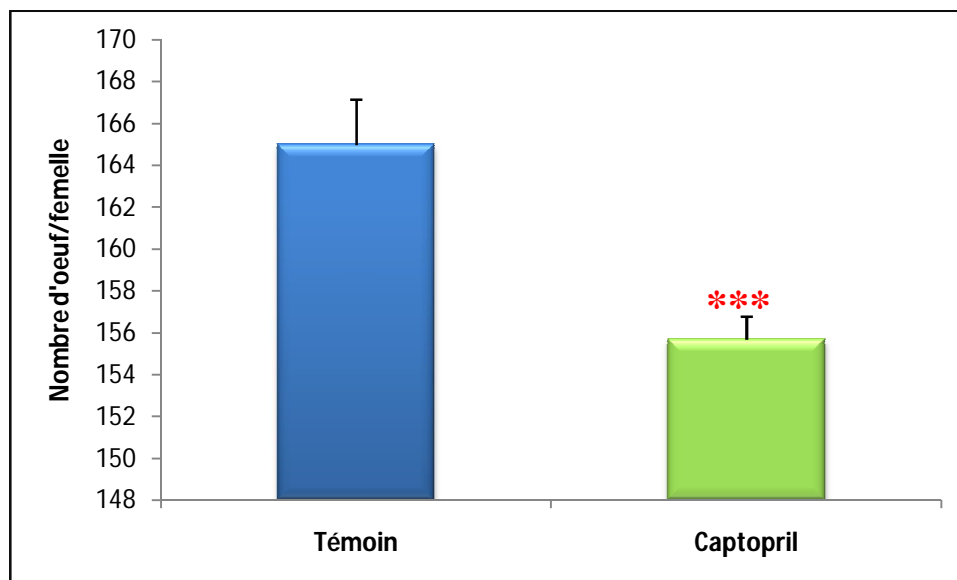


Figure 43: Effet *in vivo* du captopril ($10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur la fécondité (nombre d'œufs/femelle) ($m \pm s$, $n=6$, *** : $p<0,001$).

Tableau 44 : Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'émergence des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sur la viabilité des œufs (%) ($m \pm s$, n=6).

| Traitement | Fécondité (œufs /femelle) |
|------------|---------------------------|
| Témoins | 70,18 \pm 0,92 a |
| Captopril | 61,04 \pm 0,45 b |

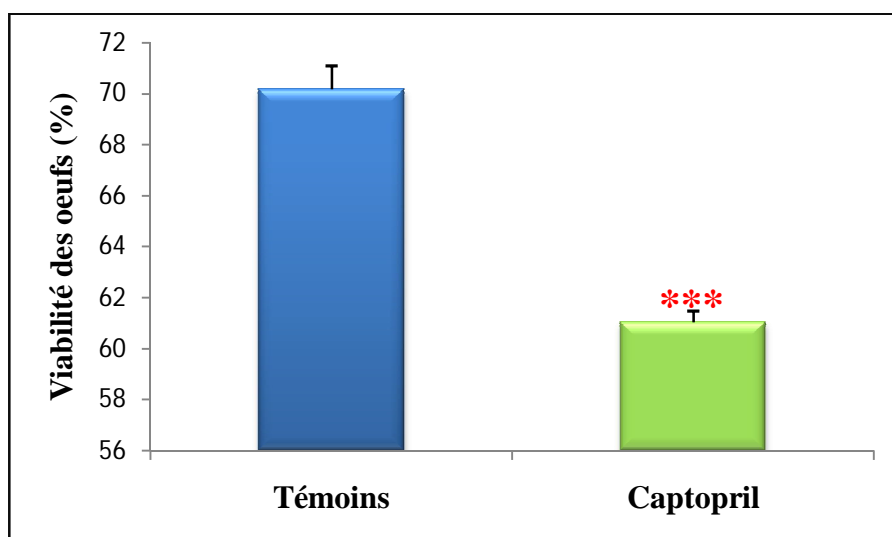


Figure 44: Effet *in vivo* du captopril (10µg/2µl d'acétone), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur la viabilité des œufs (%) ($m \pm s$, n=6, *** : $p < 0,001$).

3. DISCUSSION

3. 1. Effet sur la morphométrie des ovaires

Le potentiel reproducteur des insectes reste un des facteurs les plus importants de leur indéniable pullulation et l'étude de la reproduction est nécessaire pour toute approche raisonnée visant une diminution sensible des dégâts causés par les déprédateurs (Soltani-Mazouni & Soltani, 1995).

Le traitement par application topique des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* nouvellement exuviées avec le captopril perturbe l'ovogénèse en provoquant une réduction du poids frais des ovaires et du nombre d'ovocytes. Le captopril réduit également la taille de l'ovocyte basal (longueur, largeur et volume) ; ces résultats sont en accord avec ceux trouvés après l'application topique de la même molécule à des adultes nouvellement émergées de *T. molitor* (Soltani- Mazouni *et al.*, 2007) .

Des résultats similaires ont été rapportés avec de nombreuses molécules insecticides comme les régulateurs de croissance des insectes. En effet, le tebufenozide, le halophenozide et le methoxyphenozide, insecticides faisant partie de la classe des mimétiques de l'hormone de mue, réduisent le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocyte par paire d'ovaire et la longueur de l'ovocyte basal chez *E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005 ; Khebeb *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). L'halofenozide, affecte la morphométrie des ovaires chez *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001 ; Taibi 2007) et chez *Blatella germanica* (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a). Le dibenzoylhydrazine, un agoniste des ecdystéroïdes provoque une perturbation du développement des ovaires chez *Plodia interpunctella* et *T.molitor* (Aller & Ramsay, 1988 ; Salem *et al.*, 1997 ; Hami *et al.*, 2005).

Le pyriproxyfène, un analogue l'HJ, inhibe la croissance des ovaires et entraîne l'immaturité de l'oothèque chez *Blatella germanica* (Kawada, 1988) ; il provoque une diminution du nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et cause une augmentation du volume de l'ovocyte basal chez *T. molitor* (Lakbar, 1999). De la même manière, le méthoprène, un autre analogue de l'HJ, appliqué topiquement aux femelles de *B. germanica* réduit significativement le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et augmente Le volume de l'ovocyte basal (Maiza *et al.*, 2004).

L'application du KK-42, un dérivé de l'imidazole inhibiteur de la biosynthèse de l'hormone de mue, réduit le nombre d'ovocytes et la longueur de l'ovocyte basal chez *T. molitor* (Amrani *et al.*, 2004). Chez *Blatella orientalis*, l'application topique de l'azadiractine a les mêmes effets morphométriques (Tine *et al.*, 2011). Des effets similaires sur la morphométrie ont été obtenus chez *Blatella germanica* avec un insecticide inorganique, l'acide borique, administré par voie orale (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009b) mais aussi, par injection (Habes *et al.*, 2013). Un blocage de l'ovogénèse et une dégénérescence des cellules folliculaires ont été rapportés chez *Anopheles stephensi* un diptère traité au neemAzal une formulation commerciale d'extrait de neem (Lucantoni *et al.*, 2006).

La diminution du nombre d'ovocytes et le blocage du développement des ovocytes chez différents ordres d'insectes sous l'effet de divers groupes de régulateurs de croissance, notamment, les agonistes et antagonistes de la 20E et de la JH, pourrait s'expliquer par des interférences de ces molécules avec le processus de régulation des taux d'hormone juvénile ou des ecdystéroïdes responsables de la stimulation de la vitellogénèse et du développement ovarien. En effet, les ecdystéroïdes permettent la réinitiation méiotique des ovocytes (Lanot *et al.*, 1987) et l'ovulation (Ruegg *et al.*, 1992), alors que l'HJ contrôle la vitellogénèse mais également la transcription des gènes nécessaires à ce processus (Hoffman & Sorge, 1996 ; Hoffman *et al.*, 1999).

3. 2. Effet sur le chorion

Les femelles adultes d'*E. kuehniella* débutent leur vitellogénèse à 4 jours après la mue nymphale et la choriogénèse commence deux à six heures après l'exuviation adulte (Zimowska *et al.*, 1995 ; Beckemeyer & Shirk, 2004). La morphogénèse, la structure des enveloppes de l'œuf ainsi que le développement de la couche cristalline ont été étudiés chez *D. melanogaster* (Margaritis, 1985a ; Margaritis & Mazzini, 1989 ; Trougakos & Margaritis, 2002) et chez *Hygus lineolaris* (Peter *et al.*, 2002). Au cours de la choriogénèse le dépôt successif de l'enveloppe vitelline, l'endochorion et l'exochorion par les cellules folliculaires nécessite la présence de l'hormone de mue ce qui a été mis en évidence *in vitro* chez *B. germanica* (Bellés *et al.*, 1993). Chez certains lépidoptères, la sécrétion des enveloppes protectrices nécessite l'action conjointe de deux hormones, l'hormone de mue et l'HJ (Cassier *et al.*, 1997 ; Kidokoro *et al.*, 2006).

L'intervention des ecdystéroïdes est directe ou indirecte dans le contrôle des différents aspects de développement des ovaires tels que, la différenciation des oocytes dans les ovocytes

et les cellules nourricières, expulsion de calices des capsules de l'ovaire et la synthèse de la vitellogénine. Au cours du stade nymphal des Lépidoptères, les ovocytes accumulent le vitellus à partir d'un précurseur hémolymphatique que le corps gras, et les cellules de l'épithélium folliculaire synthétisent des composants supplémentaires du vitellus ainsi que la membrane vitelline et le chorion (Telfer, 2009).

Les résultats obtenus dans notre expérimentation menée *in vivo* sur les ovaires d'*E. kuhniella* montrent que le captopril réduit significativement l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux. Contrairement à ces résultats le captopril administré par application topique à des adultes nouvellement émergés de *T. molitor* à la dose de 10µg par femelle n'a aucun effet significatif sur l'épaisseur du chorion de l'ovocyte basal chez *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2007). Les travaux de Darren *et al.*, (2003) sur *Caenorhabditis elegans*, et Siviter *et al.*, (2002) sur *D. melanogaster* montrent l'implication de l'ECA dans le développement des embryons .

Par ailleurs, les données obtenues par Hami *et al.*, (2005) montrent que le tebufenozide et le holofenozide réduisent significativement l'épaisseur du chorion chez *E. kuehniella*. Taibi, 2007 montre que le holofenozide réduit l'épaisseur du chorion chez les femelles adultes de *T. molitor*. Un antagoniste des ecdystéroïdes le KK-42 a été testé *in vivo* sur des ovocytes de *T. molitor*, il réduit significativement l'épaisseur du chorion sans affecter sa structure fine (Taibi, 2000 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2000 a et b ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2001). Le diflubenzuron (DFB), paraît agir sur l'incorporation de précurseurs vitellogéniques dans les ovocytes au cours de leur maturation et sur la synthèse et l'épaisseur du chorion (Soltani & Soltani-Mazouni, 1997). Au cours de la choriogénèse, les dépôts successifs des enveloppes vitellines, l'endochorion et l'exochorion par les cellules folliculaires nécessitent la présence de la l'hormone de mue, ce qui a été clairement établie, chez *B. gemanica* (Bellés *et al.*, 1993).

Dans certains cas, comme chez les Lépidoptères, la sécrétion des enveloppes de l'œuf nécessite l'action conjointe de l'hormone juvénile et l'hormone de mue (Cassier *et al.*, 1997, Kidokora *et al.*, 2006). Les ecdystéroïdes interviennent directement ou indirectement dans le contrôle des différents aspects de développement des ovaires tels que, la différenciation des ovocytes dans les ovocytes et les cellules nourricières, expulsion de calices des capsules de l'ovaire et la synthèse de la vitellogénine. Au cours du stade nymphal des lépidoptères, les ovocytes accumulent et organisent le vitellus à partir d'un précurseur hémolymphatique et le

corps gras, tandis que les cellules de l'épithélium folliculaires synthétisent des composants supplémentaires du vitellus ainsi que la membrane vitelline et le chorion (Telfer, 2009).

On peut donc penser que la diminution de l'épaisseur du chorion observée dans les ovocytes basaux prélevés des femelles adultes nouvellement émergées traitées est probablement liée à des interactions endocrines du captopril avec les ecdystéroïdes ovariens au cours de la choriogénèse.

3. 3. Effet sur le taux des ecdystéroïdes ovariens

De nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré l'implication de l'HJ et de l'E ainsi que certaines neurohormones dans le contrôle de la physiologie de la reproduction, la vitellogénèse, la spermatogénèse et le développement des glandes accessoires (Raikhel & Dhadialla, 1992 ; Bellès, 2005 ; Bellès & Maestro, 2005). Par ailleurs, les cellules de l'épithélium folliculaire des ovaires synthétisent des ecdystéroïdes, qui jouent un rôle important dans le développement des ovaires. Ils sont impliqués dans le contrôle de la réinitiation méiotique dans l'ovocyte (Yamashita & Suzuki, 1991), la synthèse de la vitellogénine, l'augmentation de la compétence des cellules folliculaires à incorporer cette protéine dans les ovocytes en développement, (Ramaswamy *et al.*, 1997), l'ovulation (Ruegg *et al.*, 1992), la spermatogénèse (Alrubeai & Gorell, 1982), l'induction de la sclérotisation des œufs par la stimulation de la formation du chorion (Sahlen, 1994 ; Lafont *et al.*, 2005) et l'inhibition de la production de l'HJ (Lanot *et al.*, 1989).

Matin *et al.*, (2001) ont prouvé que la 20E maintient l'expression des gènes de la vitellogénine dans le corps gras. Des expériences *in vitro* ont démontré que les ovaires produisent des ecdystéroïdes chez des espèces de différents ordres d'insectes comme *Schistocerca gregaria* (Rees & Issac, 1984), *Locusta migratoria* (Lagueux *et al.*, 1981), *Manduca sexta*. (Thompson *et al.*, 1987), *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 1999). Récemment il a été démontré que les ovaires et les testicules des crustacées synthétisent également des ecdystéroïdes (Styrishave *et al.*, 2008 ; Brown *et al.*, 2009).

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes réalisée dans la présente étude sur les ovaires d'*E. kuehniella*, indique une augmentation significative Dans les taux des ecdystéroïdes ovariens après traitement avec le captopril, contrairement à ces résultat la même molécules administrée à des adultes nouvellement émergés de *T. molitor* à la dose de 10µg par femelle montre une diminution dans les taux des ecdystéroïdes ovariens (Soltani-Mazouni *et al.*, 2007). D'autres inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'enalapril et lisinopril, testés *in vivo* chez *E. kuehniella* révèlent une absence d'effet sur les taux des

ecdystéroïdes ovariens. Par ailleurs, l'enalapril augmente le taux des ecdystéroïdes dans les testicules de la même espèce (Bensalem & Soltani-Mazouni, 2013).

Des régulateurs de croissance tels que le tebufenozide, le halofénoside et le méthoxyfénozide augmentent les taux des ecdystéroïdes ovariens chez *E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005 ; Soltani-Mazouni, 2012). Le traitement des adultes de *T. molitor* avec les mêmes agonistes des ecdystéroïdes, diminue la production d'ecdystéroïdes par les ovaires de 2 et 4 jours correspondant au début et à la fin de la vitellogénèse (Boukachabia *et al.*, 2003).

L'interaction ecdystéroïdes-hormone juvénile a été largement étudiée au cours des stades larvaires (Bollenbacher, 1988 ; Sakurai & Gilbert, 1990) où l'action de ces deux hormones se limite au contrôle des mues et des métamorphoses. Chez *D. melanogaster*, l'équilibre entre la concentration de la 20E et l'HJ semble jouer un rôle important dans le développement des ovocytes au cours du stade nymphal (Gilbert *et al.*, 1998; Soller *et al.*, 1999; Gruntenko & Rauschenbach, 2008). Ainsi, bien que les rôles de l'ecdysone et l'HJ aient été élucidés dans certaines étapes du développement des ovocytes, chez les insectes, la maturation ovarienne dans son ensemble demeure très complexe puisque de nombreuses interactions synergiques et inhibitrices ont lieu entre ces deux hormones et d'autres neurohormones (Bellés ; 1995 ; Hoffmann & Sorge, 1996). Chez les Lépidoptère dits à «pré-eclosion vitellogenesis » (vitellogénèse s'effectuant au stade nymphal), comme *E. kuehniella*, *B. mori*, *C. pomonella*, *P. interpunctella* et *L. dispar*, les ecdystéroïdes stimulent la vitellogénèse, mais à des concentrations bien déterminées, une forte dose de 20 E inhibe ce processus (Tsuchida *et al.*, 1987 ; Davis *et al.*, 1990).

3.4. Effet sur la composition biochimique des ovaires

L'ovocyte accumule en grande quantité les matériaux protéiques mais l'élaboration des protéines dépend de la synthèse préalable d'ARN, pour laquelle l'ADN chromosomique et nucléolaire sert de matrice. Des travaux antérieurs ont fait le point sur tous les aspects de la vitellogénèse chez les insectes (Raikhel & Dhadialla 1992; Soltani-Mazouni 1994 ; Soltani-Mazouni & Soltani 1995). Chez *T. molitor* l'épithélium folliculaire est le seul tissu à synthétiser l'ADN (Schlottman & Bonhag, 1956; Ulmann, 1973). Selon Berry (1982) presque tout l'ARN stocké dans les ovocytes méroïstiques, dérive des cellules nourricières alors que le génome de l'ovocyte est inactivé. Une étude quantitative des synthèses d'ARN nucléaire, réalisée par comptage direct des grains d'argent dans l'ovaire de *T. molitor*, révèle au niveau du noyau de l'ovocyte un maximum d'incorporation du précurseur vers la fin de la prévitellogénèse et un minimum pendant le dépôt du vitellus tandis qu'au niveau des cellules

nourricières l'intensité des synthèses est maximale chez les animaux en fin de vitellogénèse (Chaminade & Laverdure 1976).

Chez les lépidoptères et notamment *E. kuehniella*, le processus de la vitellogénèse se déroule durant le stade nymphal. Ainsi, à l'émergence des papillons la vitellogénèse est terminée. Nos résultats mettent en évidence un effet traitement significatif sur le taux d'ADN ovarien chez les adultes d'*E. kuehniella*. Chez *T. molitor*, le captopril n'a aucun effet sur les taux d'ADN et d'ARN ovarien (Soltani-Mazouni, 2007).

A l'opposé des ces résultats l'énalapril et lisinopril augmentent le taux des acides nucléiques chez *E. kuehniella* (Bensalem & Soltani-Mazouni 2013), le halofenozide et le tebufenozide augmentent les taux d'ADN et ARN ovariens chez *E. kuehniella* (Soltani-Mazouni, 2012). Les données de Benlabiod-Boudraa (1976) concernant l'effet du KK-42, un inhibiteur de l'hormone de mue, sur l'incorporation *in vitro* de la thymidine tritiée dans l'ADN ovarien de *T. molitor* au cours de la maturation sexuelle, révèlent une perturbation de la synthèse d'ADN. Des résultats similaires ont été obtenus aussi chez *T. molitor* en utilisant des inhibiteurs de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron (Soltani-Mazouni & Soltani 1992 Soltani-Mazouni & Soltani 1994; Soltani *et al.*, 1996) et chez *E. kuehniella* (Benjedou 1993) avec le flucycloxuron. Des doses sublétales de chlorfluazuron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, en application topique sur les chenilles du dernier stade de *Spodoptera litura* réduisent significativement les taux des acides nucléiques ovarien (Perven, 2011). Après traitement avec un analogue de l'HJ, le farnesyl méthyl éther (FME) des chenilles de *Malacosama americanum*, ces dernières présentent un retard dans le développement ovarien dû à l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les ovocytes des femelles traitées (Mansingh & Steele, 1974).

La maturation des ovocytes dépend, entre autres, des métabolites prélevés de l'hémolymph et du matériel synthétisé *in situ* par l'ovaire (Raikhel et Dadialla, 1992).

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues. Ces dernières entrent dans diverses réactions et peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s'intègrent dans la cellule comme éléments structuraux en même temps que les glucides et les lipides (Jacob *et al.*, 1961).

La reproduction chez les insectes dépend des protéines notamment la vitellogénine (protéine constituant 80-90% des substances de réserve de l'œuf) qui est synthétisée dans les corps gras, cette protéine étant par la suite acheminée et incorporée dans les ovocytes (Koller, et Raikhel, 1991). La vitellogénine est transformée en vitelline dans les ovocytes (Engelman,

1979). Des travaux antérieurs ont confirmé la présence de récepteurs sur la membrane des ovocytes pour les vitellogénines (Amdam *et al.*, 2002).

Le dosage des protéines montre une différence significative dans leurs taux dans les ovaires des séries traitées par rapport aux témoins. Cette diminution observée peut être expliquée soit par l'accumulation des vitellogénines dans l'hémolymph en considérant que l'ECA est responsable de leur clivage en vitellines; ou bien par l'inactivation de la cascade impliquée dans l'entrée des vitellogénines dans les ovaires par inactivation du récepteur en le considérant sous la commande de l'ECA.

Les glucides forment un groupe de composés très importants, certains représentent une source d'énergie pour les organismes vivants, soit immédiatement utilisable (tréhalose), soit sous forme de réserves (glycogène) ; d'autres ont un rôle structural (cellulose, chitine et acide hyaluronique). Les glucides, en tant qu'éléments énergétiques, jouent un rôle essentiel dans la physiologie des insectes. Concernant les glucides, nos résultats montrent une différence entre les deux séries étudiées. En effet, chez la série traitée on note une diminution hautement significative du taux de glucides. Cette diminution pourrait être expliquée par la diminution du métabolisme de base des ovocytes puisqu'ils sont déjà en déficit en protéines.

Les lipides représentent la principale source d'énergie chez les insectes (Beenakers *et al.*, 1985). Ils sont transportés du corps gras, site de leurs synthèse et stockage (Keely, 1985 ; Van Hensden & Law, 1989), vers les organes utilisateurs, notamment les ovaires (Kilby, 1963, Chino *et al.*, 1981) via l'hémolymph pour être utilisés lors de la vitellogénèse (Wigglesworth, 1972). Plusieurs études ont démontrées que les triglycérides dont le corps gras est le site majeur de stockage chez les insectes, sont une réserve métabolique importante.

Le dosage des lipides montre que le traitement entraîne une réduction hautement significative, cette réduction peut avoir des causes différentes soit une diminution de leur synthèse ou de leur libération dans l'hémolymph par le corps gras, ou une perturbation de leur incorporation dans l'ovocyte.

Cette diminution dans les taux des métabolites dans les ovaires implique une réduction de l'accumulation du vitellus indispensables à l'accroissement et la maturation des ovocytes. Cette diminution est corrélée avec la réduction du nombre d'ovocyte par paire d'ovaires ainsi que la taille et le volume de l'ovocyte basal.

Des résultats similaires sont observés chez *T. molitor* traité par application topique au captopril (Soltani-Mazouni *et al.*, 2007), d'autre inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine enalapril et lisinopril réduisent les taux des glucides et des protéines testiculaires, et augmentent ces taux dans les ovaires d'*E. kuehniella* (Bensalem & Soltani-

Mazouni, 2013). Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés chez *Cydia pomonella* traitée au diflubenzuron (Soltani & Soltani-Mazouni, 1992) et au halofenozide chez *B. germanica* (Maiza *et al.*, 2004). L'acide borique diminue également les contenus ovariens en différents métabolites (Morakchi, 2006, Habes *et al.*, 2013). Chez *E. kuehniella* le Tebufenozide et le méthoxyfenozyde ont le même effet réducteur chez la même espèce (Khebeb, 2008, Soltani-Mazouni 2012), Des doses sublétales de chlorfluazuron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, en application topique sur les chenilles du dernier stade de *Spodoptera litura* réduisent significativement les taux des différents métabolites ovariens (Perven, 2011). Le captopril entraîne la disparition des fractions 3 (206,06 kDa), 5 (150,31kDa) et 10 (42,46 Kda) et des différences dans l'intensité des fractions sont aussi observées. Le captopril, testé *in vivo* sur des femelles adultes de *T. molitor* entraîne également l'absence de 5 fractions protéiques parmi lesquelles on compte la bande suspectée de représenter un polypeptide de vitellines (142,32 kDa). Selon Michalik (1996) l'un des polypeptides majeurs des vitellines chez *T. Molitor* a un poids moléculaire de 143 kDa (Soltani-Mazouni, 2007).

A notre connaissance, peu d'études ont abordé l'effet du captopril sur l'aspect qualitatif des protéines chez les insectes, mais des résultats similaires ont été rapportés avec d'autres molécules de type insecticides. En effet, le holofenozide testé sur des femelles adultes de *T. molitor* entraîne également l'absence de 2 fractions protéiques (Taibi *et al.*, 2003) et affecte le profil des protéines hémolymphatiques chez les nymphes de la même espèce (Lakbar, 1999). Soltani-Mazouni (2004) montre que les mimétiques des ecdystéroïdes, le holofénozyde, le tébufenozide et le méthoxyfenozyde affectent le profil électrophorétique en diminuant le nombre de fractions protéiques chez *T. moltor*. Le KK-42, administré *in vivo* (Zerguine, 1998) et *in vitro* (Benlabiod-Boudraa, 1997) chez les femelles de *T.moltor* réduit aussi le nombre de fractions protéiques ovariennes.

Tous ces résultats mènent à appuyer l'hypothèse d'une action du captopril sur la composition biochimique des métabolites ovariens via une interférence entre la vitellogénèse _son contrôle, déjà démontrée sur la réduction de la taille des ovocytes. La chute des concentrations ovariennes, suggère une perturbation de la synthèse et la libération de ces substances dans le corps gras (Soltani-Mazouni & Soltani, 1992). Une perturbation des processus de captation de ces molécules par les ovocytes impliquant une réduction de l'accumulation du vitellus indispensable à l'accroissement et la maturation des ovocytes reste envisageable.

3.5. Effet sur le potentiel reproducteur

Chez *E. kuehniella*, les étapes de la vitellogénèse s'effectuent pendant la vie nymphale, l'accouplement et la fécondation ont lieu pendant les 12 premières heures après l'exuviation adulte (période de préoviposition) et la période d'oviposition dure 3 à 4 jours (Taïbi, 2007 ; Khebeb *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2011). Nos résultats montrent que le captopril affecte significativement le potentiel reproducteur des femelles d'*E. kuehniella*. En effet, le traitement des chrysalides femelles dès leur exuviation nymphale réduit la durée de la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs, bien que la période de préoviposition ne semble pas être significativement affectée. Des résultats similaires ont été rapportés après l'administration du captopril à *S. littoralis* où la période de d'oviposition a été réduite (Vercruysse *et al.*, 2004). Chez *E. kuehniella* le methoxyfénoside, réduit la durée de la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs (Soltani-Mazouni & Hami, 2012).

En outre, des études antérieures ont révélé que l'administration des agonistes des ecdystéroïdes par voie orale ou par application topique peut produire à long terme des effets toxiques chez les adultes des espèces cibles. En effet, le tébufénoside, le méthoxyfénoside et le halofénoside affectent négativement la fécondité et la fertilité chez plusieurs lépidoptères et coléoptères comme *Choristoneura rosaceana*, *Cydia pomonella*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata* et *T. molitor* (Farinos *et al.*, 1999, Knight, 2000, Sun *et al.*, 2000, Taïbi *et al.*, 2003, Osorio *et al.*, 2008, Pineda *et al.*, 2009).

Dhadialla *et al.* (1998) expliquent l'inhibition de l'oviposition par l'absence de sécrétion de facteurs stimulants de l'oviposition qui sont normalement présents dans l'hémolymphe des femelles fécondées non traitées, chez *S. exempta*, *S. exigua* et *L. decemlineata*. De plus, le RH- 5849 interfère dans l'ovulation et l'oviposition, puisque les ecdystéroïdes stimulent les cellules neurosécrétrices pour la synthèse de l'hormone myotropique d'ovulation (Smagghe & Degheele, 1994a). La sécrétion de l'hormone de l'ovulation se fait après la libération d'un pic d'ecdystéroïdes (Hagedorn, 1985).

L'impact sur le potentiel reproducteur a été mis en évidence aussi avec les analogues de l'hormone juvénile chez de nombreuses espèces. En effet, le pyriproxifène utilisé *in vivo* par application topique chez les femelles adultes de *T. molitor* affecte significativement leur potentiel reproducteur. Il augmente la durée de la période de préoviposition et diminue la fécondité et la durée du développement embryonnaire (Lakbar, 1999). Aussi, le traitement des œufs par le pyriproxifène et le buprofézine (inhibiteur de la synthèse de la chitine) réduisent

la viabilité des œufs, la période d'oviposition et la production d'œufs chez un Coléoptère prédateur d'Homoptères *Delphatus catalinae* (Tong-Xian *et al.*, 2004). Des résultats similaires ont été trouvés après l'administration du pyriproxyfène sur des nymphes d'*Aphis glycines* où le traitement provoque une réduction de la fécondité des adultes femelles à 79% par rapport aux témoins (Richardson & Lagos, 2007). Le fénoxycarbe, agoniste de l'hormone juvénile, prolonge la période de préoviposition, réduit la période d'oviposition, la fécondité des femelles et supprime à 100% l'éclosion des œufs (Taibi, 2000). L'application du fénoxycarbe induit la stérilité des adultes chez *Choristoneura fumiferana* (Dhadialla *et al.*, 1998). Chanbang *et al.*, (2008). Athanassiou *et al.* (2011) ont montré que l'application du méthoprène, un autre analogue de l'hormone juvénile sur les surfaces de riz entraîne une réduction de la fécondité des femelles de *Rhyzopertha dominica* et réduit à 26% l'éclosion des œufs par rapport au témoin qui est à 85%. Ghasemi *et al.* (2010) ont montré que le pyriproxyfène réduit significativement le contenu ovarien en métabolites (Lipides, protéines) capté pendant le développement ovarien chez *Plodia interpunctella*. La même raison pourrait être la cause de la réduction de la fécondité et de la viabilité des œufs chez *E. kuehniella*.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude vise à préciser les effets et le mode d'action d'un médicament hypotenseur, le captopril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), sur le développement et la reproduction d'un ravageur des denrées stockées *E. kuehniella*.

Le captopril a été administré par application topique, à l'émergence des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* (Lépidoptère), dont le but est d'inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine, afin de connaître son rôle chez les insectes.

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes a été effectuée par une méthode immuno-enzymatique (EIA) au cours du temps durant la métamorphose dans le corps entier des chrysalides femelles, révèle la présence de deux augmentations dans les taux des ecdystéroïdes, la première au troisième jour et une seconde au cinquième jour de la vie nymphale. Le traitement augmente les taux des ecdystéroïdes. Ces variations des taux d'ecdystéroïdes au cours de la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sont avec les événements épidermo-cuticulaire.

L'ensemble des résultats obtenus montre que le captopril n'a aucun effet sur les taux des acides nucléiques dans le tégument des chrysalides femelles au cours du temps durant la métamorphose. L'analyse électrophorétique menée sur les protéines cuticulaires au cours du temps durant la métamorphose, met en évidence 10 fractions protéiques. Les chrysalides traitées au captopril présentent le même profil électrophorétique que les témoins, sauf un retard dans l'apparition de la fraction 9 chez les témoins jusqu'au cinquième jour de la vie nymphale.

Les mensurations des cuticules sécrétées par le tégument au cours du temps durant la métamorphose ont été réalisées sur des coupes semi-fines préparées selon la technique conventionnelle de microscopie électronique. L'épaisseur de la cuticule nymphale augmente significativement avec l'âge pour atteindre un maximum au troisième jour de la vie nymphale et décroît par la suite en raison de la digestion des couches profondes de l'ancienne cuticule. La nouvelle Cuticule ou la cuticule pré-exuviale adulte est sécrétée immédiatement après l'apolyse (troisième jour), les épaisseurs augment progressivement pour atteindre un maximum à la veille de l'exuviation adulte.

Le captopril augmente l'épaisseur de la cuticule totale dès le premier jour de la vie nymphale, jusqu'au cinquième jour et l'épaisseur la nouvelle cuticule au cinquième jour de la vie nymphale.

L'étude morphométrique des ovaires, révèle une perturbation de la croissance et le développement des ovaires d'*E. kuehnielle*. En effet le captopril réduit le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires, la taille et le volume de l'ovocyte basal au cours de la maturation sexuelle. Ce médicament réduit l'épaisseur du chorion.

L'évaluation des effets du captopril sur le taux des ecdystéroïdes ovariens, montre que le traitement augmente le taux des ecdystéroïdes ovarien par rapport aux témoins.

Sur le plan biochimique, il a été constaté que ce traitement réduit significativement le taux des acides nucléiques ovariens, de plus le captopril provoque une diminution hautement significative des métabolites ovariens et modifie le pattern protéique par l'absence de trois fractions protéiques.

Au regard de toutes ces résultats, il semblerait que la réduction des métabolites ovariens après traitement pourrait s'expliquer par une diminution des vitéllogénines dans le corps gras ou une perturbation des processus de captation de ces molécules par les ovocytes. Le traitement avec le captopril induit une réduction de la fécondité et de l'éclosion des œufs, en rapport avec la production d'ecdystéroïdes puisque une augmentation des taux des ecdystéroïdes libres est enregistrée après traitement dans les ovaires chez *E. kuehniella*. De plus, la réduction des taux des métabolites ovariens suggère une interférence avec la vitellogénèse affectant à son tour le potentiel reproducteur.

Ainsi, il serait intéressant, d'établir chez *E. kuehniella*, une analyse quantitative et qualitative des ecdystéroïdes dans les œufs pondus, effectuer un dosage des vitéllogénines puis confirmer l'action de cette enzyme dans la reproduction des insectes, avec d'autres recherches sur les mâles.

Résumés

RESUME

Le peu de travaux réalisés sur le rôle de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans la reproduction et le développement des insectes nous a conduit à réaliser cette étude dans le but d'inhiber cette enzyme par le captopril un médicament souvent utilisé dans le traitement de la tension artérielle chez les mammifères, afin de mieux connaître son effet par rapport aux témoins.

Nos expérimentations ont été menées dans le but d'examiner l'effet du captopril administré par application topique sur des chrysalides femelles d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* (Lépidoptera, pyralidae) nouvellement exuviées à la dose de 10 µg/2 µl d'acétone. Le captopril a été évalué sur le développement et la reproduction.

Développement : la première série d'expériences a été réalisée en vue de déterminer l'impact du captopril sur les taux des ecdystéroïdes réalisée par une méthode immuno-enzymatique dans le corps entier des chrysalides d'*Ephestia kuehniella*, au cours du temps durant la métamorphose. On note l'effet stimulateur du captopril sur la production hormonale, l'analyse quantitative révèle la présence de deux augmentations une première au troisième jour de la vie nymphale et une seconde au cinquième jour, concernant l'effet du captopril sur les taux des acides nucléiques, la qualité des protéines cuticulaires et le processus de sécrétion cuticulaire chez les chrysalides femelles durant la métamorphose. L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine par l'application du captopril n'a aucun effet sur les taux des acides nucléiques, le profil électrophorétique des protéines cuticulaires ne montre aucune différence entre les témoins et les traités. La détermination de l'effet du captopril sur le processus de sécrétion cuticulaire, les observations au microscope optique indiquent que le captopril augmente l'épaisseur de la cuticule totale et nymphale.

Reproduction : les effets de cette molécule ont été étudiés, sur la morphométrie (nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et la taille de l'ovocyte basal, l'étude structurale des ovocytes basaux des femelles adultes, l'épaisseur du chorion), un dosage immuno-enzymatique de l'hormone de mue (ecdystéroïdes) le potentiel reproducteur (la durée de la période de pré-oviposition, période d'oviposition, nombre d'œufs pondus et pourcentage d'éclosion), la biochimie de l'ovaire (taux des acides nucléiques, protéines, glucides et lipides), une analyse qualitative des protéines ovariennes et le potentiel reproducteur (la

durée de la période de pré-oviposition, période d'oviposition, nombre d'œufs pondus et pourcentage d'éclosion). Le captopril augmente le taux des ecdystéroïdes ovariens, réduit de manière significative le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocytes, la taille de l'ovocyte basal, l'épaisseur du chorion, et les taux des acides nucléiques ainsi les différents métabolites ovariens. L'électrophorèse effectuée, sur PAGE- SDS, révèle une modification du profil électrophorétique des protéines ovariennes en diminuant le nombre de fractions.

Mots clés : *Ephesia kuehniella*, enzyme de conversion de l'angiotensine, captopril, développement, reproduction.

SUMMARY

Few works realised on the role of enzyme of conversion of angiotensin (ACE) in the reproduction and development take us to realise, this study with an aim of inhibiting this enzyme by the captoril a drug often to use in treatment of blood pressure in the mammals, in order to know its effect by contribution with control series

Our experiments were conducted in order to examine the effect of captopril applied topically to female pupae out on a stored product pest, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, pyralidae), newly moulted at 10 µg/2µl of acetone.

Development: The first experiments was carried out in order to determine the effects of captopril on amount of ecdysteroids in the body during pupal development and on the quantity of nucleic acid, on the cuticle secretion during metamorphosis, profil electrophoretic of proteins. The inhibition of this enzyme, by using the captopril does not affect the amount of ADN and ARN integument. The observation made with photonic microscope on the cuticle secretion indicate that the captopril increase the thickness of total cuticle and a new cuticle. Captopril does not affect ecdysteroid production was measured by a enzyme-immunoassay in the whole body during the pupal stage of *E. Kuehniella*. Traitment with captopril increase the amount of ecdysteroids in the body during pupal development, the quantitative analysis reveals the presence of two peaks one at third and another at fifth day.

Reproduction: The effects of this molecule was studied, on morphometry (ovarian weight, number of eggs in paired ovary and size of the basal oocyte), the determination of the amount of ecdysteroids by the immuno-enzymatic assay. The compound increase rate of ovarian amount of ecdysteroids also the biochemistry of ovary (on amounts nucleic acid, proteins, carbohydrates and lipids; the qualitative analysis of the ovarian proteins and the reproductive potential (duration of the pre-ovipotion, duration of the oviposition, number of eggs laid and hatching percentage). Captopril reduces significantly the weight of ovaries, the number of oocytes, the size of basal oocyte, quantity of different ovarian metabolites and nucleic acid. The electrophoresis profile reveals the absence of tree bands at the treated series.

Keywords: *Ephestia kuehniella*, angiotensine converting enzyme, growth, development, reproduction, Captopril,

ملخص:

الدراسات القليلة التي أجريت لتحديد دور الأنزيم المحول للانجيوتنسين في عملية التطور و التكاثر دفعنا للقيام بهذه الدراسة قصد تثبيط هذا الأنزيم بواسطة الكبتوبريل الذي هو عبارة عن دواء يستعمل عادة لعلاج ارتفاع الضغط الشرياني عند الثدييات لمعرفة تأثيره مقارنة مع الشاهد.

استعمل الكبتوبريل عن طريق المعاملة السطحية لعداري إحدى الحشرات المضرّة بالمواد المخزنة *Ephestia kuehniella* حديثة الانسلاخ بالجرعة 10 µg / 2ل من الأستون. التجارب التي قمنا بها تحدد تأثير هذا الدواء على عدة مظاهر لعملية التطور و التكاثر.

التطور: تم تحديد آثار المعايير الكمية لهرمونات الانسلاخ بالطريقة الانزيمو ايمينيولوجية خلال المرحلة ما بعد الجنينية لإناث *Ephestia kuehniella* اثبت أن الكبتوبريل منبه للإفراز الهرموني، التحليل الكمي يؤكد وجود ذروتين، الأولى في اليوم الثالث و الثانية في اليوم الخامسة. تم تقييم تأثير الكبتوبريل على كمية الاحماض النووية ARN و ADN على مستوى الجليد. بالإضافة إلي التحليل النوعي للبروتينات و تحديد تأثير الكبتوبريل على الإفراز الجليدي، المشاهدة بالمجهر الضوئي تثبت أن الكبتوبريل يزيد من سمك الكيوتكل الكلي و الكيوتكل الجديد.

التكاثر: الدراسة استهدفت المعايير المرفولوجية للمبايض، البنية الدقيقة للكوريون، التحليل الأنزيمومناعي لهرمونات الانسلاخ (أكديستيرويدات). التحليل الكمي للأحماض النووية، للبروتينات، الغلو سيدات اللييدات، بالإضافة إلي التحليل النوعي للبروتينات. أهم النتائج توضح أن الكبتوبريل يؤدي إلي انخفاض معنوي لكل من حجم ووزن المبايض وتركيز لأكديستيرويدات. للأحماض النووية، البروتينات، الغلو سيدات، اللييدات. و له تأثير على مستوى البنية الدقيقة للكوريون و تركيز الاحماض النووية ARN و ADN. النقص في تركيز البروتينات أدى بنا إلى القيام بالالكترافوراز على SDS-PAGE لرؤية الكسور البروتينية المتأثرة بالكبتوبريل. ورقة الالكترافوريز تبين اختفاء ثلاثة كسور عند الإناث المعاملة.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott W B., (1925).** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. of Economic Entomology*.**18**:265–267.
- Akif M ., Ntai I., E D., Sturrock E D., Isaac R E., Bachmann B O., & Acharya K R., (2010).** “Crystal structure of a phosphonotriptide K-26 in complex with angiotensin converting enzyme homologue (AnCE) from *Drosophila melanogaster*”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, pp.532-536.
- Akif M., Masuyer G., Schwager L., Bhuyan B.J., Mugesh G., Isaac., R E Sturrock E D., & Acharya., K R., (2011).** “Structural characterization of angiotensin I-converting enzyme in complex with a selenium analogue of captopril”. *FEBS J.* **278**, pp.3644-3645.
- Altstein M., Aharonson N & Menn J.J. (1993).** Overview: New targets for insect management in crop protection. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.***22**:5-12.
- Aller H E., Ramsay J R., (1988).** RH-5849 –A novel insect growth regulator with a new mode of action. *Brighton Crop Prot. Conf.*, **2**: 511-512.
- Alrubeai W A. & Ellis R A., (1982).** Electrophoretic analysis of testicular protein components in the developing *Tenebrio molitor*. *Insect. Biochem.*, **12**, 171-175
- Amrani L., Zerguine K., Farine J P., Smagghe G., & Soltani-Mazouni N., (2004).** Imidazole derivative KK-42 reduces ecdysteroid titers and interfere with reproductive processus in adult females of *Tenebrio molitor*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **80**, 163-172.
- Amdam A., Norberg K., Hagen A., & Omholt S., (2002).** Social exploitation of vitellogenin. *PNAS*. **100**: 1799-1802.
- Anspaugh D D., Rose R L., Koehler P G., Hodgso E & Roe R M., (1994).** Multiple mechanisms of pyrethroid resistance in the German cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **50**: 138-148.
- Aribi N., 1997.** L’entrée en métamorphose chez *Zophoba atratus* (Coleoptera :tenebrionidae): Analyse des ecdystéroïdes ; effet de l’isolement (groupement); effet de régulateurs de croissance et étude des sources hormonales. Thèse Doctorat, Université d’Annaba, Algérie.
- Aribi N., Quennedy A., Soltani N., & Delbecque J P., (1999).** L’inhibition de la métamorphose chez *Zophoba atratus* (Coleoptera: tenebrionidae): effets des ligatures et des régulateurs de croissance. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* **35**(Suppl.): 59-64.
- Aribi N., Lacbar C., Smagghe G., & Soltani N., (2001).** Comparative action of RH-0345 and pyriproxyfen on molting hormone production and protein analysis in mealworm pupae. *Med . Fac Landbouww. Univ. Gent* **66 (2a)**: 445-454.

- Athanassiou C G., Arthur F H., & Throne J E., (2011).** Efficacy of layer treatment with methoprene for control of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) on wheat, rice and maize. *Pest Manag Sci*; 67: 380–384.
- Asahina M., Fugo H., & Takeda S., (1994).** Ecdysteroids synthesis in dissociated Cells of the prothoracic glands of silkworm , *Bombyx mori*. *Zool.*, **11(1)** 107-111.
- Attardo G M., Hansen I A., Raikhel A S., (2005).** Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implication for anaautogeny. *Insect. Biochem. Mol; Biol.* **35**: 661-675.
- Balachowsky., (1972).** Blood sucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals. *Mix. Publ. Ent. Soc. Am.* **8**: 161-376.
- Barth R H., & Lester L J., (1973).** Neuro-hormonal control of sexual behavior in insect. *Ann. Rev. Entomol.* **18**: 445- 472.
- Bataille A., anton M., Mollat F., Bobe M., Bonneau C., Caramaniam M N., Geraut G. & Dupas D., (1985).** Respiratory allergies among symptomatic bakers and pastry cooks : initial results of a prevalence study. (French). *Allergie et immunologie.* **27(1)**: 7-10.
- Bellés X., Cassier P., Cerdà X., Pascual, N., André M., Rosso Y., Piulasha M D., (1993).** Induction of choriogenesis by 20-hydroxyecdysone in the German cockroach *In* : Schal, C., Holbrook, G.L., Bachmann, J.A.S., V.L., Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica* : Juvenile hormone as a pleiotrophic master regulator. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **35**: 405-426.
- Bellés X., (1995).** Interaction between corpora allata fat body and ovary in insect reproduction: which controls which Netherlands. *J. Zool.*, **45**: 152-156.
- Bellés X., (2005).** Vitellogenesis directed by juvenile hormone. *In*. Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 12 Part B: Progress in vitellogenesis A. S. Raikhel (Eds.), Science Publishers, Enfield, USA/Plymouth, UK, **pp.** 157-197.
- Bellés X. & Maestro J L. (2005).** Endocrine peptides and insect reproduction. *Invert. Reprod. Devel.*, **47** (1): 23-37.
- Bellés X., Cassier P., Cerdà X., Pascual N., André M., Rosso Y., Piulasha M D., (1993).** Induction of choriogenesis by 20-hydroxyecdysone in the German cockroach *In*: Schal, C., Holbrook, G.L., Bachmann, J.A.S., V.L., Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica*: Juvenile hormone as a pleiotrophic master regulator. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **35**: 405-426.
- Beenakers A M., T H., Vander Host D G., & Van Marrewijk W J A., (1985).** Insect lipids and lipoproteins and their role in physiological processes. *Prog. lipid. Res.* **24**: 19-67.

- Bendjeddou F., (1993).** La reproduction chez *Ephesia kuehniella* (Zeller) et effet du flucycloxuron . Aspects toxicologique biologiques et biochimiques. Mémoire de Magister., Univ. d'Annaba, Algérie.
- Bendjeddou F., Bouslama Z., chebira S. et Soltani N., (1998).** Effects of flucycloxuron, a benzoyl phenyl urea derivative, on growth, development and cuticle secretion in *Ephesia kuehniella*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. **63**(2b): 575-580.
- Benlabiod-boudraa I. (1997).** Activité in vitro d'un inhibiteur de la biosynthèse des ecdystéroïdes, KK-42, sur le développement des ovaires de *Tenebrio molitor* L : Aspects morphométriques et biochimiques. Mém. Mag., Univ. Annaba, 65 p.
- Bensalem F., Soltani-Mazouni N., (2013).** Effect of Two Inhibitors of the Angiotensin Converting Enzyme in the Mediterranean Flour Moth: Biochemical Composition and Ecdysteroid Amount of Gonads. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 107 No 2:186-194.
- Bernstein K E, Xiao H D, Adams J W, Frenzel K, Li P, Shen X Z, Cole J M, Fuchs S., (2005).** Establishing the role of angiotensin-converting enzyme in renal function and blood pressure control through the analysis of genetically modified mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 583-591.
- Berghiche H., Smagghe G., Van de Velde S., & Soltani N., (2007).** *In vitro* cultures of pupal integument explants to bioassay insect growth regulators with ecdysteroid activity for ecdysteroid amounts and cuticle secretion. *African Journal of Agricultural Research*. **2**(5).208-2
- Berry S J., (1985).** Reproductive system. In Bulm M.S. (Eds): *Fundamental of insect physiology*. J. Wiley and Sons, New York., pp.437-466.
- Bollenbacker W E., Zvenko H., Kumaran A K. & Gilbert L I. (1978).** Changes in ecdysone content during postembryonic development of the wax moth, *Galleria mellonella*: the role of the ovary. *Gen. comp. Endocr.* 34, 160-179.
- Bollenbacker W E., (1988).** The interendocrine regulation of larval-pupal development in the Tobacco hornworm, *Manduca sexta*: a model. *J. Insect. Physiol.* **34**: 941- 947.
- Bonneton F., Zelus D., Iwema T., Robinson-Rechavi M. & Laudet V., (2003).** Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between EcR and USP-RXR. *Mol. Biol. Evol.*, **20** (4): 551- 553.
- Bosquet G., Fourche J., Guillet C., (1989a).** Respective contribution of juvenile hormone and 20-E hydroxyecdysone to the regulation of major hemolymph protein synthesis in *Bombyx mori* larvae. *J. Insect Physiol.*, **35** : 1005-1015.
- Bosquet G., Guillet C., Cavez B., Chavancy G., (1989b).** The regulation of major hemolymph protein synthesis changes in mRNA content during the development of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem.*, **19** : 29-39.

- Boukachbia A., Soltani-Mazouni N., Smaghe G & Soltani N. (2003).** Comparative effects of some ecdysteroid agonists in mealworm : ecdysteroid amounts and protein analysis in developing ovaries under in vivo conditions. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University*, **68(4a)**: 307-312.
- Bouzeraa H., & Soltani-Mazouni N., (2012).**- Effets du méthoxyfénoside et du tébufénoside sur le développement et quelques paramètres de la reproduction d'*Ephesia kuehniella* après traitement des mâles et des femelles. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **137**(1-4): 153-163.
- 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.
- Brown M.R., Sieglaff D H., Rees H H. (2009).** Gonadal ecdysteroidogenesis in Arthropoda: occurrence and regulation. *Annu Rev Entomol* 54:105–125.
- Bruse A., Dennis B., Julian L., Martin R., Keith R., & Lames D W., (1987).** Biologie moléculaire de la cellule. Edition Flammarion. Médecine science (Edition Spéciale étudiants), Paris.
- Burton A., (1956).** - Study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **62**, 315-323.
- Carhan A., Tang K., Shirras C.A., Shirras A.D, Isaac R E., (2011).** Loss of Angiotensin-converting enzyme-related (ACER) peptidase disrupts night-time sleep in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **214**: 680-686.
- Cassier P., (1996).** L'exploitation de deux milieux : de la vie larvaire à la vie imaginaire chez les insectes. Le contrôle endocrinien. *Bull. Soc. Zol., Fr.* 121 (2), 187-197.
- Cassier P., Lafont R., Descamps M., Porchet M., Soyez D., (1997).** Reproduction des invertébrés : Stratégies, modalités et régulation. *Edition Masson.*, p.354.
- Chaminade M & Laverdure A M. (1976).** Etude quantitative des synthèses d'ARN nucléaires dans l'ovaire de *Tenebrio molitor* adulte. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **282**, 1297-1300.
- Chanbang Y., Arthur F H., Wilde G E., Throne J E., Subramanyam B H., (2008).** Susceptibility of eggs and adult fecundity of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, exposed to methoprene. *J. Insect Sci.* **8(48)**: 1–5.
- Chen L., Zhu J, Sun G. & Raikhel A S., (2004).** The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Mol. Endocrinol.* **33**: 743-761.
- Chihara C J., Silvert D J., & Friston J W., (1982).** The cuticle protein of *Drosophila melanogaster*: stage specificity. *Devel. Biol.*, **89**: 379-388.

- Chino H., Katase H., Downer R C., & Hard Takahashi K., (1981).** Diacylglycerol – carrying lipoprotein of hemolymph of the American cockroach: Purification, characterization and function. *J. Lipid R.E.S.*, **22**: 7 – 15.
- 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.
- Cochran D G., (1991).** Extended selection for pyrethroid resistance in the German cockroach (Dictyoptera:Blattellidae).*J.Econ. Entomol.*, **84**: 1412-1416.
- Colombani J., Andersson D S., Leopold P., (2012).** Secreted peptide Dilp 8 coordinates *Drosophila* tissue growth with development timing. *Sci.*, **336**: 582-585.
- Corvol P., Williams T A., & Soubrier F., (1995).** Methods in Enzymology dipeptidase A: Angiotensin I-converting Enzyme (Barrett,A J.,ed) vol **248**, pp.283-305, *Academic Press*, London.
- Corvol P., Eyries M., Soubrier F., (2004).** Peptidyl-dipeptidase A/Angiotensin I-converting enzyme. *In*: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. Handbook of proteolytic enzymes, vol. 1. Amsterdam: Elsevier Academic Press; p. 332–46.
- Cusson M C G., Carruthers K. Wyatt G R., Tobe S S., & Mc Neil J N., (1994).** Regulation of vitellogenin production in army worm moth, *seudaletia unipuncta*. *Journal of Insect physiology.*, **40**: 183-199.
- Cusson M., Palli, S R., (2000).** – Can juvenile hormone research help rejuvenate integrated pest management? *Can. Entomol.* **132**: 263: 280.
- Darren R Brooks Peter J., Appleford, Lindsay Murray, & Isaac R E., (2003).** An Essential Role in Molting and Morphogenesis of *Caenorhabditis elegans* for ACN-1, a Novel Member of the Angiotensin-converting Enzyme Family That Lacks a Metallopeptidase Active Site. *J. Biol. Chem.* **278**: 52340-52346.
- Davis R E., Kelly T J., Masler E P., Fescemeyer H W., Thyagaraja B S. Borkovec A B., (1990).** Hormonal control of vitellogenesis in the gypsy moth, *lymantria dispar* (L.): suppression of hemolymph vitellogenin by the juvenile hormone analog, methoprene. *J. Insect. Physiol.* **36**: 231-238.
- De Kort C A D., Koopmanschap A B., (1991).** – A juvenile hormone analogue affects the protein pattern of the hemolymph in instar larvae of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, **37(2)** : 87-93.
- Delbecque J P., Hirn M., Delachambre J & De Reggi M., (1978).** Cuticular cycle and molting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera). *Dev. Biol.* **64**: 11-30.

- De Reggi H L., Pitoizet N., Gharib B., & Delbecque J P., (1992).** New enzyme immunoassay for écdystéroïdes using peroxydase enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies. Xth Ecdysone Workshop, Liverpool 6-7th April,
- De Renobales, M., Nelson D R., & Blomquist G J. (1991).** Cuticular lipids in : Binnington K. & Retnakaran A.(eds.). Physiology of insect epidermis, CSIRO publication, Australia, 240-251.
- Devonshire A L., (1989).** Insecticide resistance in *Myzus persicae*: from field to gene and back again. *Pestic. Sci.*, **26**:375.
- Dhadialla S., Carlson R., & Le P., (1998).** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu.Rev. Entomol.* **43**: 545-569.
- Dhadialla T S., Retnakaran A., Smagghe G., (2005).** Insect Growth- and development-Dsrupting Isecticides. *Article number in press: NSCT/ 00076*.
- Downer R G H., 1985.** Lipid metabolism. In comprehensive Insect physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 10 (G. A .Kerkert. & L.I. Gilbert, eds). Pergamon Press, Oxford, pp: 77-113.
- Duchateau G & Florkin M., (1959).** Sur la tréahalosémie des insectes et sa signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.*, **67**: 306-314.
- El Ouar I., (2005).** Effets d'un analogue de l'hormone de mue (RH-0345) et de l'hormone juvénile (Pyriproxyfène) au cours du stade nymphal d'*Ephestia kuehniella* (Lépidoptera) Dosage des écdystéroïdes et de la Glutathion Stransférase. Thèse de Magister en physiologie Animale.Université D'Annaba.
- El Ouar I. Aribi N., & Soltani-Mazouni N., (2010).** Dosage des écdystéroïdes chez *Ephestia kuehniella*. (eds). Actes de la CIFE VI. Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat,. N° **47**, Tome I: 137-140.
- Engelmann F., (1979).** Insect vilellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. In: Treherne J E., Berridge M J., Wigglesworth V B. (Eds). Advences in insect physiology, New York, academic Press, 49-108.
- Engelmann F., (1983).** Vitellogenesis controlled by juvenile hormone. *In* : Downer R.G.H, Laufer H. (Eds) : Endocrinology of insects. New York : Alan R. Liss, INC, 259-270.
- Evans, H E. (1984).** Insect Biology. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Massachusetts.
- Farinõs G P., Smagghe G., Tirry L., Castanera P., (1999).** Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeonnymus mariaefranciscas* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **41**: 201-213.

- Fernandez M., Liu X., Wouters M A., Heyberger S., Husain A., (2001).** Angiotensin I-converting enzyme transition state stabilisation by His 1089. *JBC*, **276** N° 7: 4998-5004.
- Friend D S., & Faquhar H E., (1967).** Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. *J. Cell. Biol.*, **35**: 359 – 376.
- Gäde G., Hoffman K H., Spring J H., (1997).** Hormonal regulation in insect's facts, gaps and future directions, *Physiol. Rev.* **77**: 963–1032.
- Gäde G., (2002).** Allatoregulatory peptides-molecules with multiple function. *Invertebrate Reproduction and Development*, **41** : 127-135.
- Gäde G. & Hoffmann K H., (2005).** Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol. Entomol.*, **30**: 103-12
- 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. *Sci.*, **336**: 579-582.
- Ghasemi A., Sendi J J., Ghadamyari M., (2010).** Physiological and Biochemical effect of pyriproxyfen on Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Huber) (Lepidoptera: Pyralidae). *Jourman of plant protection research* vol. **50(4)**:416-422.
- Gerber G H., (1967).** A possible mechanism for the regulation of female reproduction cycle in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Can. Entomol.*, **99**: 1298-1303
- Gerber G H., (1975).** Reproduction behaviour and physiology of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Egg development and oviposition in young females and effects of mating. *Can. Entomol.*, **107**, 551-559.
- Gilbert L I., Song Q., et Rybczynski R., (1997).** Control of ecdysteroidogenesis Activation and inhibition of prothoracic gland activity. *Invert Neurosci* ; **3**: 205–46.
- Gilbert L I., Serafin R B., Watkins N L., & Richard D S., (1998).** Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *J. Insect Physiol.* **44**: 637-644.
- Gilbert L I., Granger N A., & Roe R M. (2000).** The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **30**, 617–644.
- Gilbert L I., Rybezynski R, Warren G T. (2002).** Control and bio-chemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Revu. Entomol.* **47**: 883-916.
- Gilbert L I., (2008).** *Drosophila* is an inclusive model for human diseases, growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, **293**(1-2): 25-31.

- 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, pp. 231-269.
- Goldworthy G J., Mordue W., Guthkelch J., (1972).** Studies on insect adipokinetic hormones. Gen. Comp. Endocrinol., 18(3) : 545
- Goodman W G. & Chang E S., (1985).** Juvenile hormone cellular and hemolymph binding proteins. In: *comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Parmacology*. kerkut. G. a. and Gilbert L. I. (Eds), Pergamon Press. Oxford.7: 491-510.
- Granger N A., Rybczynski R. & Gilbert L I., (2000).** Contrôle of juvenile hormone synthesis by the corpus allatum. Xxi. International Congress of Enthomology. Brazil, 20-26.
- Gruntenko N E., & Rauschenbach I Y., (2008).** Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J. Insect Physiol.* **54**: 902-908.
- Gullan P J., & Cranston P S., (2005).** The insects: An outline of entomology (3rd ed.). Malden, Ma: Blackwell Publishing.
- Habes, D., Morakchi S., Aribi N., Farine J P. & Soltani N. (2005).** Boric acid toxicity to German cockroach, *Blattella germanic a*: Alterationb in midgut structure, and acethylcholinesterase and glutathion s-transferase *Pestic.Biochem.Phusiol.*,**84**, 17-24.
- Habes D., Messiad R., Gouasmia S., & Grib L. (2013).** Effects of an inorganic insecticide (boric acid) against *Blattella germanica*: Morphometric measurements and biochemical composition of ovaries. *African Journal of Biotechnology*.**12**(18) 2492-2497.
- Hadley N. (1986).** La cuticule des Arthropodes pour la science. pp.63-72 Revue.
- Hagedorn H H., (1985).** The role of ecdysteroids in reproduction. Dans Comprehensive insect physiology, Biochemistry and pharmacology. Kerkut G. A. et Gilbert, L. I. (Eds), Pergamon, Oxford, Vol **8**: 205- 262.
- Hagedorn H H., (1989).** The role of ecdysteroids in reproduction. In G.A. Kerkut G. A. et Gilbert, L.I. (eds). *Compreh. Insect. Biochem: Physiol. Pharmacol* Vol. 8 pp 205-262.
- Hami M., Taïbi F., Smagghe G. & Soltani-Mazouni N., (2005).** Comparative toxicity of three ecdysone agoniste insecticides against the mediterranean flour moth ,*Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, **70**(4):767-772
- Hardie J., (1985).** The identification of an aphid juvenile hormone, and its titre in relation to photoperiod. *Physiol. Entomol.*, **10**: 297-302.

- Hemingway J., Small G J., & Monro A G. (1993).** Possible mechanisms of organo-phosphorus and carbamates insecticide resistance in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and different geographical areas. *J. Econ Entomol.*, **30**, 1009-1630.
- Henrich V., (2005).** The ecdysteroid receptor. In L.I. Gilbert, I. Kostas, S.Gill (eds) *Comprech.Insect.Mol.Sci*, Elsevier.Vol 3: Pergamon Press, New York.
- Hepburn H R., (1976).** The insect integument. *Elsevier Scientific Publishing Company* (Amsterdam).
- Hepburn H R., (1985).** Structure of the integument. In *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, (Eds). G.A.Kerkut and L.I. Gilbert, Pergamon Press (Oxford), Vol. 3, pp. 1-58.
- Ho H Y ., Tu M P., Chang C Y., Kou R., (1995).** Identification *in vitro* release products of corpora allata in female and male of *loreyi* leaf worm *Leucania loreyi*. *Experientia* . **51**: 601-605.
- Hoffmann K H., & Sorge D., (1996).** Vitellogenin levels in allectomized female crickets *Gryllus bimaculatus* de geer (Ensifera, Gryllidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **32**: 549 -558.
- Hoffmann K H., Meyering-Vos., & Lorenz W M., (1999).** Allatostatins and allatotropins : is the regulation of corpora allata activity their primary function. *Eur. J. Entomol.*, **96**, 255-266.
- Hsiao T H., Hsiao C., & De wilde J., (1975).** Moulting hormone production in the isolated larval abdomen of the Colorado beetle. *Nature* **255**, 727 – 728.
- Huang X., Warren JT., Gilbert LI., (2008).** New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J Genet Genomics*; **35**:1–10.
- Isaac R E., Lamango N S., Ekbote U., Taylor CA., Hurst D., Weaver R J., Carhan A., Burnham S., Shirras A D., (2007).** Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators. *Peptides*. **28**:153–162.
- Jacob F., & Monod J., (1961).** Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Biol. Med.* n° **3**: 318 – 321.
- Jenkins S P., Brown M R. & Lea A O., (1992).** Inactive prothoracic glands larvae and pupae *Aedes aegypti* ecdysteroid release by tissues in the thorax and abdomen. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **22 (6)**: 553-559.
- Karnovski M J., (1965).** A formaldehyde – gluteraldehyde fixative of high osmolarit for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **27**: 137A
- Kaufman P B., Wu W., Kim D., Cseke L J., (1995).** Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. *In CRC press INC*, 109.

- Kawada H., (1988).** An insect growth regulator against cockroaches. In: Ishaaya, and Horowitz, A.R. (eds). Novel phenoxy juvenile analog (Pyriproxyfen) suppresses embryogenesis and adult emergence of the sweetpotato whitefly (Homoptera, Aleurodidae). *J. Entomol.* **85(6)**: 2113-2117.
- Keely L L., (1985).** Physiology and biochemistry of Fat body pp. 211 – 248. INGA Kerkut et L.I. Gilbert (Eds): *Comprehensive Insect Biochemistry, physiology and pharmacology*, vol. **3**, Pergamon Press, oxford.
- Khebbab M E H., Gaouaoui R., & Bendjeddou F., (2008).** Tebufenozide effects on the reproductive potentials of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* . African Journal of Biotechnology Vol. **7 (8)**: 1166-1170.
- Kidokora K., Iwata K I., Fujiwara Y., & Takeda M., (2006).** Effects of juvenile hormone analogs and 20-hydroxyecdysone on diapauses termination in eggs of *Locusta migratoria* and *Oxya yezoensis*. *J. Insect. Physiol.* **52**: 473- 479.
- Kilani-Morakchi S, Aribi N, Farine J.P., Smagghe G., Soltani N., (2009a).** Halofenozide affects sexual behavior, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroaches *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). Belg. *J. Biotech.*, **8(4)**: 704-708.
- Kilani-Morakchi S., Aribi N., Soltani N., (2009b).** Activity of boric acid on German cockroaches: Analysis of residues and effects on reproduction. *Afr. J. Biotechnol.* **8**: 703-708.
- Kirane-Amrani L., & Soltani-Mazouni N., (2012).** “Comparative activity of three inhibitors of the angiotensin converting enzyme on growth, development, and ecdysteroid contents of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller”. *African Journal of Biotechnology* **11**, pp. 11972-11977.
- Knight A L., (2000).** Tebufenozide targeted against codling moth (Lepidoptera :Tortricidae) adults, eggs, and larvae. *J. Econ. Entomol.* **93**, 1760-1767.
- Koeppel J K., Fuchs M., Chen T T., Hunt L M., Kovalick G E., & Briers T., (1985).** The role of juvenile hormone in reproduction. Dans *Comprehensive. Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G. A. et Gilbert, L. I. (Eds), vol. **8**, Pergamon Press, Oxford. pp. 165-203.
- Kokoza V A., Martin D., Mienaltowski M J., Ahmed A., Morton C M., & Raikhel A., (2001).** Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene* **274** 47–65.
- Kolman J., 1990.** Ecdysteroids, *Zool.Sci.* 563.
- Kopec C., (1922).** Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull.*, **42**,323-341.
- Kort C A D., & Granger N A., (1996).** Regulation of JH titres: The relevance of degradative enzyme and binding proteins *Arch. Insect. Biochem.Physiol.***20**: 87-105.

- Kou R., & Tu M P., (1998).** Juvenoid biosynthesis by corpora allata in adult female and male *loreyi* leaf worm, *Mythimma Loreyi Duponchel* (Lepidoptera : Noctuidae). *Zool. Stud.*, **37**: 119-125.
- Kou R., & Chen S J., (2000).** Allototropic and nervous control of corpora allata in adult male *loreyi* leaf worm, *Mythimma Loreyi Duponchel* (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Physiol. Entomol.*, **25** :273-280.
- Kozlova T Y., & Thummel C S., (2003).** Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*, 301: 911-1914.
- Kunkel G J., & Nordin J H., (1985).** Yolk proteins. In: "Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology" (edited by G. A. Kerkut and L. I. Gilbert) v. 1, p. 83–111. Pergamon Press, Oxford.
- Kunkel B A., Held D W., & Potter D A., (2001).** Lethal and sublethal effects of bendiocarb, halofenozide and imidacloprid on *Harpalus pennsylvanicus* (Coleoptera: Curculionidae) following different modes of exposure in turfgrass. *J.Econ.Entomol.*, **94**: 60-67.
- Laemmli V K., (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lafont R., Dilebaue J P., Dethys L., Mauchamp B., & Pennatier J L., (1974).** Proportion of B. ecdysone. In hemolymph of *Pieris brassicae* (Lepidoptera) during the nymphal stage. *Acad.Sci.*, **279(D)**: 1911-1914.
- Lafont R., Dauphin-Villemant C., Warren J T., Rees H H., (2005).** Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive molecular insect science*. Oxford: Elsevier; p. 125–95.
- Lagueux M., Harry P., & Hoffman J A., (1981).** Ecdysteroids are bound s of to vitelling in newly laid eggs of *Locusta*. *Mol. Cell. Endocrinol.* P. 224- 325.
- Lakbar C., (1999).** Effets de deux régulateurs de croissance, le RH-0345 et le pyriproxyfene sur le développement de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Mag., Univ. D'Annaba, Algerie.
- Lamango N S., & Issac R E., (1994).** Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly *Musca domestica* that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. *Biochem.J.* **299**: 651-657.
- Lanot R, Thiebold J, Lagueux M, Goltzene F & Hoffmann J A. (1987).** Involvement of ecdysone in the control of meiotic reinitiation in oocytes of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera). *Dev Biol*, **12**:174-181.

- Lanot R., Dorn A., Günsten B., Thiebold J., Lagueux M., Hoffman J A., (1989)** functions of ecdysteroids in oocyte maturation and embryonic of Insects, 260-270. In J. Koolmann (ed): Ecdysone, from chemistry to mode of action. *Thieme Stuttgart*.
- Laverdure A M., (1972).** L'évolution de l'ovaire chez les femelles adultes de *Tenebrio molitor* : La vitellogénèse. *J.Insect Physiol.*, **18**: 1369-1385.
- Lemeire E., Van.Camp J., & Smagghe G., (2007).** "Presence of angiotensin converting enzyme isoforms in larval Lepidoptera (*Spodoptera littoralis*)". *Peptides*. **28**, pp. 119-126.
- Lemeire, E., Vanholme B., Van.Leeuwen T., Van.Camp J., & Smagghe G., (2008).** "Angiotensin- converting enzyme in *Spodoptera littoralis*: molecular characterization, expression and activity profile during development". *Insect Biochem Mol Biol*. **38**, pp. 166–175.
- Lemoine A., 1980.** Ces protéines cuticulaires de T.molitor quelque méthodes de quantification et d'identification. Rapport DEA et entomologie Université de Dijon.
- Li C., Kapitskaya M Z., Zhu J., Miura K., Sergraves W., Raikhel A S., (2000).** Conserved molecular mechanism for stage specificity of the mosquito vitellogenic response to ecdysone. *Dev.Biol.* **224**: 96-110.
- Li X., Schuler M A., & Berrrenbaum M R. (2007).** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotic. *Ann. Rev. Entomol.*, **52**, 231-253.
- Lucantoni L., Giusti F., Cristofaro M., Pasqualini L., Esposito F., Lupetti P., Habluetzel A., (2006).** Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue Cell.*, **38(6)**: 361-371.
- Lumbreas C I., Galante E ., & Mena I., (1991).** Ovarian condition as an indicator of the phenology of *Bubas bubas*. *Ann.Entomol.Soc.Am.* **84**: 190-194.
- Maamcha Z., (1997).** Etude bioécologique de la pyrale de farine *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Effet du Flucycloxyuron à l'égard des nymphes sur la sécrétion cuticulaire. Mag., Univ. d'Annaba, Algérie.
- Maiza A., Kilani S., Fraine J P., Aribi N., Soltani N. (2004).** Reproductive effects in German cockroach by ecdysteroid agonist RH- 0345, juvenile hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **69 (3)**: 257–266.
- Mansingh A., Steele R W., (1974).** Effects of farnesyl methyl ether on the hemolymph of ovarian proteins of the tent Caterpillar, *Malacosoma americanum*. *J. Insect. Physiol.*, **21**: 733-740.
- Marchal E., Vandersmissen H P., Badisco L., Velde S V D., Verlinden H., Iga M., Wielendaele P V., Huybrechts R., Simonet G., Smagghe G., Broeck j V.,**

- (2010). Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review. *Peptides* **31**: 506–519
- Marcous N., Poels J., Hens K., Francis C., & Huybrechts R., (2004).** “Structure, evolutionary conservation and functions of angiotensin- and endothelin-converting enzymes”, *Int. Rev. Cytol.* **239**, pp.47-97.
- Margaritis L H., (1985 a).** Structure and the physiology of the eggshell. In: Gilbert L.H., Kerkut G. a. (Eds). *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 6. Pergamon Press, Oxford. UK, pp. 151-230.
- Margaritis L H., Mazzini M., (1998).** Structure of the egg. In: Harrison. F. W., Loke M. (Eds), *Microscopic Anatomy of invertebrates, Insecta*. Vol. 11 c. Wiley-Liss, New York, pp. 995 – 1037.
- Martin D., Wang S F., Raikel A S., (2001).** The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor. *Mol. Cell. Endocrin.*, **173** : 75-86.
- Mauer H R., (1991).** Diselectrophoresis and related tecnics of polyacrylamid gel electrophoresis. Walter degoryter. Berlin.
- Meskache R. & Soltani-Mazouni N., (2013).** Activité comparée de quatre agonistes de l’hormone de mue chez *Ephestia kuehniella*: composition biochimique des testicules et potentiel reproducteur. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 2012, **138** (1-4): 177-187.
- Mc Ewen F I., (1978).** Food production. The challenge of pesticides. *Biosci.*, **28**: 773-778.
- Michalik J., Chojnicka B & Cymborowski B. (1996).** Vitellogenesis in virgin and mated females of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Acta. Biochem. Pol.* **43**: 623-632.
- Mirth C., Shingleton A W., (2012).** Intergrating body and organ size in *Drosophila*; Recent advances and outstanding problems. *Frontiers in Endocrinology*, **3**: 49.
- Nauen R. & Elbert A., (2003).** European monitoring of resistance to insecticides *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with reference to imidacloprid. *Bull. Entomol. Res.*, 93: 47-54.
- Neudueser D., Warren J T., Gilbert L. & Cohen S M., (2005).** Molting defective is requied for ecdysone biosynthesis. *Devp. Biol.*, 280: 362-372.
- Neville A C., (1975).** Biology of the arthropod cuticle. Springer-Verlag (New York).
- Nijhout H F., (1994).** Insects Hormones, Princeton University Press, Princeton, NJ, p. 267.
- Niwa R., Namiki T., Ito K., Shimada-Niwa Y., Kiuchi M., Kawaoka S., (2010).** Non-molting glossy/shroud encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that the function in the ‘Back’ of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Develop.*, **137**: 1991-1999.

- Osorio A., Martínez A M., Schneider M I., Díaz O., Corrales J L., Avilés M C., Smagghe G., & Pineda S., (2008)** Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. *Pest Manag. Sci.* **64**: 1001-1007.
- Ou Q., Magico A., King-Jones K., (2011).** Nuclear receptor DHR4 controls the timing of steroid hormones pulses during *Drosophila* development. *Plos Biology*, 9e1001160.
- Pasteur N. & Reymond M. (1996).** Insecticide resistance genes in mosquitoes: the mutation, migration and selection in field population. *Journal of heredity* **87**: 444- 449.
- Perveen F., (2011).** “Effects of sublethal doses of chlorfluazuron on the testicular biochemical constituents of *Spodoptera litura*”. *African Journal of Biotechnology*. 10, pp. 8956-8964
- Peter W K., Sonya Baird M A., Ramaswamy B., (2002).** Morphology and formation of the eggshell in the tarnished plang bug, *Lygus lineolans* (Palisot de beauvois) (Hemiptera: Miridea). *Arthropod structure and development*. **31**: 131-146.
- Pineda S., Martínez A M., Figueroa J I., Schneider M I., Del Estal P., Viñuela E., Gómez B., Smagghe G., & Budia F., (2009).** Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis*. *J. Econ. Entomol.* **102**: 1490-1496.
- Porcheron P., Moriniere M., Grassi J. & Paradelles P., (1989).** Developement of as competitive enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetyl cholinesterase as label *J. Insect.Biochem.***19**: 117-122.
- Puente X S., Sanchez L M., Overall C M., & Lopez-Otin C. (2003).** Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 544–558
- Raikhel A S. & Dhadialla T S., (1992).** Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Ann. Rev. Entomol.*, **37**: 217-251
- Raina A K., Klun J A., (1984).** Brain factor control of sex pheromone production In the female corn earworm moth. *Science*, **225**: 531- 533.
- Rameswamy S B., Shengqiang S., Yong I P., & Fanrong Z., (1997).** Dynamics of juvenile hormone-mediated gonadotropism in the Lepidoptera. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **35**: 539-558.
- Rees H H., Mendis A H W. (1984).** The occurrence and possible physiological significant of ecdysteroid during nematode and cestode development. In Hoffman JA, *Poched M(eds) Biosynthesis, Metabolism and mode of action of invertebrate hormones*, Springer Berlin pp 338-345.
- Rees H H. & Isaac R E., (1985).** Biosynthesis and metabolism of ecdysteroids and methods of isolation and identification of the free and conjugate compounds. In *Methods*

- Enzymol. Law J.H., Rilling H.C., (eds): *Academic Press, New York.*, **111**: 377-410.
- Rees H H., (1995).** Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function. *Eur. J. Ent.*, **92**: 9-39.
- Retnakaran A., Kerll P., Feng Q., & Arif B., (2003).** Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **54**: 187-199.
- Rewitz, K F., Rybczynski, R., Warren, J T., & Gilbert, L I. (2006a).** Developmental expression of *Manduca shade*, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Mol Cell Endocrinol* **247** (1): 166-174.
- Rewitz K F., Rybczynski R., Warren J T., & Gilbert L I. (2006b).** The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem Soc Trans*, **34** (6): 1256-1260.
- Rewitz K F., Yamanaka N., O'Connor M B., (2013).** Developmental Chckpoints and Feedback Circuits Time insect Maturation. *Current Topics in Developmental Biology*, **103**: 1-33.
- Richardson M L. & Lagos D M. (2007).** Effects of a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen, on the apterous from of soybean aphid (*Aphis glycines*). *Journal of Applied Entomology*, **131**: 297-302.
- Rideout E J., Marshall L., Grewal S S., (2012).** Drosophila RNA polymerase III repressor Maf1 controls body size and developmental timing by modulating tRNAiMet synthesis insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, **109**: 1139-1144.
- Riddiford, L M., (1985).** Hormone action at cellular level. In: G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (eds), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol.8. Pergamon, Oxford. , pp. 37-84
- Riddiford L M., (1994).** Cellular and Molecular action of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect. Physiol.* **24**: 213-243.
- Riddiford L M., (1996).** Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In *metamorphosis*, Gilbert L.I., Tata J.R. and Atkinson B.G. (Eds), *Academic Press. Inc.*, **6**: 223-243.
- Reberts P E., and Willis J H., (1980).** The cuticle proteins of *Tenebrio molitor*. *Developmental Biology*, **75**: 59-69.
- Robker R L., Akison L K., Bennett B D., Thrupp P N., Chura L R., Russell D L., Lane M., Norman R J., (2009).** Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* **94**(5): 1533-1540.

- Roma G C., Bueno O C., Camargo-Marthias M I., (2010).** Morpho-physiological analysis of the insect fat body: *Micron.*, **41(5)**: 395-401.
- Romana I. Pazscual N. & Bellés X., (1995).** The ovary is the source of circulating ecdysteroids in *Blatella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Eur.J. Ent.*, **92**:93-103.
- Ruegg R P., Orchard I., & Davey K G., (1992).** 20-hydroxyecdysone as a modulator of activity in neurosecretory cells of *Rodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, **28**:243-248.
- Rybczynski R., (2005).** Prothoracicotropic hormone. In Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive Molecular Insect. Science*. Oxford: Elsevier; p.61–123.
- Sahlèn G., (1994).** Ultrastructure of eggshell of *Aeshna juncea* (L.) (Odonata. Aeshnidae). *Int. J. Embryol.*, **23**: 345-354.
- Saito T. & Hama H., (2000).** Carboxylesterase isozymes responsible for organophosphate Resistance in cotton aphid. *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *App.Entomol.Zool.*, **35**(1):171-175.
- Sakurai S. & Gilbert L I., (1990).** Biosynthesis and secretion of ecdysteroids by the prothoracic glands. In Molting metamorphosis. (Eds. Ohnishi and Ishizaki H.). *Japan. Sci. Soc. Press.* p. 83-106.
- Salem H., Smagghe G., Degheele D., (1997).** Effects of tebufenozide on oocyte growth in *Plodia interpunctella*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **62**(1): 9-13.
- Scharf M E., Kaakeh W., Bennett G W., (1997).** Changes in an insecticide-resistant field population of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) after exposure to an insecticide mixture. *J. Econ. Entomol.*, **90**: 38-48.
- Scharf M E., Lee C Y., Neal J J. & Bennett G W., (1999).** Cytochrome P450 MA expression in insecticide resistant German cockroaches. (Dictyoptera: Blattellidae) *J. Econ. Entomol.*, **92**(4): 788-793.
- Schlothman L L., & Bonhag P F., (1956).** Histology of the ovary of the adult mealworm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera Tenebrionidae). *Univ. Calif. Pub. Entomol.* **11**: 314-331.
- Schneider W C., (1957).** Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In methods in enzymology Vol. III. (Ed. by Colowick S. P. and Kaplan N. O.), pp: 680-684. *Acad. Press, N. Y.*
- Schoofs L., Veelaert D., De Loof A., Huybrechts R. & Isaac R E., (1998).** Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. *Brain Res.* **785**: 215–227.
- Schulz D J. Sullivan J P. & Gene E R., (2002).** Juvenile hormone and octopamine in regulation of division of labor in Honey bee colonies. *Hormon. Behavi.* **42**: 222-231.

- Shen X Z., Xiao H D., Li P., Lin C X., Billet S., Okwan-Duodu D., Adams J W., Bernstein E A., Xu Y., Fuchs S. (2008 b).** New insights into the role of angiotensin-converting enzyme obtained from the analysis of genetically modified mice. *J. Mol. Med.* **86**: 679-684.
- Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., New Hall A. & Freidman L., (1966).** A method for the sequential quantitative separation an glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt. Biochem.* **19**: 415-428.
- Siegfried B D & Scott J G., (1992).** Insecticide mechanisms in the German cockroach. *Blattella germanica* (L.), mechanisms of insecticide resistance. *American Chemical Society, Washington, DC.*
- Smagghe G. & Degheele D., 1994a.** Action of the non steroidal ecdysteroid mimic RH-5849 on larval development and adulte reproduction of insects of differents order. *Invert. Reprod. Dev.*, **25**: 227- 236.
- Smagghe G., Carton B., Wesemael W., Ishaaya I., Tirry L., (1999).** Ecdysone agonistes-mechanism of action and application on *Spodoptera* species, *Pestis. Sci.* **55** : 343-389.
- Smagghe G., Carton B., Wesemael W., Ishaaya I., & Tirry L. (1999a).**Ecdyson agonist- mechanism of action and application on *Spodoptera exigua* species.*Pestic. Sci.***55**: 343-389. Agonist-mechanism of action and application on *Spodoptera exigua* species.*Pestic. Sci.***55**: 343-389.
- Smith S. L., (1985).** Regulation of ecdysteroid titer. Synthesis, in: comprehensive insect *Physiology, Biochemistry and pharmacology*, vol. 1.7. Kerkut G and Gilber L.I. (eds.) *Pergamon Press. Oxford.*, 7: 323-332.
- Soller M. Bownes M. & Kubli E., (1999).** Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev. Biol.*, 208: 337-351.
- Soltani-Mazouni & Soltani, (1992) .,** Effet du diflubenzuron sur les métabolites hémolymphatiques et ovariens chez *Tenebrio molitor* L. pendant la maturation sexuelle. *Mém. Soc. Belge ent.*, n° 35, pp 743-747.
- Soltani-Mazounin N., & Soltani N., (1994).** Diflubenzuron effected DNA synthesis in the ovaries of *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Reprod. Dev.*, **25**: 19-21.
- Soltani-Mazouni N., (1994).** Effects of ingested diflubenzuron on ovarian developpement during the sexual maturation. *Tissu. cell.* **26(3)**: 439-445.
- Soltani-Mazouni N., Soltani N., (1995).** Effet du Diflubenzuron en traitement *in vivo* et *in vitro* sur la morphométrie de l'ovaire de *Tenebrio molitor*. *Med. Fac. Landbouww.Univ. Gent.*, **60** (35) :961-967.
- Soltani-Mazouni N. & Soltani N. (1995).** Protein synthesis in the fat body of *Tenebrio molitor* (L) during oocyte maturation: effect of diflubenzuron, cyclohemixide and starvation. *J. Stored Prod. Res.*, **31**, 117-122.

- Soltani-Mazouni N., Quennedey B & Delachambre J. (1996).** Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under *in vivo* and *in vitro* conditions affects diflubenzuron. *J.Stored.Prod.Res.*, **32**(3), 205-212.
- Soltani-Mazouni N., Taïbi F., Smaghe G., & Soltani N., (2000a).** Comparative action of two insect growth regulators, RH-0345 and KK-42, on reproductive events in adult females of mealworm. *Med.Fac.Landbouww.Univ.Gent*, **65** /2a :453-450.
- Soltani-Mazouni N., Amrani L., Boudraa I., Zerguine K., (2000b).** Inhibitory activity of an imidazole compound on ecdysionsynthetic organs in mealworm under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Revue Sci et techno.* **14** : 125-128.
- Soltani-Mazouni N., Taïbi F., & Zerguine K., (2001).** Evaluation de deux régulateurs de croissance sur le potentiel reproducteur d'un ravageur des denrées stockées *Revue synthèse* ; **9** : 95- 103.
- Soltani-Mazouni N., Boukachabia A & Smaghe G. (2004).** Biological activity of some moulting hormone agonists in mealworm : ecdysteroid and protein analysis in ovaries. *Revue Synthèse*, **14**, 7-10.
- Soltani-Mazouni N., Bouteldja D., Lemeire L., & Smaghe G., (2007).** *In vivo* effect ACE inhibiting mealworms on ovarian composition and ecdysteroid Amounts .*Comm.Appli.Biol.Sci, Ghent University*, 72/3, **623**.
- Soltani-Mazouni N., & Hami M., (2010).** Effets de deux agonistes des ecdystéroïdes sur la reproduction chez *Ephestia kuehniella* (Insectes, Lépidoptères) : dosage des acides nucléiques et des protéines ovariens. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat*, N° **47**, Tome I, 153-156.
- Soltani-Mazouni N., Hami M. & Gramdi H., (2012).** Sublethal effects of methoxy - fenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia Kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction and Development*, Vol. **56**(2):157-163.
- Soltani N, Semir M, Djebbar R (1986).** Contribution à la bioécologie de *Cydia pomonella* dans le verger de cognassier à Annaba: essai de piégeage comparatif et cycle évolutif. *Ann Inst Nat Agron Alger*.**1**: 196-206
- Soltani N. (1987).** Effet du diflubenzuron sur la reproduction chez *Tenebrio molitor* (L.). *Annales ANPP III.*, **6**, 471-475.
- Soltani N., Delachambre J. & Delbecque J P., (1989).** Stage specific effects of diflubenzuron on ecdysteroids titers during the development of *Tenebrio molitor*: evidence for a change in hormonal source. *Gen. Comp. Endoc.*, **76**: 350-356.
- Soltani N., & Soltani –Mazouni N., (1992).** Diflubenzuron and oogenesis in colding moth, *Cydia pomonella* L., *Pest. Sci.*, **34**: 257-261.

- Soltani, N., Soltani-Mazouni, N., Quennedey, B., Delachambre, J., (1996).** Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under *in vivo* and *in vitro* conditions: effects of diflubenzuron. *J. Stored Prod. Res.* **32** (3), 205–212.
- Soltani N., Pitoizet N., Soltani-Mazouni N., Delachambre J & Delbecque J P., (1997).** Activity of anti-ecdysteroid compound (KK-42) on ovarian development and ecdysteroid secretion in mealworm. *Med. Fac. Lanbouww. Univ. Gent.*, **62(2)**: 531-537.
- Soltani N., Smagghe, G., Soltani-Mazouni, N., (1998).** Evaluation of the ecdysteroid agonist RH-0345 on the hormonal production by integumental explants and ovaries in mealworms. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **63** (2b), 547–554.
- Soltani N., Amrani L., Soltani-Mazouni N., Smagghe G., (1999).** Evaluation of the the ecdysteroid agonist RH-0345 in mealworms: analysis of ovarian proteins and structure of follicule. *Med. Fac. Lanbouww. Univ. Gent.*, **64**; 2279-285.
- Soltani, N., Berghiche, H., & smagghe, G., (2000).** Action of some molting hormone agonists on integumental explants of mealworm: ecdysteroid production, cuticle deposition and protein analysis, *Med Fac. Landbowww.Univ.Ghent.* **65/2a**:431-439.
- Soltani N & Berghiche H., (2001).** Protection Phytosanitaire : Evaluation *in vitro* de nouveau insecticides agonistes de l'hormone de mue. *Revue synthèse*, 9: 67-77.
- Soltani N, Aribi N, Berghiche H, Lakbar S, Smagghe G. (2002).** Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion in *Tenebrio molitor* pupae *in vivo* and *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **72**: 83–90.
- Srivastrava R.P. (1970).** Electrophoretic behaviour of cuticular proteins of different developmental stages of *Galleria mellonella*. *J.Insect Phsiol.* **16**: 2345-2351.
- Stay B., Sereg Bachmann J A., Stolzman C A., Frairbaira S F., Yu C E & Tobe S S. (1994).** Factors affecting allatostatinerelease in cockroach (Diploptera: Punctata: nerve secretion, juvenile hormone analog and ovary *.Insect. physiol.* **35**: 393-372.
- Styrishave B., Lund T., Andersen O., (2008).** Ecdysteroids in female shore crabs *Carcinus maenas* during the moulting cycle and oocyte development. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **88**: 575-581
- Sun X., Barett B.A, Biddinger D.J., 2000.** Fecundity and fertility reductions in adult leaf-frollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonist tebufenozide and methoxyfenoside. *Entomol. Exp. Appl.* **94**: 75-83.
- Sutton-McDwall M L., Gilchrist R., Thompson J G., (2010).** The pivote role of glucose metabolism in determining oocyte developmental comptence. *Reprod.*, **139(4)** : 685-695.

- Swervers L. & Iatrou, K. (1999).** The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid –induced regulatory cascade and arrests silkworm oogenesis and mid-vitellogenesis. *Insect.Biochem.Mol. Biol.***29**: 955-963.
- Taïbi F., (2000).** Activités de quelques effecteurs de la biosynthèse de l'hormone de mue sur la production d'ecdystéroïdes ovariens, la ponte et la viabilité des oeufs chez *Tenebrio molitor*. Thèse de Master. Université d'Annaba. Algérie.
- Taïbi F., Smagghe G., Amrani L. et Soltani- Mazouni N., (2003).** Effect of ecdysone agonist RH- 0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comparative Biochemistry and physiology Part C* 135: 257- 267.
- Taïbi F., (2007).** Etude comparée du développement et de la reproduction chez deux ravageurs des denrées stockées *Ephestia kuehniella* et *Tenebrio molitor* : Aspect endocrinien en rapport avec l'impact d'un mimétique de l'hormone de mue, le RH-0345. Thèse de doctorat en biologie et physiologie animale, Université d'annaba. Algérie.
- Telfer W H. (2009).** Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect Sci.* **9**: 50. (insectscience.org / 9.50).
- Thompson M.J., Rees H.H. et Wilzer K.R., (1987).** Isolation and identification of 26-hydroxyecdysone 2-phosphate: An ecdysteroid conjugate of egg and ovaries of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Physiol.* **4**: 183.
- Tine S., Aribi N. & Soltani N., (2011).** Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae) : Insecticidal activity and reproductive effects. *African Journal of Biotechnology* **10**(85): 19816-19824.
- Tong-Xian L. & Stansly A., (2004).** Lethal and sublethal effects of two insect growth regulators on adult *Delphastus catalinae* (Coleoptera; Coccinellidae), a predator of whiteflies (homoptera:aleurodidae) Elsevier. *Sci. Biological. Control.*, **30**: 298-305.
- Trougakos I. P. & Margaritis L. H., (2002).** Novel morphological and physiological aspects of insect Eggs. In: Hiker M. Meiners T. (Eds), *Chemioecology of insect Eggs and Egg Deposition* Blackwell Verlag GmbH, Berlin, Vienna., pp.3-36.
- Tsuchida K., Nagata M., Suzuki A., (1987).** Hormonal control of ovarian development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **5**: 167-177.
- Tunaz H., & Uygün N., (2004).** Insect growth regulator for insect pest control. *Turk. J. Agric.* **28**: 377-387.
- Vandingenen, A., Hens K., Macours N., Zhu W., Janssen I., Breuer M., Deloof A., & Huybrechts R., (2001).** ‘‘Captopril, a specific inhibitor of angiotensin converting enzyme, enhances both trypsin and vitellogenin titers in the grey fleshfly *Neobellieria bullata*’’. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **47**, pp. 161-167.

- Vanheudsen H. and Candlaw J. H., (1989).** An Insect transport particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **264**: 17287 – 17292.
- Ullman S. L., (1973).** Oogenesis in *Tenebrio molitor*: Histological and autoradiographical observations on pupal and adult ovaries. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **30**(1): 179-217
- Vanheudsen H., and Candlaw J. H., 1989.** An Insect transport particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **264**: 17287 – 17292.
- Vercruyse, L., Gelman D., Raes E., Hooghe B., Vermeirssen V., Van Camp G., Smagghe G., (2004).** “The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril reduces oviposition and ecdysteroid levels in Lepidoptera”. *Insect. Biochem. Physiol.* **57**, pp. 123-132
- Vincent, J.F.F. et Wegst, U.G.K.(2004).** Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod structure and development*, **33**, 187-199.
- Wang S. F., Zhu, J., Martin, D. et Raikhel, A. (2004).** Regulation of vitellogenin gene expression by ecdysteroids. In: *Reproduction: Biology of Invertebrates*, Vol.12, Part B: progress in vitellogenesis, A.S. Raikhel and T.W. Sappington eds), Science Publishers, Enfield, USA/ Plymouth, UK, pp.69-94.
- Westerlund S. A. & Hoffmann K. H., (2004).** Rapid quantification of juvenile hormones and their metabolites in insect haemolymph by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 540-543.
- Wiens A. W., Gilbert T., (1968).** Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in leucophlebotomidae. *J. Insect; Physiol.* **13**: 779-794.
- Wigglesworth V. B., (1934).** Factors controlling moulting and metamorphosis in an *Insect* *Nature, London*, **135**, 725-726.
- Wigglesworth V. B., (1965).** The principles of insect physiology, Methuen and Co., London
- Wigglesworth V. B., (1972).** The principles of insect physiology. *Seventh Edition*. Published in the USA by Chapman and Hall. University Press Cambridge. New York, 827.
- Wijffels, G., C., Fitzgerald, J., Gough, G., Riding, C., Elvin, and D., Kemp, (1996).** “Cloning and characterisation of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system”. *Eur. J. Biochem.* **237**, pp. 414-423.
- Williams T. A., Michaud A., Houard X., Chauvet M. T., Soubrier F., & Corvol P., (1996).** *Drosophila melanogaster* angiotensin I-converting enzyme expressed in *Pichia pastoris* resembles the C domain of the mammalian homologue and does not require glycosylation for secretion and enzymic activity. *Biochem. J.* **318**: 125–131.

- William J C K., (1971).** Follicle cell protein synthesis in moth, *Ephestia kuehniella* oocytes. *Insect Physiol.*, Vol., 17: pp. 217-232.
- Yao T P., Segraves W Q., Oro A E., & Evans R., (1992).** Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *cell.*, **71**: 36- 72.
- Yamashita, O., & Suzuki K., (1991).** Roles of morphogenic hormones in embryonic diapause, pp. 81-128. *In* P.A. Gupa (eds): Morphogenic hormones of Arthropods. Roles in histogenesis and organogenesis. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, 3:81-128.
- Yezli-Touiker S., Soltani-Mazouni N. (2011).** Profil des ecdystéroïdes durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae). *Synthèse.* **22**: 49–55.
- Yin CM. 1994.** Juvenile hormone III bisepoxide: new member of insect juvenile hormone family. *Zool. Stud.* **33**: 237-245.
- 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.
- Zerguine K., (1998).** Activité *in vivo* d'un inhibiteur de la biosynthèse des ecdystéroïdes, dérivé de l'imidazole, (KK-42) sur la reproduction de *Tenebrio molitor* : Thèse de Magister en physiologie animale: option application agronomique et médicales. ISN. Université d'Annaba.
- Zhu Y C., Snodgrass- Gordon L., Chen M S., (2007).** Comparative study on glutathione S-transferase activity, cDNA, and gene expression between malathion susceptible and resistant strains of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Pestic. Biochem. Physiol.* pp: 62-72.
- Zimowski 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)

ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publication (1)

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

Communications internationales (8)

. **Samira YEZLI - TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI.** 2009 Evaluation des effets secondaires d'un médicament (captopril) sur un modèle de laboratoire *Ephestia kuehniella* : sécrétion cuticulaire. **20^{ème} Journées Biologique Association Tunisienne des Sciences Biologiques .5^{ème} Congrès International de Biotechnologie TUNISIE**

. **Samira YEZLI-TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI.** Evaluation des effets d'un médicament (captopril) sur un modèle de laboratoire *Ephestia kuehniella* : Production de l'hormone de mue. **2^{ème} Colloque Francophone en Environnement et Santé. Université Badji Mokhtar Annaba.**

Samira YEZLI-TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI. Profil hormonal et sécrétion cuticulaire chez un Lépidoptère ravageur des denrées stockées. Colloque international de Biologie Environnement SKIKDA (CIBE' 2009)

. **Samira YEZLI-TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI.** Contribution à l'étude de la biologie d'un Lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* . Le deuxième Séminaire Méditerranéen sur les pâturages Alimentation et sante du Cheptel **11 et 12 Octobre 2009.**

. **Samira YEZLI-TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI.** Evaluation des effets secondaires d'un médicament (captopril) sur le profil hormonal d'un modèle de laboratoire *E. kuehniella*: production de l'hormone de mue. **Les Journées Internationales de Biotechnologie 2010 de l'Association Tunisienne de Biotechnologie 19-22 Décembre 2010, Yasmine Hammamet**

. **Samira YEZLI-TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI.** Effets d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine(ECA), le captopril sur le profil hormonal des ovaires d'un ravageur des denrées stockées *E. kuehniella*, au **3^{ème} Congrès Franco-Maghrébins de Zoologie et d'Ichtyologie- Maro Marrakech du 06-11-2012 au 10-11-2012.**

. Samira YEZLI-TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI. Evaluation des effets d'un médicament (captopril) sur un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*: Composition biochimique des ovaires. 24^{ème} Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) qui se tiendra à Sousse- Tunisie du 25 au 28 Mars 2013

. Samira YEZLI-TOUIKER & Nadia SOLTANI-MAZOUNI. Activity of inhibitor of the angiotensin converting enzyme and ecdysteroid contents of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Les Journées Internationales de Biotechnologie (2013)* 21-24 Décembre 2013, Hammamet (Tunisie).

Profil des ecdystéroïdes durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae)

Samira Yezli-Touiker et Nadia Soltani-Mazouni

Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar, BP 12, Annaba 23000, Algérie.

Accepté le 28/07/2010

ملخص

Ephestia kuehniella زيلر تسمى عثة الطحين تسبب أضرار أساسا إلى مخزون الطحين والسميد. وهي أيضا مصدرا للحساسية تسبب الربو والتهاب الأنف. هذه الدراسة هي نهج الفسيولوجية التي تهدف إلى تحديد توقيت إفراز الجليد وارتباطه مع إفراز هرمون الانسلاخ خلال تطور العذارى الإناث. هرمون الانسلاخ يستخرج من الجسم كله وتحسب كميته بشكل فردي بطريقة المعايرة الانزيمونية باستخدام أجسام مضادة polyclonal البيروكسيداز باعتباره اثر TMB كاشف. سمك القشرة القديمة والجديدة حددت على مقاطع نصف رقيقة للجليد معدة بطريقة المجهر الإلكتروني. مستويات هرمون الانسلاخ خلال الأيام الخمسة الأولى من طور الانسلاخ العذري يظهر بتسجيله ذروة واحدة في اليوم الخامس. سمك القشرة تزداد مع التقدم في السن، وتبلغ ذروتها في اليوم الثالث من طور الحضانة والذي يتزامن مع apolyse. إفراز الجليد الجديد يكون مباشرة بعد apolyse ويبلغ الحد الأقصى ($7,27 \pm 0,05$) في اليوم التاسع من طور العذارى.

الكلمات المفتاحية: *Ephestia kuehniella*؛ هرمونات؛ الجليد؛ المجهر الإلكتروني.

Résumé

Ephestia kuehniella Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) appelée communément pyrale de la farine est un ravageur majeur des denrées stockées. Cette espèce est aussi une source allergénique qui provoque l'asthme et des rhinites. La présente étude est une approche physiologique qui vise à déterminer la chronologie de la sécrétion de la cuticule et ses corrélations avec le profil de l'hormone de mue au cours du développement des chrysalides femelles. Les épaisseurs de l'ancienne et de la nouvelle cuticule ont été déterminées sur des coupes semi-fines du tégument préparées selon la technique conventionnelle de microscopie électronique à transmission. Le dosage de l'hormone de mue (ecdystéroïdes) a été réalisé individuellement dans les extraits de corps entier de chrysalides femelles avec une méthode enzymo-immunologique utilisant un anticorps polyclonal de lapin, un traceur la peroxydase et un révélateur la tétraméthyl benzidine. L'évolution des taux hormonaux au cours de la métamorphose montre un seul pic localisé à cinq jours. L'épaisseur de la cuticule nymphale présente un maximum au troisième jour de la vie nymphale. La nouvelle cuticule adulte est sécrétée immédiatement après l'apolyse; elle mesure $7,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$ à la veille de l'exuviation adulte (9 jours).

Mots clés : *Ephestia kuehniella* ; Métamorphose ; Hormones ; Ecdystéroïdes ; Cuticule.

Abstract

Ephestia kuehniella Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) commonly called Mediterranean flour moth causes damage mainly to stocks of flour and semolina. This study is a physiological approach and aimed the determination of the cuticle cycle in order to establish temporal correlations with the molting hormone level during the development of female pupae. Molting hormone was extracted from whole body and measured by an enzyme immunoassay using a rabbit polyclonal antibody, peroxydase as a tracer, and tetramethyl benzydine as reagent. The thickness of both old and new cuticles was determined on semi-thin sections of integument prepared following the conventional technique of transmission electron microscopy. The hormonal amounts present a single peak that occurs at day 5 following pupal ecdysis. The thickness of the pupal cuticle increased during the pupal development reaching a maximum at day 3. The new adult cuticle is secreted immediately after the apolysis (day 3) and reached a thickness of $7.27 \pm 0.05 \mu\text{m}$ at the adult ecdysis (day 9). The peak of ecdysteroid content coincides with the apolysis and could be related with initiation of the new cuticle.

Auteur correspondant: nadia_mazouni@yahoo.fr (Nadia Soltani-Mazouni)

Key words: *Ephestia kuehniella*; Metamorphosis; Hormone; Ecdysteroids; Cuticle.

1. INTRODUCTION

Les processus de développement et de reproduction chez les insectes sont contrôlés par deux principales hormones : l'hormone de mue (ecdystéroïdes) qui est un stéroïde polyhydroxylé responsable du déclenchement de la mue, et l'hormone juvénile, un sesquiterpène, qui détermine la nature de la mue [1-6]. La cuticule et son contrôle endocrinologique constituent des cibles potentielles spécifiques recherchées pour le développement de nouvelles molécules pesticides dans la lutte contre les ravageurs des cultures [7]. *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae) est un insecte ravageur majeur des denrées stockées. C'est un modèle biologique utilisé dans notre laboratoire et qui a fait l'objet de plusieurs travaux portant sur l'impact d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le flucycloxuron, sur le développement et la sécrétion cuticulaire [8], et sur le potentiel reproducteur et l'épaisseur du chorion [9]. Les mimétiques de l'hormone de mue constitue une nouvelle classe d'insecticides sélectifs provoquant des mues létales précoces [10]. Ces molécules ont un grand potentiel d'utilisation dans la lutte contre les ravageurs des denrées stockées particulièrement contre les Lépidoptères [11]. Récemment, nous avons montré chez *E. kuehniella* que le tebufenozide est le plus efficace parmi les trois agonistes des ecdystéroïdes testés [12] et qu'il affecte le potentiel reproducteur [13]. Nos connaissances sur l'endocrinologie de cette espèce sont toutefois insuffisantes. C'est pourquoi, la présente étude vise à déterminer les taux des ecdystéroïdes dans les extraits de corps entier des chrysalides femelles et d'établir d'éventuelles corrélations entre les taux hormonaux et la sécrétion cuticulaire au cours de la métamorphose

chez *E. kuehniella*. Les résultats acquis serviront de base à des expérimentations sur les nouveaux régulateurs de croissance des insectes agissant sur les principales hormones de développement [6, 7, 11].

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel biologique

Ephestia kuehniella est un Lépidoptère ravageur des denrées stockées qui provoque des dégâts principalement aux stocks de farine et de blé. C'est un modèle biologique commode de laboratoire. L'élevage se fait dans des bocaux contenant de la farine et fermés avec du tulle. Les conditions optimales de développement sont une température de 27 °C et une humidité relative de 80 %.

2.2 Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes ont été extraits du corps entier et dosés par une méthode immuno-enzymatique (EIA) [14], utilisée précédemment [15]. Brièvement, le dosage est réalisé avec un anticorps polyclonal de lapin, un conjugué de la 20-hydroxyecdysone (20E) couplé à la peroxydase comme traceur et la tétraméthylbenzidine comme révélateur. L'anticorps utilisé a 6 fois plus d'affinité pour l'ecdysone que la 20E [16]. La 20E étant généralement l'hormone principale, les résultats sont exprimés en pg équivalent 20E/mg de tissu corporel. L'anticorps et le traceur enzymatique ont été aimablement fournis par Dr. J.P. Delbecq (Université de Bordeaux I, France).

2.3 Mensuration des épaisseurs des cuticules

Les 4 premiers sternites abdominaux sont prélevés des chrysalides âgées de 1, 3, 5, 7 et 9 jours. Ils sont fixés dans un mélange glutaraldéhyde-paraformaldéhyde dans du tampon cacodylate [17] modifié [18] puis déshydraté et inclus dans un mélange Epon-Araldite [19]. Les coupes semi-fines ont été effectuées à l'ultramicrotome LKB V et colorées par le bleu de toluidine.

2.4 Analyse statistique

Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart-type ($m \pm s$). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel MINITAB (Version 13.31, PA State College, USA). Les valeurs moyennes ont été comparées deux à deux avec le test *t* de Student.

3. RESULTATS

3.1 Variation des taux d'ecdystéroïdes durant la métamorphose

Dans nos conditions expérimentales de température et d'humidité constantes, la

durée du développement nymphal est d'environ 9 jours. Les ecdystéroïdes ont été déterminés par EIA dans le corps entier des chrysalides femelles à différents âges au cours du développement nymphal. Ils sont exprimés en pg d'équivalent 20-hydroxyecdysone par mg de poids frais corporel. La variation du poids des chrysalides femelles est donnée dans le tableau 1. Le poids des chrysalides femelles diminue légèrement et de manière significative au cours de la métamorphose. Les taux hormonaux enregistrés à 0 et 1 jour ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$) ; ils augmentent significativement ($P < 0,05$) dès le troisième jour de la vie nymphale pour atteindre un pic (250 pg équiv. 20E/mg) localisé à cinq jours (Fig. 1). Une diminution significative ($P < 0,05$) est ensuite observée dès le septième jour pour atteindre un taux seulement de 50 pg/mg à la veille de l'exuviation adulte (9 jours). Les valeurs observées à 3, 5, 6, 7 et 9 jours sont significativement ($P < 0,05$) différentes entre elles. Enfin, les exuviations nymphale et adulte se font à des taux relativement bas.

Tableau 1. Evolution du poids (mg) des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, $n=6$). Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$).

| Temps (jours) | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Poids (mg) | 15,1 \pm 0,4a | 14,2 \pm 0,3b | 13,4 \pm 0,1c | 13,3 \pm 0,1c | 12,3 \pm 0,2d | 11,6 \pm 0,1e |

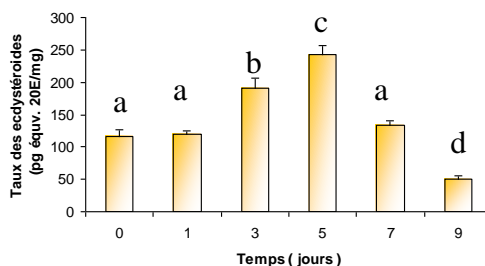


Figure 1 : Evolution du taux des ecdystéroïdes (pg équiv.20E/mg tissu) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm s$, $n= 6$). Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$).

3.2 Sécrétion cuticulaire durant la métamorphose

La cinétique et la séquence des principaux événements épidermo-cuticulaire durant la métamorphose ont été envisagées afin d'établir des corrélations avec les taux hormonaux. Les épaisseurs de la cuticule totale nymphale (ancienne cuticule) et de la nouvelle (cuticule pré-exuviale adulte) ont été estimées sur des coupes semi-fines du tégument périphérique à différents âges au cours de la métamorphose. Les résultats sont représentés dans les tableaux 2 et 3. L'épaisseur de la cuticule nymphale augmente significativement ($p < 0,05$)

avec l'âge pour atteindre un maximum de $13,83 \pm 0,1 \mu\text{m}$ au troisième jour et décroît significativement ($p < 0,05$) par la suite en raison de la digestion des couches profondes de l'ancienne cuticule (Tab. 2). La nouvelle cuticule ou cuticule pré-exuviale adulte est sécrétée immédiatement après l'apolyse (troisième jour) ; les épaisseurs augmentent progressivement et de manière significative ($P < 0,05$) pour atteindre un maximum de $7,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$ à la veille de l'exuviation adulte (9 jours) (Tab. 3).

Tableau 2. Evolution de l'épaisseur (μm) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm s$, $n = 6$). Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

| Temps (jours) | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Epaisseur (μm) | $7,80 \pm 0,05\text{a}$ | $11,00 \pm 0,1\text{b}$ | $13,83 \pm 0,1\text{c}$ | $12,27 \pm 0,07\text{d}$ | $10,90 \pm 0,2\text{b}$ | $8,03 \pm 0,05\text{e}$ |

Tableau 3. Evolution de l'épaisseur (μm) de la nouvelle cuticule (adulte) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* ($m \pm s$, $n = 6$). Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

| Temps (jours) | 3 | 5 | 7 | 9 |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Epaisseur (μm) | $0,00 \pm 0,00 \text{ a}$ | $5,05 \pm 0,07 \text{ b}$ | $6,10 \pm 0,05 \text{ c}$ | $7,27 \pm 0,02 \text{ d}$ |

4. DISCUSSION

Les ecdystéroïdes ont été impliqués par différents auteurs et chez plusieurs espèces d'insectes dans le contrôle d'un grand nombre de mécanismes physiologiques dont le principal est le phénomène de mue et de métamorphose [2, 3, 7]. Chez les insectes, les ecdystéroïdes sont formés à partir des stérols alimentaires qui seront transformés après ingestion en cholestérol. Ce dernier subit diverses oxydations et hydroxylations pour fournir l'ecdysone qui sera à son tour convertie dans les tissus périphériques en 20E par l'enzyme

ecdysone-20-monooxygénase [20]. Les taux des ecdystéroïdes et de l'hormone juvénile fluctuent tout au long du développement des insectes. Les pics hormonaux observés sont associés à des événements importants comme notamment les mues, la métamorphose ou la reproduction [20-22]. Selon les espèces un ou deux pic sont détectées durant la métamorphose : *Pieris brassicae* [23], *Leptinotarsa decemlineata* [24], *Heliothis zea* [25] et *Tenebrio molitor* [26] présentent un pic, tandis que *Galleria mellonella* [27] et *Cydia pomonella* [28]

ont en deux pics.

Du fait de sa structure, sa composition chimique et son renouvellement périodique contrôlé par des hormones, la cuticule est une caractéristique essentielle des insectes. Il est généralement admis que le processus de mue est initié par une augmentation des taux de 20E et se termine par leur chute et la sécrétion de l'hormone d'éclosion [6]. Le dosage des ecdystéroïdes au cours du développement nymphal chez les chrysalides d'*E. kuehniella* révèle la présence d'un seul pic qui coïncide avec l'apolyse et serait responsable de l'initiation de la sécrétion de la nouvelle cuticule, c'est à dire la cuticule pré-exuviale adulte. L'exuviation adulte s'effectue sous des taux d'ecdystéroïdes relativement bas confirmant les travaux antérieurs [6]. Le deuxième pic d'ecdystéroïdes, détecté au cours de la métamorphose chez certaines espèces [27, 28], est en rapport avec le développement ovarien [22, 28, 29]. Chez les chrysalides femelles de *C. pomonella* le deuxième pic est étroitement corrélé avec l'évolution de la taille de l'ovocyte basal et de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez *C. pomonella* [28]. Enfin, les valeurs observées chez *E. kuehniella* sont comparables aux taux hormonaux signalés chez d'autres espèces de Lépidoptères [30].

En conclusion, les variations des taux d'ecdystéroïdes au cours de la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sont avec les événements épidermo-cuticulaires. L'augmentation des taux serait responsable de l'induction d'un nouveau cycle cuticulaire. La sécrétion de la nouvelle cuticule intervient immédiatement après l'apolyse confirmant ainsi les travaux antérieurs faits sur d'autres espèces.

Références

[1] L.M. Riddiford, *Cellular and molecular action of juvenile hormone: I. General consideration and*

premetamorphic actions, Adv. Insect. Physiol., Vol. 24, 1994, p. 213-274.

[2] H.H. Rees, *Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function*, Eur. J. Ent., Vol. 92, 1995, p.9-39.

[3] G. Gäde, K.H. Hoffman et J.H. Spring, *Hormonal regulation in insects: Facts, Gaps and Future directions*, J. Physiol. Rev., Vol. 77, Issue 4, 1997, p.263-1032.

[4] G. Gäde et K.H. Hoffmann, *Neuropeptides regulating development and reproduction in insects*, Physiological Entomology, Vol. 30, 2005, p.103-121.

[5] M.W. Gilbert, R. Rybczynski et J.T., *Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway*. Annu. Rev. Entomol., Vol. 47, 2002, p.883-916.

[6] T.S. Dhadialla, A. Retnakaran et G. Smagghe, *Insect growth and development disrupting insecticides*, Comprehensive Insect Molecular Science (L.I. Gilbert, I. Kostas, and S. Gill, Eds), Vol. 6, Pergamon Press, New York, N.Y., 2005, p. 55-116.

[7] L. Dinan, *Ecdysteroid structure and hormonal activity*, Ecdysone: From chemistry to mode of action (J. Koolman Ed.), Thieme Stuttgart, 1989, p. 345-354.

[8] F. Bendjedou, Z. Bouslama, S. Chebira et N. Soltani, *Effets of flucycloxuron, a benzoylphenylurea, on growth, development and cuticle secretion, Ephestia kuehniella*. Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent, Vol. 63, Issue 2b, 1998, p. 575-580.

[9] M. Hami, F. Taibi et N. Soltani-Mazouni, *Effects of flucycloxuron, a chitin synthesis inhibitor, on reproductive events and thickness of chorion in meal worms*, Comm. Appl. Biol. Sci., Vol. 69, Issue 3, 2004, p.249-258.

[10] K.D. Wing, *RH- 5849, a non*

steroidal ecdysone agonist: effects on a Drosophila cell line, Sciences, Vo241, 1988, p.464-469.

[11] T.S. Dhadialla et R. Ross, *Bisacylhydrazines: novel chemistry for insect control*, Modern crop Protection Compounds, Ed. By Kramer W. and Schirmer U., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007, p. 773-796.

[12] M. Hami, F. Taibi, G. Smagghe et N. Soltani-Mazouni, *Comparative toxicity of three ecdysteroid agonist insecticides against the Mediterranean flour moth*, Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University, Belgium, Vol. 70, Issue 4, 2005, p.767-772.

[13] M.E.H. Khebbab, R. Gaouaoui et F. Bendjeddou, *Tebufenozide effects on the reproductive potential of the Mediterranean flour moth, Ephestia kuehniella*. Afr. J. Biotech., Vol. 7, Issue 8, 2008, p.1166-1170.

[14] P. Porcheron, M. Morinière, J. Grassi et P. Pradelles, *Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroid using acetylcholinesterase as label*, Insect Biochem., Vol. 19, 1989, p.117-122.

[15] N. Soltani, N. Aribi, H. Berghiche, S. Lakbar et G. Smagghe, *Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion, Tenebrio molitor pupae in vivo and in vitro*. Pestic. Biochem. Physiol., Vol.72, 2002, p.83-90.

[16] M.L. De Reggi, N. Pitoizet, B. Gharib et J.P. Delbecque, *New enzyme immunoassay for ecdysteroids using peroxidase enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies*, Xth ecdysone workshop, Liverpool, 1992, 6-7th April, Abstract, p.9.

[17] M.J. Karnovsky, *A formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolarity for use electron microscopy*, J. Cell Biol., Vol. 27, 1965, p.1374.

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

[19] W.A. Anderson et R.A. Ellis, *Ultrastructure of Trypanosoma lewisi: flagellum microtubules and the kinetoplast*, J. Protozool., Vol. 12, 1965, p.483-499.

[20] P. Cassier, *L'expression de deux milieux : le passage de la vie imaginaire chez les insectes. Le contrôle endocrine*, Bull. Soc. Zool. Fr., Vol. 123, Issue 2, 1996, p.187-197.

[21] R. Lafont, C. Dauphin-Villemant, J.T. Warren et H. Rees, *Ecdysteroid chemistry and biochemistry*, L.I. Gilbert, K. Iatrou & S.K. Gill (eds), Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 3, Elsevier, Oxford, 2005, p.125-195.

[22] H.H. Hagedorn, *The role of ecdysteroids in reproduction*, G.A. Kerkut. L.I. Gilbert. (eds), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Pergamon Press, Oxford, 1984, p.205-262.

[23] R. Lafont, J.P. Delbecque, L. De Hys, B. Mauchamp et J.L. Penneret, *Etude du taux d'ecdysone dans l'hémolymphe de Pieris brassicae (Lepidoptera) au cours du stade nymphal*, C. R. Acad. Sci., Vol. 279, Issue 25, 1974, p.1911-1914.

[24] T. H. Hsiao, C. Hsiao et J. De Wilde, *Molting hormone titer change and their significance during development of the Colorado beetle, Leptinotarsa decemlineata*. J. Insect Physiol., Vol. 22, 1975, p.1257-1261.

[25] G.M. Holman et R.W. Meola, *A high-performance liquid chromatography method for the purification and analysis of insect ecdysones: application to*

measurement of ecdysone titers during pupal-adult development of Heliothis zea, J. Insect Physiol., Vol. 8, 1978, p.275-278.

[26] J.P. Delbecque, M. Hirn, J. Delachambre et M. De Reggi, *Cuticular cycle and molting hormone levels during the metamorphosis of Tenebrio molitor*, (Insecta, Coleoptera). Dev. Biol., Vol. 64, 1978, p.11-30.

[27] W.E. Bollenbacher, H. Zvenko, A.K. Kumaran et L.I. Gilbert, *Changes in ecdysone content during posst-embryonic development of the wax moth Galleria mellonella : the role of ovary*, Gen. Comp. Endocrinol., Vol. 34, 1978, p.169-179.

[28] N. Soltani, *Dosage qualitatif et quantitatif des ecdystéroïdes chez les chrysalides mâles femelles de Cydia*

pomonella L. (Lepidoptera, Tortricidae), Ann. Inst. Nat. Agron. Alger, 1986, Vol. 10, Issue 1, p.45-58.

[29] N. Soltani-Mazouni, M.E.H. Khebbab et N. Soltani, *Production d'ecdystéroïdes ovariens durant la maturation des oocytes chez Tenebrio molitor*, Ann. Soc. Entomol. France, Vol. 35, 1999, p.82-86.

[30] F. Sehnal, P. Maroy et J. Mala, *Regulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in lepidopterous larvae and pupae*, J. Insect Physiol., Vol. 27, 1981, p.535-544.

A la mémoire de mes chers parents