



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat 3<sup>eme</sup> cycle

Spécialité: BIOLOGIE ANIMALE ENVIRONNEMENTALE  
Option Reproduction & Développement

Intitulé

**Effet de deux hypotenseurs le lisinopril et l'enalapril sur quelques paramètres de la reproduction d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* (Lépidoptère, Pyralidé).**

Presentée par: M<sup>me</sup> BENSALÉM-DJIDI Fatiha

Directrice de thèse : M<sup>me</sup> Nadia SOLTANI-MAZOUNI

Professeur, Université d'Annaba

Membre de Jury:

Mr. Noureddine SOLTANI

Président

Professeur, Université d'Annaba

Mr. Malik LAAMARI

Examineur

Professeur, Université de Batna

Mme Nassima REHIMI

Examineur

Professeur, Université d'Annaba

Mme Fouzia TINE-DJEBAR

Examineur

M.C.A, Université de Tébessa

Année universitaire: 2013/2014

## REMERCIEMENTS

*Avant tout, je remercie ALLAH de m'avoir donné le courage et la force de mener à bien ce travail*

*Je tiens à remercier Monsieur Professeur Nouredine Soltani pour son accueil dans son laboratoire, sa grande disponibilité, son aide tout au long de ce travail doctoral et pour avoir bien voulu me faire l'honneur de présider ce jury.*

*Madame le Professeur Nadia Soltani-Mazouni, ma directrice de thèse, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, Je lui adresse ma profonde reconnaissance pour ses orientations et mes plus vifs remerciements sur sa qualité humaine et sa gentillesse.*

*Monsieur Malik Laamari Professeur, Université de Batna, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de me faire l'honneur de juger ce travail. Je lui adresse mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude.*

*Mme Nassima Rehimy Professeur au Département de Biologie (Université BADJI Mokhtar, Annaba) d'avoir accepté d'être membre de jury de cette thèse en qualité d'examinatrice. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici toute ma gratitude*

*Mme Fouzia Tine-Djebar Maître de Conférences à l'Université de Tébessa pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail et de siéger à ce jury de thèse. Je tiens à l'assurer de mon profond respect et de mes sincères remerciements.*

*J'adresse mes remerciements à mon mari, pour m'avoir soutenu et encouragé pendant ces longs mois du travail, pour ses multiples conseils et pour le soutien moral qu'il m'avait apporté.*

*Ma reconnaissance va à ma sœur, mes frères qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail.*

*A toute l'équipe du laboratoire de biologie animale appliquée pour leur soutien, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse.*

*A mon père et ma mère*  
*Pour eux ... et grâce à eux ...*

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>5</b>
1.1. Présentation du matériel biologique : .....	5
1.2. Cycle biologique : .....	5
1.3. Conditions d'élevage : .....	7
1.4. Présentation de l'insecticide et traitement : .....	7
1.4.1. L'enalapril : .....	7
1.4.2. Le lisinopril : .....	7
1.5. Etude morphométrique : .....	9
1.6. Technique de microscopie électronique à transmission : .....	9
1.6.1. La fixation, le rinçage et la post fixation : .....	9
1.6.2. La déshydratation et l'inclusion : .....	10
1.6.3. Confection des coupes et coloration : .....	10
1.7. Etude biochimique : .....	11
1.7.1. Extraction des métabolites : .....	11
1.7.2. Dosage des métabolites.....	13
1.7.2. 1. Dosage des glucides totaux : .....	13
1.7.2. 2. Dosage des lipides totaux : .....	13
1.7.2.3. Dosage des protéines totales : .....	14
1.7.3. Extraction des acides nucléiques : .....	14
1.7.4. Dosage des Acides nucléiques : .....	16
1.7.4.1. Dosage de l'ARN : .....	16
1.7.4.2. Dosage de l'ADN : .....	16
1.8. Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes : .....	17
1.8.1. Extraction des ecdystéroïdes : .....	17
1.8.2. Principe du dosage des ecdystéroïdes : .....	17
1.9. Analyse statistique : .....	20
<b>2. RESULTATS</b> .....	<b>21</b>
2.1. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur la morphométrie des testicules : .....	21
2.2. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur la morphométrie de l'ovaire : .....	24
2.3. Effet de l'enalapril et le lisinopril sur l'épaisseur du chorion : .....	29
2.4. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur la composition biochimique des gonades : .....	31
2.4.1. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur l'évolution des taux en glucides, lipides et en protéines testiculaires : .....	34

2.4.2. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur l'évolution des taux en glucides, lipides et en protéines ovariens : .....	36
2.4.3. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur les acides nucléiques .....	38
2.5. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur la production des ecdystéroïdes : .....	44
2.5.1. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur la production des ecdystéroïdes testiculaires :.....	45
2.5.2. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur la production des ecdystéroïdes ovariennes : .....	46
<b>3. DISCUSSION</b> .....	<b>47</b>
3.1. Effets sur la morphométrie des gonades : .....	47
3.2. Effet sur l'épaisseur du chorion :.....	48
3.3. Effet sur le taux des métabolites : .....	49
3.4. Effets sur le taux des acides nucléiques :.....	51
3.5. Effet sur les ecdystéroïdes : .....	52
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>56</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>47</b>
<b>ANNEXE</b> .....	<b>85</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Dosage des glucides totaux: réalisation de la gamme d'étalonnage. ....	13
<b>Tableau 2:</b> Dosage des lipides totaux: réalisation de la gamme d'étalonnage. ....	13
<b>Tableau 3:</b> Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des protéines. ....	14
<b>Tableau 4 :</b> Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification du taux d'ARN. ....	16
<b>Tableau 5 :</b> Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification du taux d'ADN. ....	16
<b>Tableau 6 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le poids frais des testicules chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	22
<b>Tableau 7 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur la longueur (µm) et la largeur (µm) des testicules chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	23
<b>Tableau 8 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le poids frais des ovaires chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	25
<b>Tableau 9 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le nombre d'ovocytes basaux par paire d'ovaire chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	26
<b>Tableau 10 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur la taille de l'ovocyte basal chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	27
<b>Tableau 11 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le volume (mm <sup>3</sup> ) de l'ovocyte basal chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	28
<b>Tableau 12 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles <i>d'E. kuehniella</i> sur l'épaisseur du chorion (µm) de l'ovocyte basal (m ± s; n= 4). ....	29
<b>Tableau 13 :</b> Dosage des glucides : réalisation de la gamme d'étalonnage (m ± S; n= 4) .....	31
<b>Tableau 14 :</b> Dosage des lipides : réalisation de la gamme d'étalonnage (m ± s; n= 4) .....	32
<b>Tableau 15 :</b> Dosage des protéines : réalisation de la gamme d'étalonnage, (m ± s; n= 4). ....	33
<b>Tableau 16:</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le taux des métabolites testiculaire (µg/mg de testicules) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	35
<b>Tableau 17 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des métabolites ovariens (µg/mg d'ovaire) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ....	37
<b>Tableau 18 :</b> Dosage d'ADN : réalisation de la gamme d'étalonnage (m ± s, n=4). ....	38

<b>Tableau 19</b> : Dosage d'ARN : réalisation de la gamme d'étalonnage (m ± s, n=4). .....	39
<b>Tableau 20</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des acides nucléique testiculaires (µg/mg de testicules) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). .....	41
<b>Tableau 21</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des acides nucléique ovariens (µg/mg d'ovaire) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). .....	43
<b>Tableau 22</b> : Analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> traités avec l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl). Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), expriment B/B <sub>0</sub> en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E). .....	44
<b>Tableau 23</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur les taux d'ecdysteroïdes exprimés en pg équivalent E/mg de testicule chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). .....	45
<b>Tableau 24</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur les taux des ecdysteroïdes exprimés en pg équivalent E/mg d'ovaire chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). ?.....	46

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Cycle de développement d ' <i>E.kuehniella</i> à 27C°.....	6
<b>Figure 2.</b> Structure de l'Enalapril (A), Structure du Lisinopril (B). ....	8
<b>Figure 3.</b> Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides, lipides (Shibko <i>et al.</i> , 1966). .....	12
<b>Figure 4 :</b> Principales étapes d'extraction des acides nucléiques : ADN, ARN selon Shibko <i>et al.</i> , 1966.	15
<b>Figure 5 :</b> Principe du dosage EIA (d'après Porcheron <i>et al.</i> , 1989).....	19
<b>Figure 6 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le poids frais des testicules chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	22
<b>Figure 7 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur la longueur (µm) et la largeur (µm) des testicules chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	23
<b>Figure 8 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le poids frais des ovaires chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	25
<b>Figure 9 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le nombre d'ovocytes par paire d'ovaire chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	26
<b>Figure 10 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur la taille de l'ovocyte basal chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	27
<b>Figure 11 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le volume de l'ovocyte basal chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	28
<b>Figure 12 :</b> Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles d' <i>E. kuehniella</i> sur l'épaisseur du chorion (µm) de l'ovocyte basal (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	29
<b>Figure 13 :</b> Structure semi fine de l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux d' <i>E. kuehniella</i> . Témoin (A) (x100), les séries traitée avec l'enalapril (B) (x100) et le lisinopril (C) (x100) (Ch : chorion, Ov : ovocyte, Cf : cellules folliculaires). ....	30
<b>Figure 14 :</b> Dosage des glucides : droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités de glucose (µg). (R <sup>2</sup> : coefficient de détermination). ....	31
<b>Figure 15 :</b> Dosage des lipides : droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités de lipides (µg). (R <sup>2</sup> : coefficient de détermination). ....	32
<b>Figure 16 :</b> Dosage des protéines : droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités d'albumine (µg). (R <sup>2</sup> : coefficient de détermination). ....	33



<b>Figure 17</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le taux des métabolites testiculaires (µg/mg de testicules) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	35
<b>Figure 18</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des métabolites ovariens (µg/mg d'ovaire) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	37
<b>Figure 19</b> : Courbe d'étalonnage des Absorbances en fonction des Quantités des ADN (µg).....	38
(R2= coefficient de corrélation). ....	38
<b>Figure 20</b> : Courbe d'étalonnage des Absorbances en fonction des Quantités des ARN (µg).....	39
(R2= coefficient de corrélation). ....	39
<b>Figure 21</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des acides nucléique testiculaires (µg/mg de testicules) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	41
<b>Figure 22</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des acides nucléique ovariens (µg/mg d'ovaire) chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	43
<b>Figure 23</b> : Analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> traités avec l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl). Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), expriment B/B <sub>0</sub> en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E). ....	44
<b>Figure 24</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur les taux des ecdysteroides exprimés en pg équivalent E/mg de testicule chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	45
<b>Figure 25</b> : Effet <i>in vivo</i> de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur les taux des ecdysteroides exprimés en pg équivalent E/mg de tissu chez les adultes <i>d'E. kuehniella</i> (m ± s; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins. ....	46

---

# *INTRODUCTION*

---

## INTRODUCTION

Durant ces dernières décennies la productivité agricole marque une augmentation remarquable, ainsi elle doit être maintenue au niveau qualitatif et quantitatif indispensable à la satisfaction des besoins mondiaux. L'agriculture se dote aujourd'hui de produits chimiques plus performants afin de contrôler les pertes de récoltes qui sont associées à la présence de plantes ou d'insectes nuisibles (Nauen & Bretschneider, 2002).

Les insectes possèdent un squelette externe inextensible. Pour croître, ils doivent se débarrasser périodiquement de leur ancienne cuticule et en sécréter une nouvelle au cours d'un cycle de mue. Chaque mue conduit à une larve de plus en plus grosse jusqu'à la métamorphose en adulte chez les holométaboles. Ce dernier va engendrer par la suite, l'orchestration des activités reproductives. Il est classiquement admis que ces événements sont directement contrôlés par le système neuroendocrinien qui secrète les hormones nécessaires dont les ecdystéroïdes et l'hormone juvénile. En effet, de nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré l'implication de l'hormone juvénile, de l'ecdysone (deux hormones régissant la croissance et la métamorphose chez les insectes) ainsi que certaines neurohormones dans le contrôle de la reproduction (Barth & Lester, 1973; Raina & Klun, 1984; Koeppel *et al.*, 1985; Hagedorne, 1985; Davies *et al.*, 2006).

Les ecdystéroïdes sont des stéroïdes polyhydroxylés synthétisés au niveau des glandes prothoraciques (Rees, 1985, Gäde *et al.*, 1997, Gäde & Hoffman, 2005), après activation par l'hormone prothoracicotrope (PITH) ou ecdysiotrope sécrétée par les cellules neurosécrétrices cérébrales en réponse à des facteurs neuraux, hormonaux ou environnementaux (Neubueser *et al.*, 2005). Chez la plupart des insectes notamment chez *Ephestia kuehniella*, les glandes prothoraciques dégénèrent lors de la dernière mue larvaire (Glito *et al.*, 1979) et la production des ecdystéroïdes est ensuite assurée par des sources alternatives tel que l'épithélium folliculaire (Soltani-mazouni *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2002), les testicules (Loeb *et al.*, 1984) et les ovaires (Hagedorne, 1985), ce qui peut expliquer que pendant la phase de reproduction, les gonades deviennent temporairement des organes endocrines.

Cette hormone gonadotrophique est nécessaire à la régulation du développement des systèmes reproducteurs mâles et femelles. En effet elle joue un rôle clé chez les mâles dans la différenciation des disques génitaux imaginaires et dans la maturation des différentes structures de l'appareil reproducteur, et accélère la division mitotique durant les premiers stades de la

spermatogénèse (Alrubeai & Gorell, 1982). Chez la femelles, les ecdystéroïdes sont impliquées dans le contrôle de la reinitiation mitotique dans l'ovocyte ( Yamashita & Suzuki, 1991), La synthèse de la vitellogénine, l'augmentation de la compétence des follicules à incorporer cette protéine dans les ovocytes en développement (Ramaswamy *et al.*, 1997), l'ovulation (Regg *et al.*, 1992) et l'induction de la sclérotisation des œufs par la stimulation de la formation du chorion (Sahlen, 1994 ; Lafont *et al.*, 2005). la 20-hydroxyecdysone maintient l'expression des gènes de la vitellogénine (protéine constituant 80-90% des substances de réserve de l'œuf) dans le corps gras, qui est par la suite acheminée et incorporée aux ovocytes (Martin *et al.*, 2001).

L'hormone juvénile (HJ) est un sesquiterpène synthétisée par les corps allates (glande subsphériques situées dans la tête en arrière du cerveau) et dépend de deux neurohormones céphaliques (Stay *et al.*, 1993), stimulatrices (allatotropine) et inhibitrices (allatostatine) (Gaid & Hofmane, 2005), mais aussi des neurotransmetteurs tel que la dopamine (Granger *et al.*, 2000) et l'octopamine (Schulz *et al.*, 2002), il a pour rôle de réguler plusieurs processus physiologiques (Kolman, 1990; Rees, 1995; Gaide *et al.*, 1997; Riddiford *et al.*, 2003). L'HJ est libérée dans l'hémolymphe puis transportée vers les tissus grâce à des protéines vectrices spécifiques appelées « juvénile hormone binding proteins » (Goodman & Chang, 1985). Le métabolisme de l'HJ s'effectue non seulement au niveau de l'hémolymphe mais également au niveau des tissus tel que le tégument, le corps gras, le cerveau, l'intestin et les glandes séricigènes (Kallapur *et al.*, 1996). L'hormone juvénile et les ecdystéroïdes jouent un rôle majeur dans le développement et la reproduction des insectes (Bellés, 2005; wong, 2004).

Chez *E. kuehniella*, la maturation sexuelle se déroule durant la vie nymphale sous le contrôle des ecdystéroïdes, les différents précurseurs nécessaires à ce processus sont synthétisés dans le corps gras, libérés dans l'hémolymphe et captés par les glandes (Beenakers *et al.*, 1985). A l'exuviation adulte, les individus des deux sexes sont sexuellement mûres.

Toutes ces connaissances acquises en physiologie des arthropodes et des insectes (Smith, 1985) 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) notamment les régulateurs de croissance des insectes (IGR<sub>s</sub>) (Staal, 1982), appelés également, les insecticides de la troisième génération un terme désigné à un groupe de composés qui interfère avec la croissance et le développement des insectes. 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 de ces insecticides 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; Saito & Hama, 2000). Cette résistance est due à la réduction des taux de pénétration cuticulaire (Bull & 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).

Récemment de nouveaux composés ont été introduits dont le but est d'approfondir leur mécanisme au niveau cellulaire.

Ces composés sont des médicaments connus tels que le l'énalapril, le lisinopril et le captopril qui sont prescrits dans le traitement de l'hypertension artérielle chez les mammifères; ils sont considérés comme des puissants et spécifiques inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), qui est une metallopeptidase de Zinc ancrée à la surface des cellules. Son rôle est de cliver un peptide c- terminal pour produire un vasoconstricteur, l'Angiotensine II (Corval *et al.*, 1995, Turner *et al.*, 2002). L'ECA dégrade et inactive la bradykinine, un peptide vasodilatateur (Johnston, 1992). Chez les mammifères les ECA existent sous deux isoformes l'ECA somatique (ECA<sub>s</sub>) avec un poids moléculaire de 140 à 180 KDa et deux domaines homologues (N et C- terminal) et l'ECA testiculaire (ACE<sub>t</sub>) qui a un poids moléculaire de 90 à 110 KDa et une activité simple (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 ACE des mammifères (Lamango & Isaac, 1994; Wigffels *et al.*, 1996; Schoofs *et al.*, 1998). L'ECA permet de contrôler l'osmorégulation selon des expériences menées *in vivo* par Salzet, (1995) et Verger-Bocquet, (1992) sur *Theromyzon tessulatum*, l'amide de l'angiotensine II contrôle également l'équilibre de l'eau et la mémorisation (Delorenzi, 1995 et 1999). Aussi l'application de l'angiotensine II sur *Chasmagnathus graulatus* est responsable de la régulation du processus de mémorisation. La présence des ECA dans le système nerveux des insectes (Isaac, 1999) confirme leur rôle dans l'activation des neuropeptides et dans la reproduction. En effet, des études immunohistochimiques ont révélé la présence de ECA dans les testicules de *Locusta migratoria*, *Neobellieria bullata* et *Lepitinotarsa decemlineata*, ce qui confirme le rôle de l'ECA dans la reproduction (Schoofs *et al.*, 1998; Veelaert, 1998; Salzet, 1997; Ekbote, 1999).

L'ECA devrait être considéré comme cible potentielle pour le développement de nouveaux régulateurs de croissance (Issac, 2006).

D'autre part le captopril réduit l'oviposition et les ecdystéroïdes chez les lépidoptères (Vercryse, 2004), il réduit le taux des ecdysteroides chez les coléoptères *Tenebrio molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2007), il a également un effet sur la fécondité (Issac, 1999). L'expérience d'Ekbot *et al.* (2003) montre que le captopril a une influence sur la fertilité masculine.

De nombreuses études ont été menées à travers le monde sur *E. kuehniella* sur le plan économique (Bélles, 1975; Jacob & Cox, 1976), biologique, morphologique, physiologique (Weiranther, 1989; Anderson & Hallberg, 1990), et génétique (Marec & Mirchi, 1990; Traut & Traut, 1991). En Algérie, elle a fait l'objet de nombreux travaux (Bendjeddou *et al.*, 1998; Hami *et al.*, 2005; El-Ouarar *et al.*, 2006; Khebbab *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni & Hami, 2010). Tous ces acquis ont permis d'entreprendre des expérimentations approfondies sur les effets des pesticides sur ces ravageurs.

Très peu d'études ont évalué les effets de l'énalapril et du lisinopril sur la reproduction et le développement chez les insectes.

La présente recherche vise l'évaluation *in vivo* de deux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine l'Enalapril et le Lisinopril afin de tester leur efficacité sur la reproduction d'un insecte ravageur des denrées stockées *E. kuehniella* (Lépidoptère : Pyralidea). Elle vise les aspects suivants :

- Morphométrie et cytologie des gonades mâles et femelles d'après la technique de microscopie électronique à transmission.
- Biochimie des gonades. (Métabolites, Acides nucléiques).
- Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes testiculaires et ovariens.

---

***MATERIEL ET  
METHODES***

---

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Présentation du matériel biologique :

*Ephestia Kuehniella* (Zeller) est un insecte holométabole micro lépidoptère de la famille des pyralidés, connu sous le nom de pyrale indienne de la farine. Cet insecte cosmopolite est considéré comme un ravageur de la farine (Doumandji-Mitiche, 1977), des produits céréaliers (Blé, Mais, Riz). La pyrale de la farine se rencontre dans les silos à grain, les minoteries, des pâtes alimentaires et des fruits secs. Sa position systématique est la suivante :

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

### 1.2. Cycle biologique :

L'insecte adulte a une petite tête globulaire et fait 20-25mm d'envergure, les ailes antérieures sont grisâtres et satinées, les ailes postérieures, finement frangées, sont blanchâtres. La ponte, 200 à 300 œufs blancs et de forme elliptique, débute juste après l'accouplement, la durée totale du cycle varie de 25 à 200 jours. A son premier stade, la larve, blanche tirant vers le rose, mesure 1 à 1,5 mm. Après six mues, elle atteint 15 à 20mm au stade final et s'entoure d'un cocon blanc soyeux c'est la chrysalide qui donne des adultes après 8 à 12 jours (Figure 1).



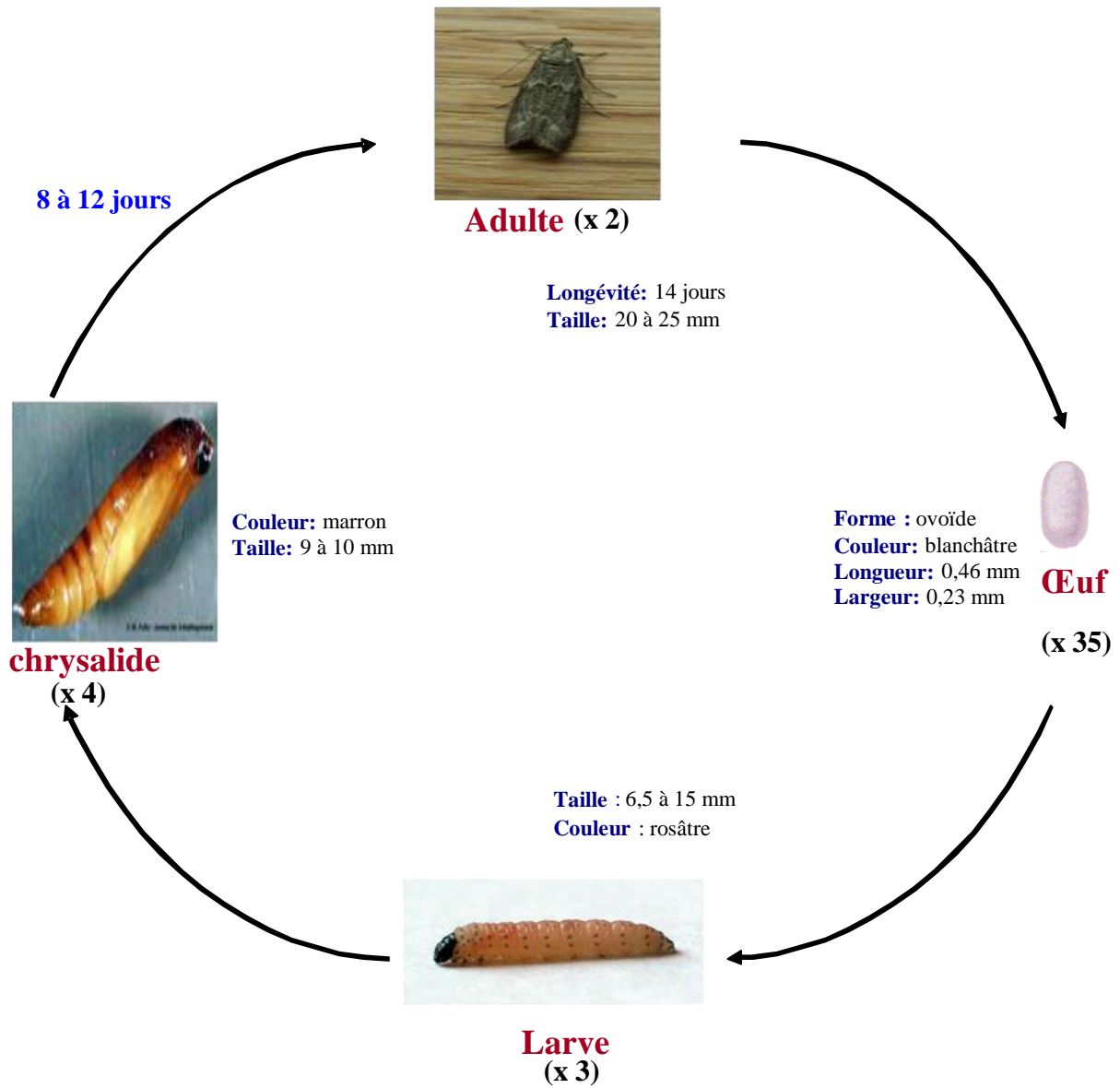


Figure 1. Cycle de développement d'*E.kuehniella* à 27C°.

### 1.3. Conditions d'élevage :

*E. Kuehniella* (Zeller) est élevée au laboratoire à une température de 27°C et d'une humidité relative de 80 %. Les larves mâles et femelles sont isolées dans des boîtes en plastique contenant de la farine et du papier plissé pour qu'elles puissent se nymphoser. Après la mue nymphale les chrysalides sont traités et mises dans des boîtes de pétrie jusqu'à la mue imaginale.

### 1.4. Présentation de l'insecticide et traitement :

Les molécules utilisées dans le traitement sont des médicaments hypotenseurs, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine: l'enalapril et le lisinopril.

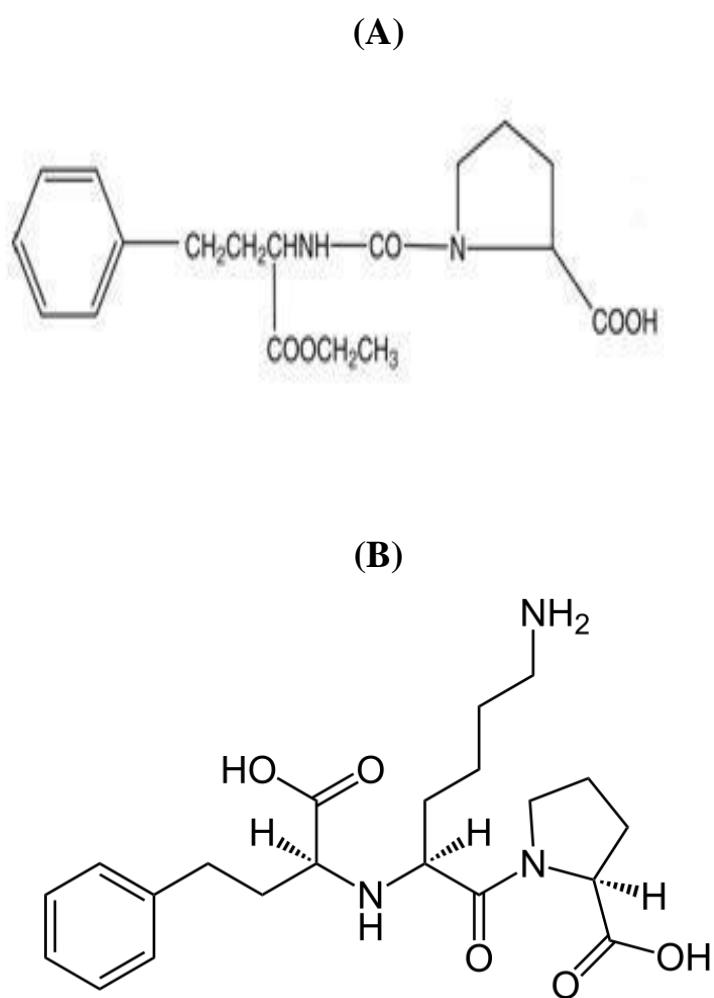
#### 1.4.1. L'enalapril :

L'enalapril (*N*-{*N*-[(*S*)-1-ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl]l-alanyl}-proline) a un poids moléculaire de 376.44 g/mol et un point de fusion à 143-144,5° C. Sa formule empirique est: C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Sa formule de structure est présentée dans la (Figure 2). Il a été administré par application topique à la dose 5µg/2µl d'acétone sur la face abdominale des chrysalides mâles et femelles nouvellement exuviés.

#### 1.4.2. Le lisinopril :

Le lisinopril (*N*-{*N*-[(*S*)-1-carboxy-3-phenylpropyl]l-lysyl}-l-proline) avec un poids moléculaire de 405.48 g/mol et un point de fusion à 148° C. Sa formule empirique est: C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>. Sa formule de structure est présentée dans la (Figure 2). Il a été administré par application topique à la dose 10µg/2µl d'acétone sur la face abdominale des chrysalides mâles et femelles nouvellement exuviés.

Les séries témoins ne reçoivent aucun traitement.



**Figure 2.** Structure de l'Enalapril (A), Structure du Lisinopril (B).

### 1.5. Etude morphométrique :

Les testicules et les ovaires sont prélevés des séries témoins et traitées avec l'enalapril (5µg) et le lisinopril (10µg) à l'émergence des adultes. Les paramètres morphométriques des gonades ont été mesurés :

- Le nombre d'ovocytes par pair d'ovaire.
- La longueur (L) (µm) et la largeur (l) (µm) des testicules et de l'ovocyte basale sont mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire montré sur un microscope préalablement étalonné.
- Le poids frais des gonades sera également déterminé à l'aide d'une balance Sartorius Handy, avec une précision de ± 0,1 mg.
- Le volume (V) exprimé en mm<sup>3</sup> de l'ovocyte basale est obtenu grâce à la formule suivante (Lambreas *et al.*, 1991 ).

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

### 1.6. Technique de microscopie électronique à transmission :

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

#### 1.6.1. La fixation, le rinçage et la post fixation :

Pour rendre la structure des cellules inaltérable, on procède à la fixation par des substances chimiques dites fixateurs ayant la caractéristique de coaguler, de précipiter et d'insolubiliser les constituants cellulaires. La fixation rend les pièces perméables aux colorants et permet de préserver leurs structures macromoléculaires.

Le mélange fixateur est préparé comme suit: Paraformaldéhyde 5%, glutaraldéhyde 25%. Ces molécules ont pour rôle de former des liaisons covalentes avec les groupements aminés des protéines et relient des molécules adjacentes. Elles sont additionnées d'eau

distillée (7ml) de sucrose (1ml) et de tampon cacodylate 0,4M (5ml). La fixation dure minimum 12h.

Le rinçage se fait dans un mélange cacodylate 0,4M (10ml) eau distillée (8ml) et sucrose (12ml) avec deux bains de 20 minutes chacun et un troisième jusqu'au lendemain. Si la fixation est prolongée, le rinçage sera également prolongé.

La post-fixation se fait dans un mélange tétr oxyde d'osmium (2,5ml), cacodylate (2.5ml), sucrose et l'eau distillée (2ml), pendant une heure. Le tétr oxyde d'osmium fixe et stabilise les doubles liaisons de couches lipidiques et les protéines tissulaires en créant des ponts disulfures.

### **1.6.2. La déshydratation et l'inclusion :**

Puisque le milieu d'inclusion est insoluble dans l'eau, on procède à une déshydratation qui se fait dans des bains d'alcool éthylique à degrés croissant (30<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup>, 95<sup>0</sup>, 100<sup>0</sup>).

Les pièces subissent ensuite des bains d'oxyde de propylène afin de les éclaircir. À ce stade les échantillons sont encore mous pour être coupés, il faut les infiltrer dans un milieu d'inclusion liquide qui pourra être durci par polymérisation (résines). Une imprégnation à la résine par plusieurs bains est réalisée. La résine est préparée comme suit : 60ml de DDSA (Dodecyl sulfate aldéhyde), 25ml d'épikote et 20ml d'araldite auxquels on ajoute le DMP30 (2, 4, 6-diméthyl-amino-méthyl-phénol) accélérateur de polymérisation. Deux bains de résine sont réalisés à cet effet: le premier bain avec des quantités égales d'oxyde de propylène et de résine additionnés de 4% d'accélérateur (DMP30), jusqu'au lendemain matin. On effectue un deuxième bain réalisé avec de la résine et de 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 de la pyramide. Les moules sont ensuite mis dans une étuve à 37° pendant trois heures. Puis les pièces sont réorientées et les moules sont remis dans l'étuve à 60° pendant trois jours.

### **1.6.3. Confection des coupes et coloration :**

Avant la confection des coupes, le bloc doit être taillé, mis dans le porte objet puis débité en coupe à l'aide d'un ultra microtome LKB2088 qui utilise des couteaux en verre réalisés par un knife maker LKB 7800. Les coupes semi-fines sont déposées sur des lames en verre propres, séchées et colorées au bleu de toluidine (bleu de toluidine à 1% et borax de sodium 1%) pendant 3 à 5 minutes.

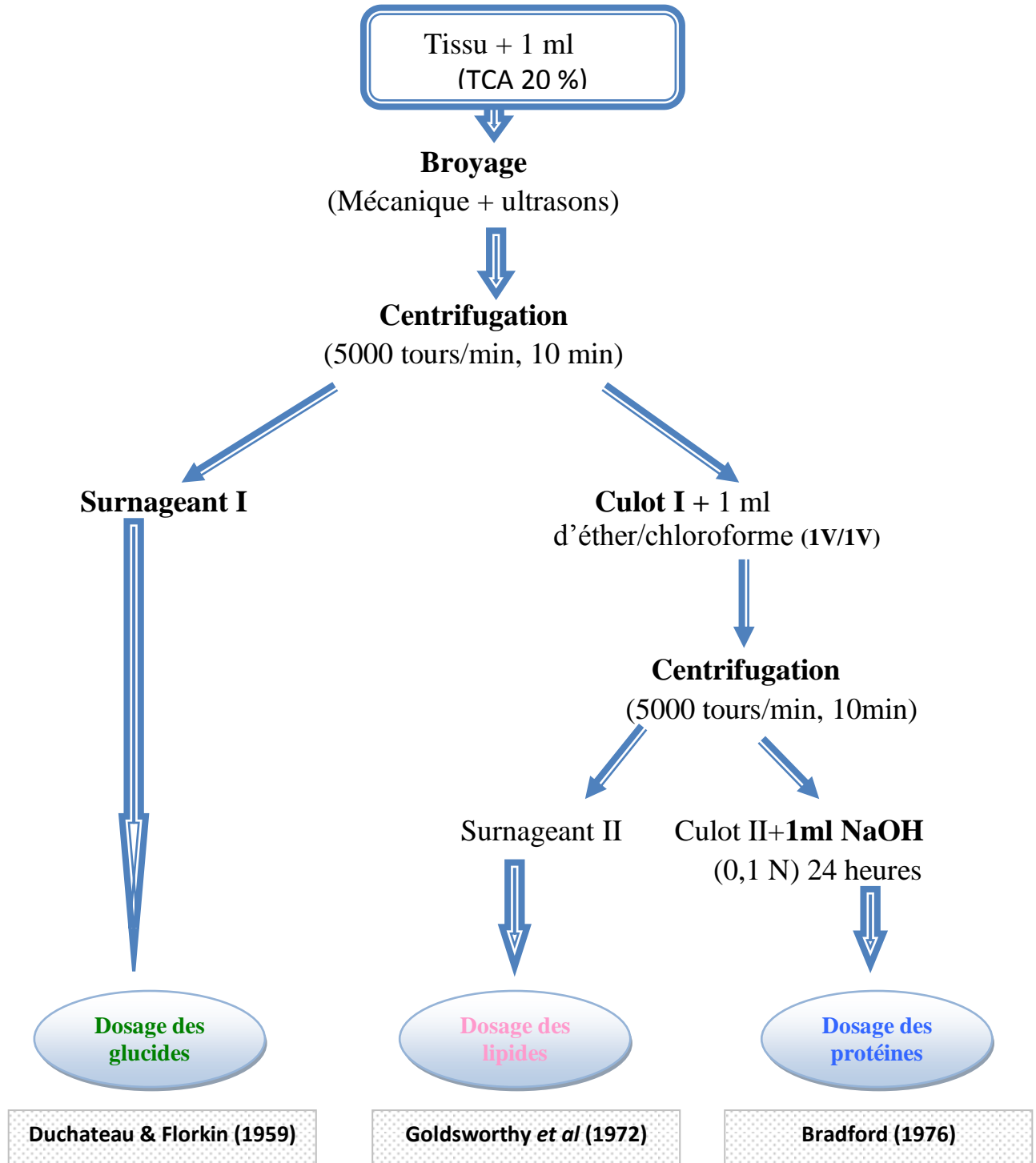
Les coupes sont observées au microscope photonique et l'épaisseur du chorion est mesurée à l'aide d'un micromètre oculaire.

## **1.7. Etude biochimique :**

### **1.7.1. Extraction des métabolites :**

L'extraction des métabolites des gonades a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al.*, 1966 (Figure 3).

Les gonades sont broyées dans 500 µl de TCA (20%) à l'aide d'un homogénéiseur à ultrasons et centrifugés à 5000tr/min pendant 10min, le premier surnageant est récupéré et servira au dosage des glucides totaux, le culot I additionné de 500 µl d'un mélange éther/chloroforme (v/v, 1/1) a subi une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment afin de récupérer le surnageant II, qui sera utilisé pour l'analyse quantitative des lipides, le culot II dissout dans 500 µl de soude (0.1N), permettra la quantification des protéines (Figure 3).



**Figure 3.** Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides, lipides (Shibko *et al.*, 1966).

### 1.7.2. Dosage des métabolites

#### 1.7.2. 1. Dosage des glucides totaux :

Le dosage des glucides totaux a été effectué selon Duchateau et Florkin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose (mg/ml) comme standard (Tableau 1).

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

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de la solution mère de Glucose ( $\mu\text{l}$ )	0	20	40	60	80	100
Quantité d'eau distillée ( $\mu\text{l}$ )	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

La méthode consiste à additionnée à une fraction aliquote de 100  $\mu\text{l}$  de surnageant, 4 ml de réactif d'anthrone et après chauffage du mélange dans un bain marie (80°C pendant 10 min) une coloration verte se développe, dont l'intensité mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la concentration des glucides présente dans l'échantillon.

#### 1.7.2. 2. Dosage des lipides totaux :

La concentration des lipides totaux a été estimée selon Glodsworthy *et al.*, 1972 utilisant la vanilline comme réactif (0,38 g de vanilline, 55 ml d'eau distillée et 195 ml d'acide orthophosphorique à 85 %). La solution mère des lipides est préparée en utilisant l'huile de tournesol qui contient plus de 99 % de triglycérides selon la procédure suivante: 25 mg d'huile de table pesés dans un tube eppendorf; cette quantité est ensuite reprise dans 10 ml du mélange (éther / chloroforme) (V/V) (Tableau 2).

**Tableau 2:** Dosage des lipides totaux: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de la solution mère de lipides ( $\mu\text{l}$ )	0	20	40	60	80	100
Solvant Ether/Chloroforme ( $\mu\text{l}$ )	100	80	60	40	20	0
Réactif de vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5



Après évaporation des prises aliquotes de 100 µl de surnagent II dans un bain à sec à 40°C, on additionne 1 ml d'acide sulfurique concentré (96%), les tubes fermés sont agités et chauffés dans un bain à sec à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on prélève 200 µl de chaque tube auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphanillinique et on agite. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre (Jenway 6300) à une longueur d'onde de 530 nm.

### 1.7.2.3. Dosage des protéines totales :

La quantification des protéines a été réalisée selon la méthode de Bradford (1976) utilisant le bleu brillant de coumassie (G250, Merck) comme réactif (100mg BBC ,50 ml d'éthanol absolu 95°, 100ml d'acide orthophosphorique à 85% complété à 1000ml par de l'eau distillée) sa durée de conservation est de 2à 3 semaines à 4°C, et l'albumine de sérum de bœuf (BSA, Sigma) comme protéine standard à 1mg/ml (Tableau 3).

**Tableau 3:** Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des protéines.

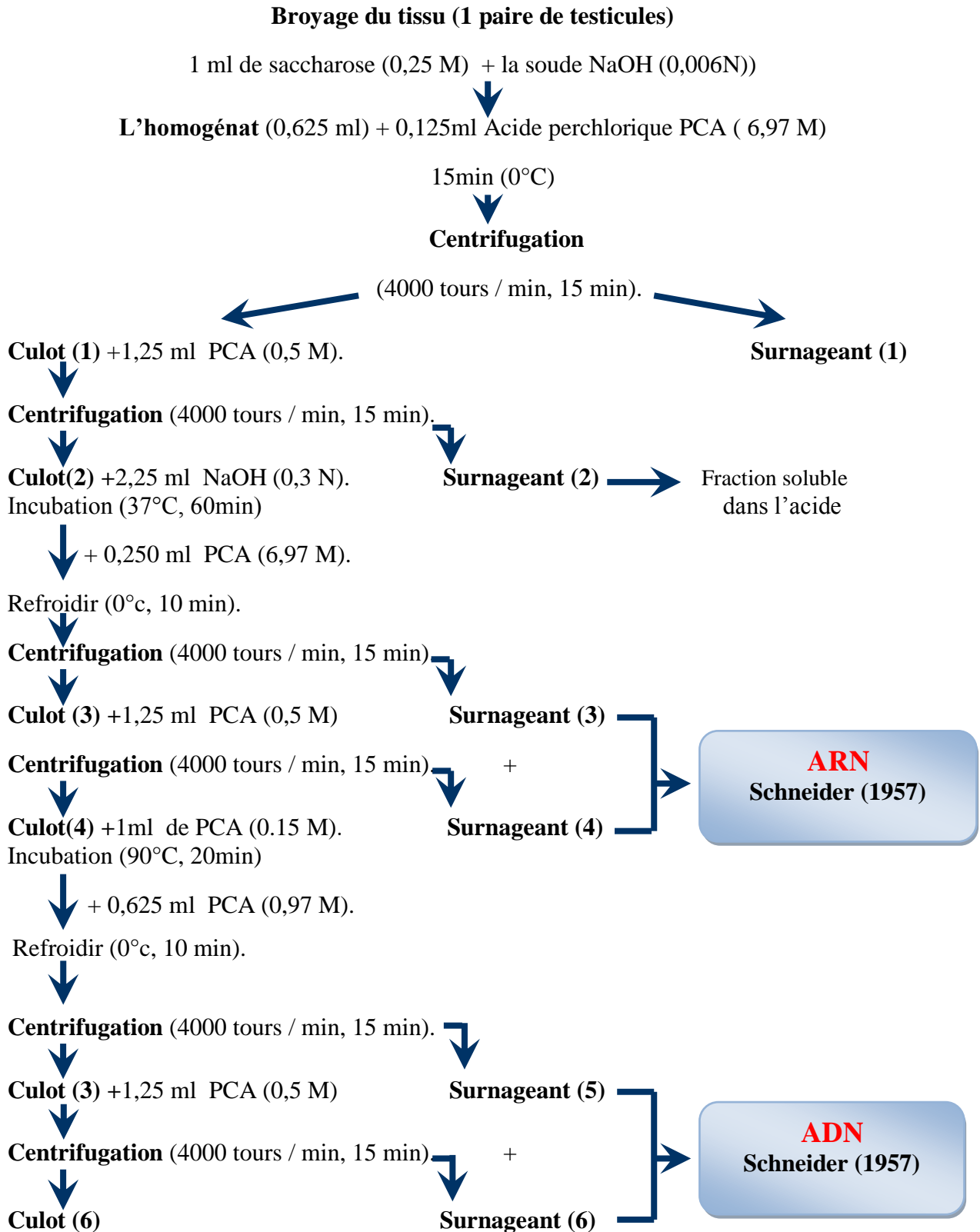
<b>Tubes</b>	1	2	3	4	5	6
<b>Solution (BSA) d'albumine (µl)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Eau distillée (µl)</b>	100	80	60	40	20	0
<b>Réactif BBC (ml)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Une fraction aliquote de 100µl de la gamme et de l'extrait protéique de chaque échantillon est additionnée de 4ml de réactif BBC.

Après agitation, il se développe une coloration bleue dont les absorbances sont lues dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme.

### 1.7.3. Extraction des acides nucléiques :

Les gonades sont déposés dans des tubes d'ependorf contenant 500µl d'eau distillée additionnée de 2µl phénylméthylsilfonyfluoride (PMSF) (45mg de PMSF/1ml éthanol), puis stockés au congélateur à -20° jusqu'au jour du dosage. L'extraction est illustrée dans la figure 4.



**Figure 4 :** Principales étapes d'extraction des acides nucléiques : ADN, ARN selon Shibko *et al.*, 1966.

**1.7.4. Dosage des Acides nucléiques :**

1.7.4.1. Dosage de l'ARN :

L'ARN a été quantifié selon la méthode de Schneider (1957) qui utilise l'orcinol comme réactif (0,5 g de FeCl<sub>3</sub>, 1g d'orcinol et 100 ml d'HCl) et une solution mère d'ARN extrait de levure de boulangerie comme standard (1 mg/ml d'eau distillée) (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification du taux d'ARN.

<b>Tubes</b>	1	2	3	4	5
<b>ARN standard (µl)</b>	0	20	40	60	80
<b>Eau distillée (µl)</b>	1,5	1,48	1,46	1,44	1,42
<b>Orcinol (ml)</b>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Les tubes après agitation, sont chauffés au bain marie à 90°C pendant 20 minutes. Il se forme une coloration bleu clair.

Le dosage de l'ARN a été effectué sur des fractions aliquotes 100µl des extraits biologiques auquel est additionné 1,5 ml de réactif d'orcinol. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 660 nm contre un blanc de gamme.

1.7.4.2. Dosage de l'ADN :

L'ADN a été quantifié selon la méthode de Scheneider (1957) qui utilise le diphenylamine comme réactif (1g de diphenylamine, 100 ml d'acide acétique glacial, 2,75 ml d'acide sulfurique) et une solution mère d'ADN extrait de thymus de veau comme standard (1 mg/ml d'eau distillée) (Tableau 5).

**Tableau 5 :** Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification du taux d'ADN.

<b>Tubes</b>	1	2	3	4	5
<b>ADN standard (µl)</b>	0	20	40	60	80
<b>Eau distillée (µl)</b>	500	480	460	440	420
<b>Diphénylamine (ml)</b>	1	1	1	1	1

Après chauffage au bain marie pendant 20 minutes à 90°C, il se développe alors une coloration rosâtre.

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

Les absorbances sont lues dans un à une longueur d'onde de 602 nm contre un blanc de gamme.

## **1.8. Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes :**

### **1.8.1. Extraction des ecdystéroïdes :**

Les ovaires et les testicules des séries témoins et traitées ont été conservées dans 500µl de méthanol qui permet l'extraction des ecdystéroïdes. Après centrifugation à 2700 tours pendant 10 minutes, le surnageant a été évaporé dans un bain-marie à sec. Enfin, les extraits secs ont été récupérés dans 500µl de tampon EIA qui comprend le Tampon phosphate (0,1M, pH 7,4) additionné de Na Cl 0,4M, EDTA (Ethylène diamine Tétra Acétique acide), BSA (sérum Albumine bovine) et eau distillée.

### **1.8.2. Principe du dosage des ecdystéroïdes :**

Les ecdystéroïdes ont été dosés selon la technique enzymo-immunologique (EIA) adaptée aux ecdystéroïdes 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 (Aribi *et al.*, 1997) 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 (EIA polyclonal) retenu sur une microplaque à 96 puits (NUNC Immunoplate Maxisorp F96, Danemark). Au bout de 3 heures d'incubation, les éléments non retenus seront éliminés au cours d'un rinçage des plaques. Un réactif de révélation de la peroxydase, la tétraméthyl benzidine ou TMB (Sigma France) est utilisé pour la coloration. Celle-ci se fait sous agitation pendant 15 à 30 minutes et les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (Labsystem, Finlande) à 630 nm ou 450 nm sans ou avec addition d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(2N), respectivement. La mesure de la quantité d'ecdystéroïdes contenue dans les échantillons biologiques par comparaison avec une courbe de référence obtenue avec des solutions standards d'ecdysone.

Les densités optiques ont été lues grâce à un lecteur de plaque et exprimées sous forme d'un rapport :

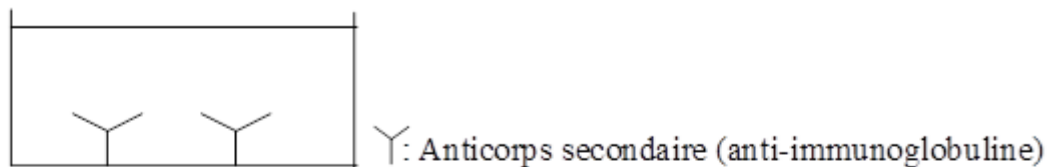
$$\mathbf{B/B_0(\%) = (B-T)/(B_0-T)\times 100}$$

B : Absorbance de l'échantillon ou du standard.

B<sub>0</sub> : Absorbance en absence de l'hormone.

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

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



**Etape 2:** Répartition des différents éléments :

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

**Etape 3:** Réaction immunologique puis lavage



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

**Etape 5:** Lecture des densités optiques à 630 nm :

- coloration faible  $\Rightarrow$  forte dose d'ecdystéroïde
- coloration forte  $\Rightarrow$  faible dose d'ecdystéroïde

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

### **1.9. Analyse statistique :**

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Minitab 16. Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne plus ou moins l'écart type ( $m \pm s$ ). Différents tests tel que l'analyse e la variance à un critère de classification, suivi par le test de Tukey, le test « t » de Student, ainsi que la régression linéaire, ont été utilisés.

---

# *RESULTATS*

---



## 2. RESULTATS

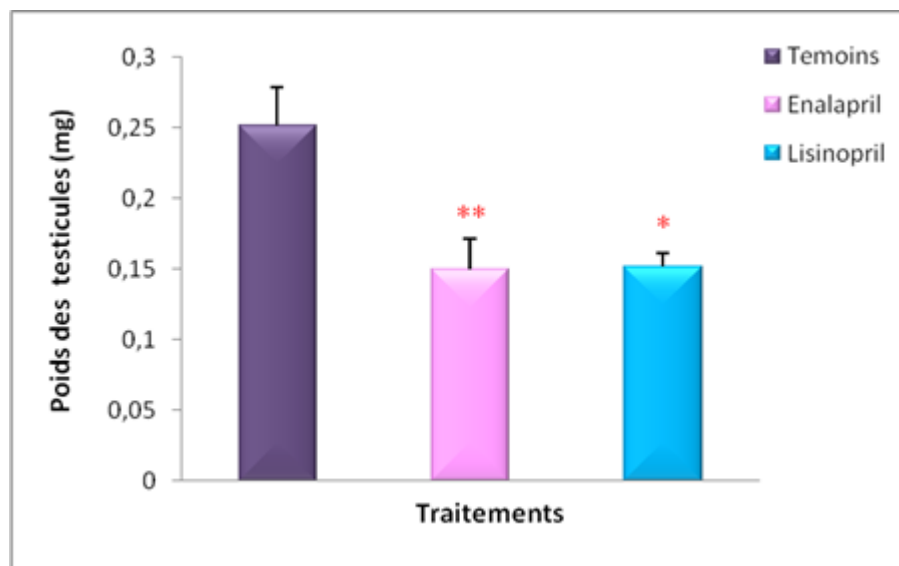
### 2.1. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur la morphométrie des testicules :

L'effet *in vivo* de l'enalapril et du lisinopril a été réalisé par application topique respectivement aux doses 5µg et 10µg/2µl d'acétone sur des chrysalides mâles nouvellement exuviés d'*E. kuehniella*. Le poids frais et la taille des testicules, ont été déterminés sur des mâles témoins et traités. Les dissections des mâles dès leur émergence adulte permettent de prélever les testicules qui seront immédiatement pesés.

Les résultats obtenus montrent que l'enalapril entraîne une réduction très significative ( $p = 0,002$ ) du poids frais des testicules par rapport aux témoins puisqu'il passe de  $0,25 \pm 0,02$  chez les témoins à  $0,15 \pm 0,02$  chez les traités avec l'enalapril. Alors que le lisinopril réduit le poids frais des testicules d'une manière significative ( $p = 0,006$ ) et la comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative. (Tableau 6, Figure 6).

**Tableau 6** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le poids frais des testicules chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Temoin	Enalapril	Lisinopril
<b>poids (mg) des testicules</b>	0,25 $\pm$ 0,02 <b>a</b>	0,15 $\pm$ 0,02 <b>b</b>	0,15 $\pm$ 0,01 <b>b</b>

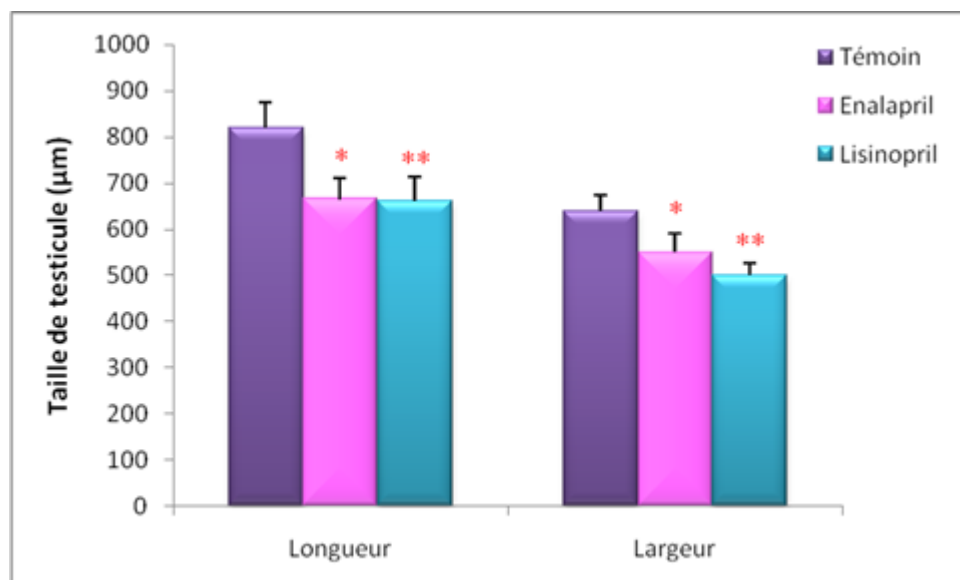


**Figure 6** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le poids frais des testicules chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

La comparaison des valeurs moyennes obtenues dans les séries traitées révèle que l'enalapril provoque une réduction significative de la longueur ( $p=0,006$ ) et la largeur ( $p =0,05$ ) du testicule (Tableau 7, Figure 7). Cependant, le lisinopril provoque une réduction très significative de la longueur ( $p =0,005$ ) et la largeur ( $p =0,001$ ) du testicule, la comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative.

**Tableau 7 :** Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur la longueur ( $\mu\text{m}$ ) et la largeur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Témoins	Enalapril	Lisinopril
Longueur ( $\mu\text{m}$ )	$820 \pm 51,60$ a	$665 \pm 44,30$ b	$660 \pm 51,60$ b
Largeur ( $\mu\text{m}$ )	$640 \pm 32,66$ a	$550 \pm 38,3$ b	$500 \pm 23,1$ b



**Figure 7 :** Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur la longueur ( $\mu\text{m}$ ) et la largeur ( $\mu\text{m}$ ) des testicules chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

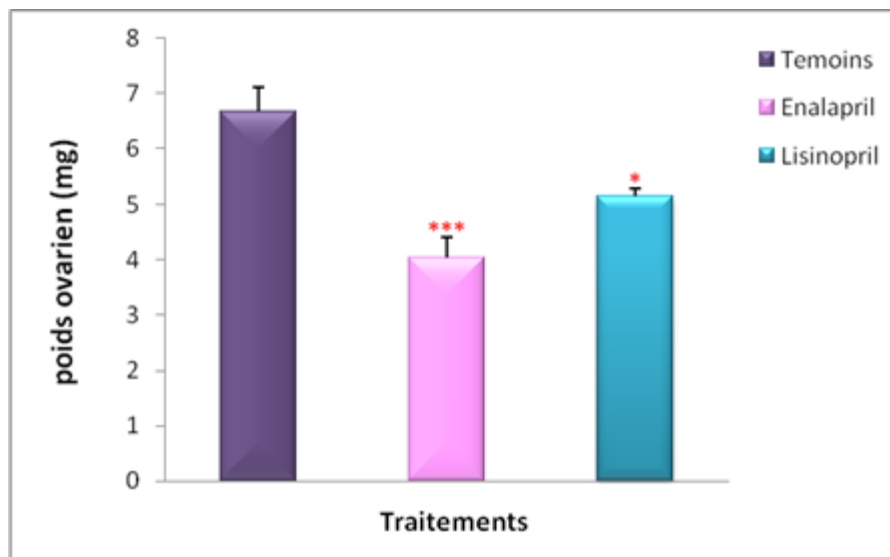
## 2.2. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur la morphométrie de l'ovaire :

L'effet *in vivo* de l'enalapril et du lisinopril a été réalisé par application topique respectivement aux doses 5 $\mu$ g et 10 $\mu$ g/2 $\mu$ l d'acétone sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d'*E. kuehniella*. Le poids frais de l'ovaire, la taille et le volume de l'ovocyte basal, ont été déterminés sur des femelles témoins et traitées. Les dissections des femelles dès leur émergence adulte permettent de prélever les ovaires qui seront dégagés du corps gras et immédiatement pesés.

Les résultats obtenus montrent que l'enalapril entraîne une réduction très hautement significative ( $p = 0,000$ ) du poids frais des ovaires par rapport aux témoins puisqu'il passe de  $6,67 \pm 0,45$  chez les témoins à  $4,02 \pm 0,38$  chez les traitées avec l'enalapril. Alors que le lisinopril réduit le poids frais des ovaires d'une manière significative ( $p = 0,007$ ), il passe de  $6,67 \pm 0,45$  chez les témoins à  $5,15 \pm 0,13$  chez les traitées avec le lisinopril, la comparaison des séries traitées entre elles enregistre une différence significative. ( $P = 0,01$ ) (Tableau 8, Figure 8)

**Tableau 8** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le poids frais des ovaires chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Temoin	Enalapril	Lisinopril
poids (mg) de l'ovaire	$6,67 \pm 0,45$ a	$4,02 \pm 0,38$ b	$5,15 \pm 0,13$ c

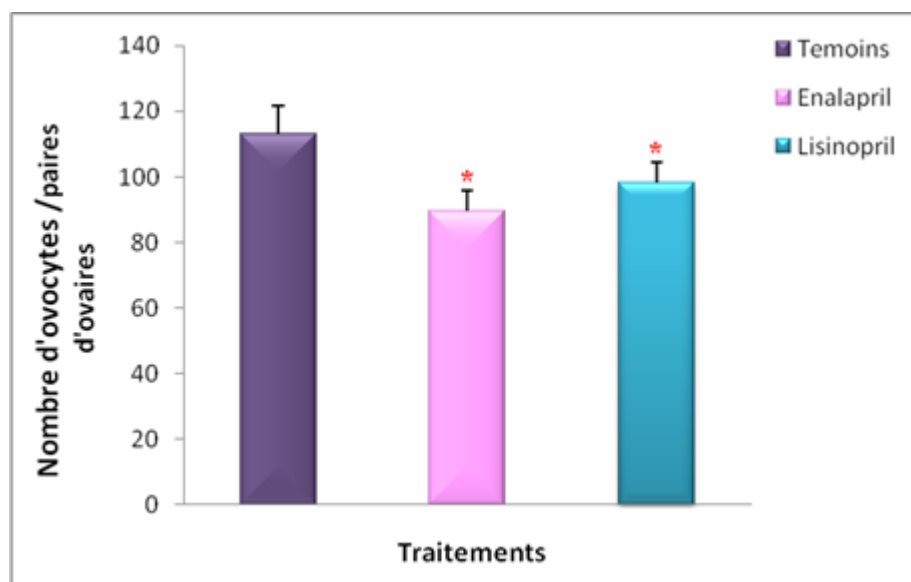


**Figure 8** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le poids frais des ovaires chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

Concernant le nombre d'ovocytes, le tableau 9 et la figure 9 montrent que l'enalapril et le lisinopril entraînent une réduction significative ( $p < 0,05$ ) du nombre d'ovocytes par paire d'ovaire par rapport aux témoins, la comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative.

**Tableau 9** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le nombre d'ovocytes basaux par paire d'ovaire chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Temoin	Enalapril	Lisinopril
Nombre d'ovocytes par paire d'ovaire	$113,25 \pm 8.42$ a	$89,50 \pm 6,21$ b	$98,25 \pm 6,24$ b

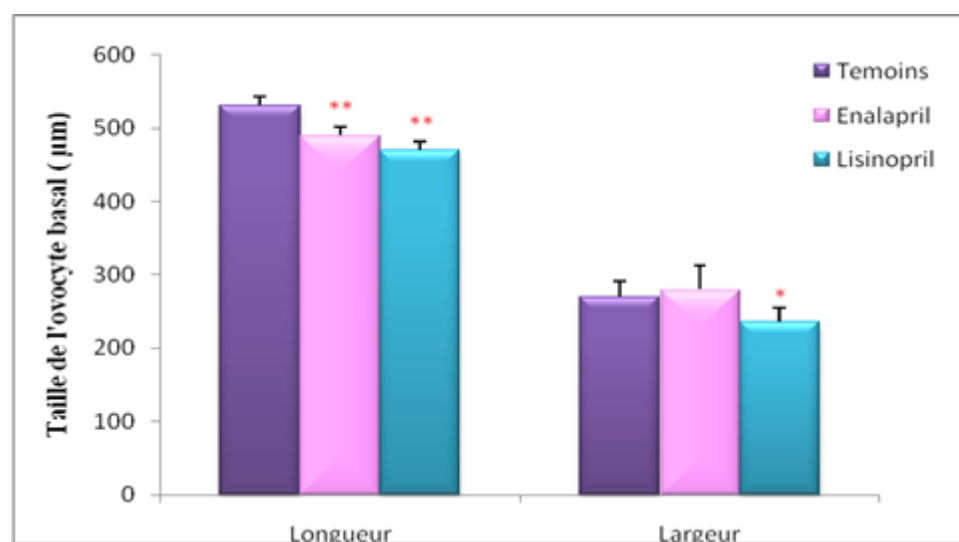


**Figure 9** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le nombre d'ovocytes par paire d'ovaire chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

La comparaison des valeurs moyennes obtenues dans les séries traitées révèle que le lisinopril provoque une réduction très significative ( $p = 0,001$ ) de la longueur de l'ovocyte basal (Tableau 10, Figure 10) et une réduction significative de la largeur de l'ovocyte basal ( $p = 0,05$ ). Cependant, l'enalapril provoque une réduction très significative ( $p = 0,003$ ) de la longueur de l'ovocyte basal et aucun effet significatif ( $p = 0,6$ ) n'a été enregistré sur la largeur de l'ovocyte basal, la comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative.

**Tableau 10** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur la taille de l'ovocyte basal chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Témoins	Enalapril	Lisinopril
Longueur ( $\mu\text{m}$ )	$530 \pm 11,5$ a	$490 \pm 11,5$ b	$475 \pm 10,0$ b
Largeur ( $\mu\text{m}$ )	$270 \pm 20,0$ a	$280 \pm 32,7$ a	$235 \pm 19,1$ a

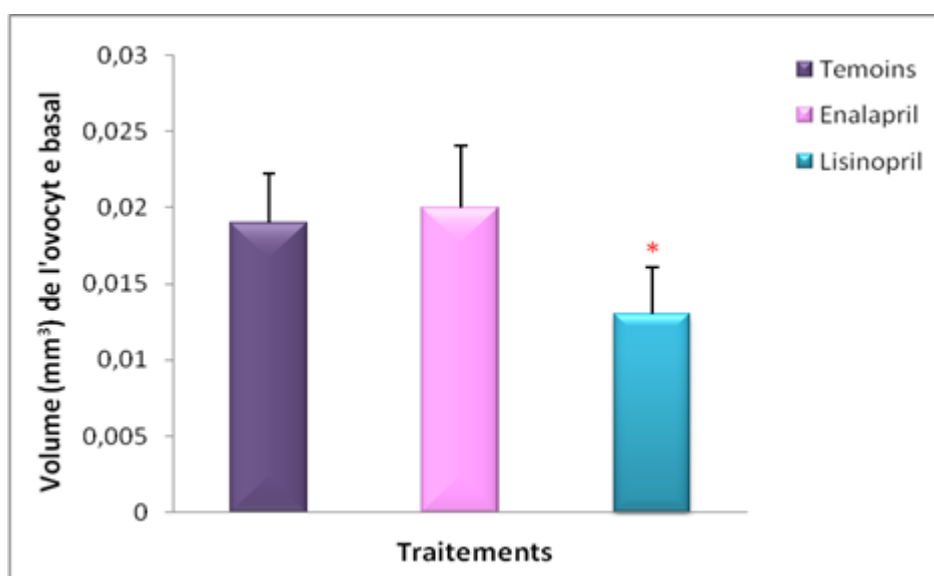


**Figure 10** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur la taille de l'ovocyte basal chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

Le lisinopril entraîne une réduction significative du volume de l'ovocyte basal ( $p = 0,03$ ) alors que l'enalapril n'a aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ) sur volume de l'ovocyte basal par rapport aux témoins, la comparaison des séries traitées entre elles présente une différence significative ( $p = 0,03$ ). (Tableau 11, Figure 11)

**Tableau 11** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le volume ( $\text{mm}^3$ ) de l'ovocyte basal chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Temoin	Enalapril	Lisinopril
volume ( $\text{mm}^3$ )	$0,019 \pm 0,003$ a	$0,020 \pm 0,004$ a	$0,013 \pm 0,003$ b



**Figure 11** : Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le volume de l'ovocyte basal chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.



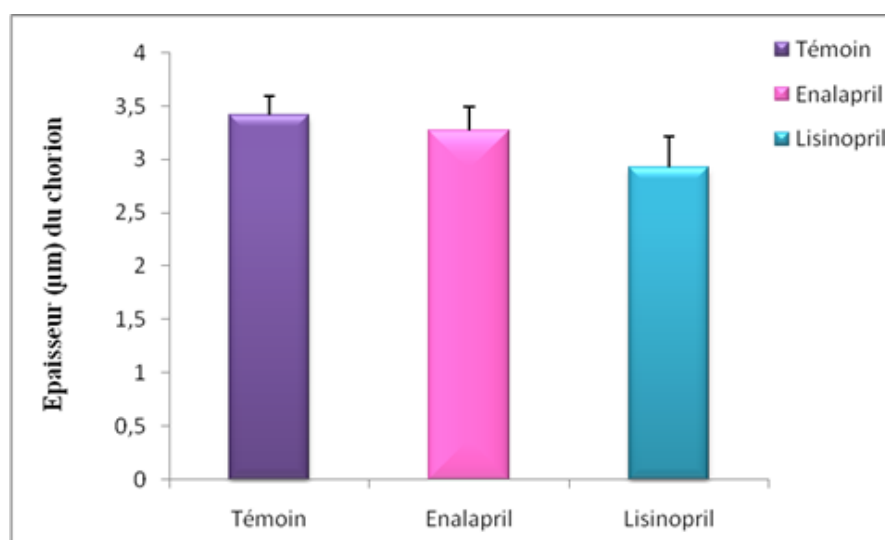
### 2.3. Effet de l'enalapril et le lisinopril sur l'épaisseur du chorion :

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

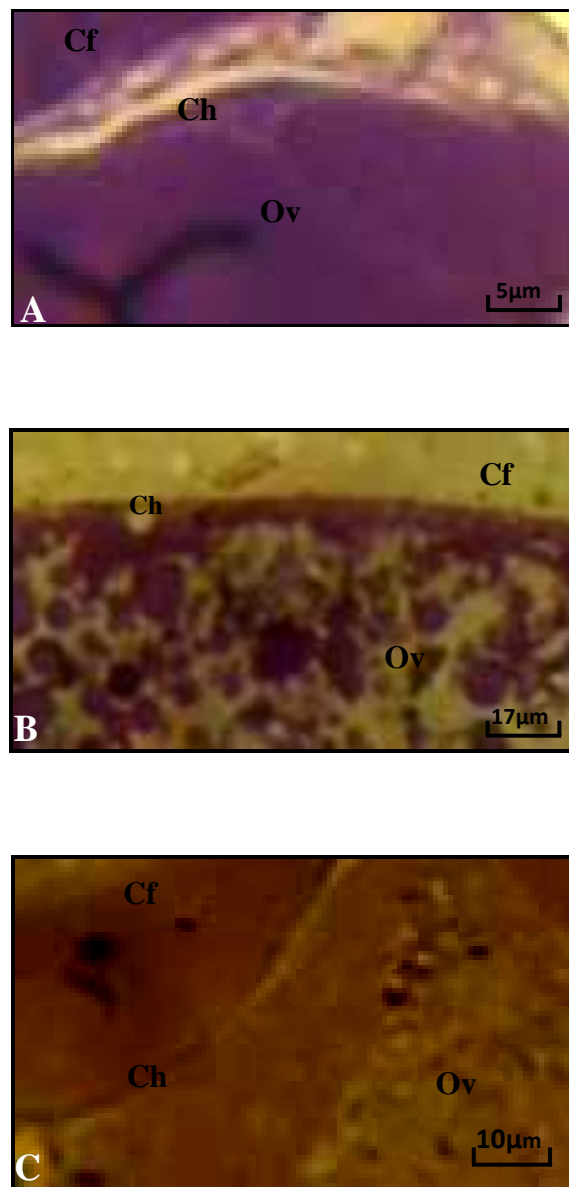
L'épaisseur du chorion a été estimée sur des coupes semi-fines de l'ovocyte basal. Les observations au microscope photonique des ovocytes traités par l'enalapril et le lisinopril ne signalent aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ) sur l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux. (Tableau 12, Figure 12).

**Tableau 12 :** Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles *d'E. kuehniella* sur l'épaisseur du chorion ( $\mu\text{m}$ ) de l'ovocyte basal ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Temoin	Enalapril	Lisinopril
Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )	$3,42 \pm 0,17$ a	$3,27 \pm 0,22$ a	$2,92 \pm 0,3$ a



**Figure 12 :** Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles *d'E. kuehniella* sur l'épaisseur du chorion ( $\mu\text{m}$ ) de l'ovocyte basal ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.



**Figure 13** : Structure semi fine de l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux d'*E. kuehniella*. Témoin (A) (x366), les séries traitée avec l'enalapril (B) (x538) et le lisinopril (C) (x649) (Ch : chorion, Ov : ovocyte, Cf : cellules folliculaires).

## 2.4. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur la composition biochimique des gonades :

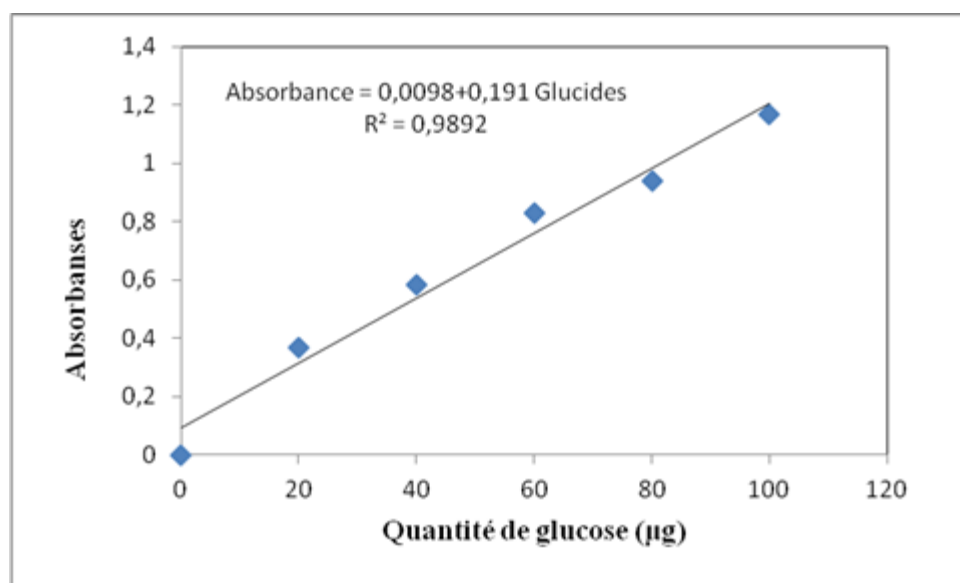
Afin de déterminer l'effet de l'enalapril et du lisinopril sur les métabolites testiculaires et ovariens, les teneurs en glucide, lipide et protéine ont été dosées sur des mâles et des femelles adultes d'*E. kuehniella*. Les courbes d'étalonnage exprimant l'Absorbance en fonction des quantités de métabolites standards nous permettrons d'estimer leurs valeurs sur les mâles et les femelles traités et non traités.

Les tableaux 13, 14, 15 et les figures 14, 15, 16 représentent les droites utilisées pour le calcul des taux des métabolites.

### •Taux de glucides

**Tableau 13 :** Dosage des glucides : réalisation de la gamme d'étalonnage ( $m \pm S$ ;  $n= 4$ )

<b>Quantité du glucose (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Absorbances</b>	0	0,369	0,581	0,831	0,941	1,167

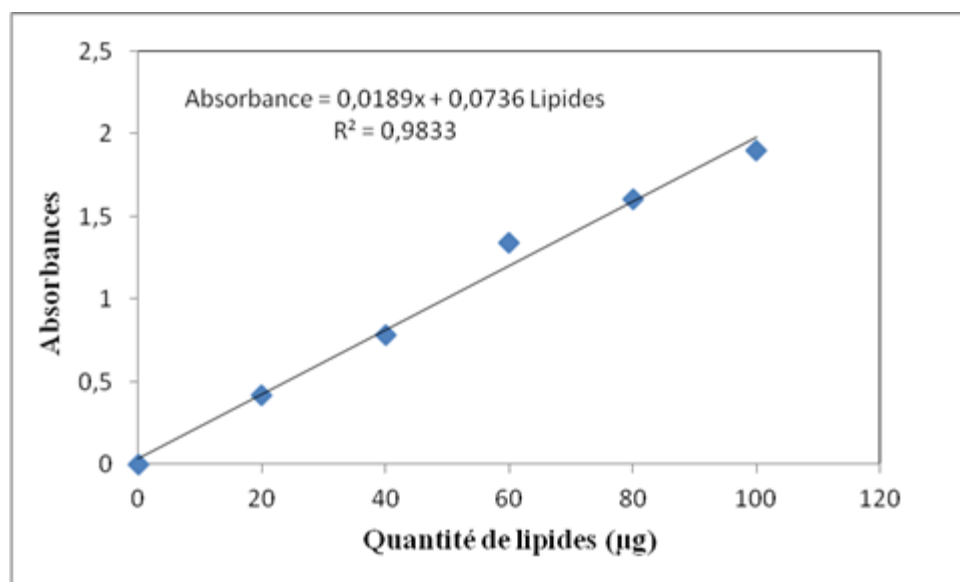


**Figure 14 :** Dosage des glucides: droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités de glucose ( $\mu\text{g}$ ). ( $R^2$  : coefficient de détermination).

- Taux de lipides

**Tableau 14** : Dosage des lipides : réalisation de la gamme d'étalonnage ( $m \pm s$ ;  $n=4$ )

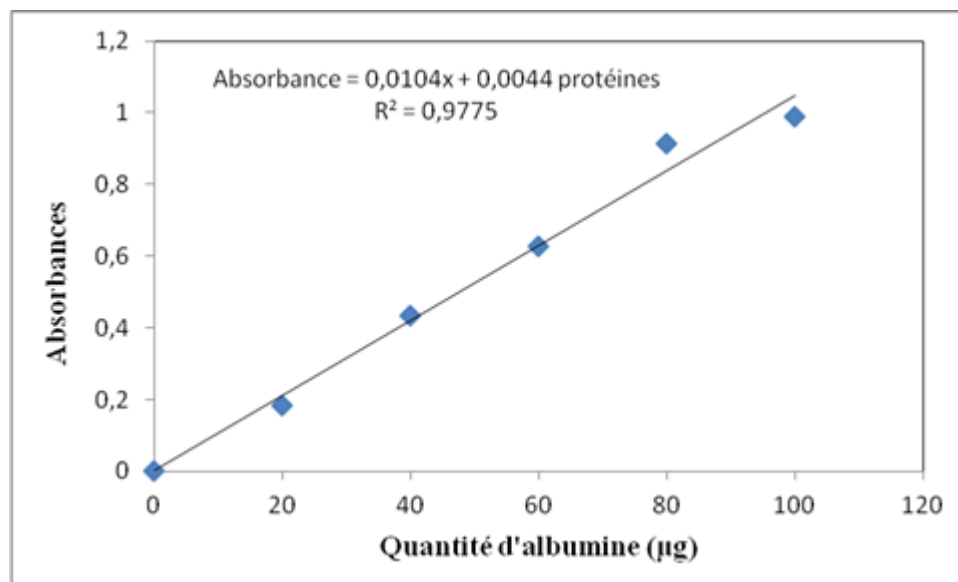
<b>Quantité de lipides (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	0	50	100	150	200	250
<b>Absorbances</b>	0	0,421	0,781	4.337	1.607	1.901

**Figure 15** : Dosage des lipides : droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités de lipides ( $\mu\text{g}$ ). ( $R^2$  : coefficient de détermination).

### •Taux de protéines

**Tableau 15** : Dosage des protéines : réalisation de la gamme d'étalonnage, ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

<b>Quantité d'albumine (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Absorbances</b>	0	0,185	0,465	0,627	0,913	0,988



**Figure 16** : Dosage des protéines : droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités d'albumine ( $\mu\text{g}$ ). ( $R^2$  : coefficient de détermination).

### **2.4.1. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur l'évolution des taux en glucides, lipides et en protéines testiculaires :**

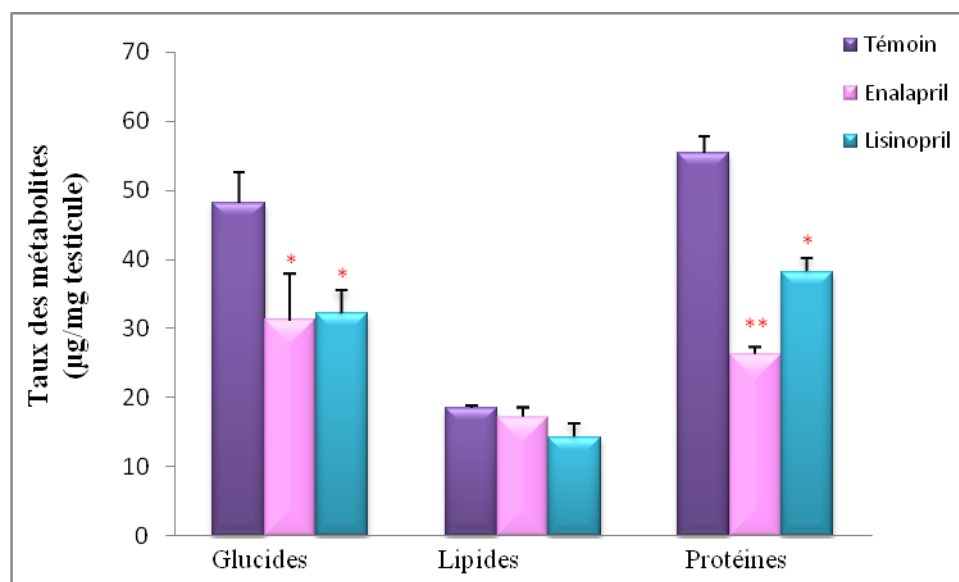
Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de glucose comme standard (Tableau 13, Figure 14). Ils montrent que l'administration de l'enalapril et le lisinopril entraîne une diminution significative ( $p = 0,01$ ) du taux des glucides testiculaires par rapport aux témoins. La comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative. (Tableau 16, Figure 17)

Les quantités des lipides testiculaires sont estimées à partir de la courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction des quantités des lipides standards (Tableau 14, Figure 15). Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les témoins et les traités ( $p > 0,05$ ). (Tableau 16, Figure 17)

L'effet de l'enalapril et du lisinopril sur les taux des protéines testiculaires déterminés à partir de la courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction des quantités d'albumine comme protéine standard (Tableau 15, Figure 16). Une réduction très significative ( $p = 0,003$ ) du taux en protéines a été observée lorsque les chrysalides mâles sont traitées avec l'enalapril et une réduction significative ( $p = 0,007$ ) après traitement des chrysalides mâles avec le lisinopril. La comparaison des séries traitées entre elles enregistre une différence significative ( $p = 0,000$ ). (Tableau 16, Figure 17).

**Tableau 16:** Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le taux des métabolites testiculaire ( $\mu$ g/mg de testicules) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n=4$ ).

Traitement	Metabolites testiculaires ( $\mu$ g/mg testicule)		
	Glucides	Lipides	Proteines
Témoin	48,23 $\pm$ 4,36 <b>a</b>	18,54 $\pm$ 0,33 <b>a</b>	55,40 $\pm$ 2,42 <b>a</b>
Enalapril	31,19 $\pm$ 6,65 <b>b</b>	17,25 $\pm$ 1,16 <b>a</b>	26,23 $\pm$ 0,95 <b>b</b>
Lisinopril	32,17 $\pm$ 3,25 <b>b</b>	14,28 $\pm$ 1,88 <b>a</b>	38,19 $\pm$ 1,88 <b>c</b>



**Figure 17 :** Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le taux des métabolites testiculaires ( $\mu$ g/mg de testicules) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n=4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

### **2.4.2. Effet de l'enalapril et du lisinopril sur l'évolution des taux en glucides, lipides et en protéines ovariens :**

L'étude statistique révèle une augmentation significative des taux de glucides ovariens a été enregistrée chez les insectes traités en comparaison avec les témoins. En effet, chez les témoins on enregistre un taux glucidique de  $11.68 \pm 1.81$  ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) qui sera significativement ( $p = 0,01$ ) élevé à  $23.16 \pm 2.97$  chez les séries traitées avec l'enalapril et à  $16.93 \pm 1.19$  chez les séries traitées avec le lisinopril ( $p = 0,04$ ), et la comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative. (Tableau 17, Fig 18)

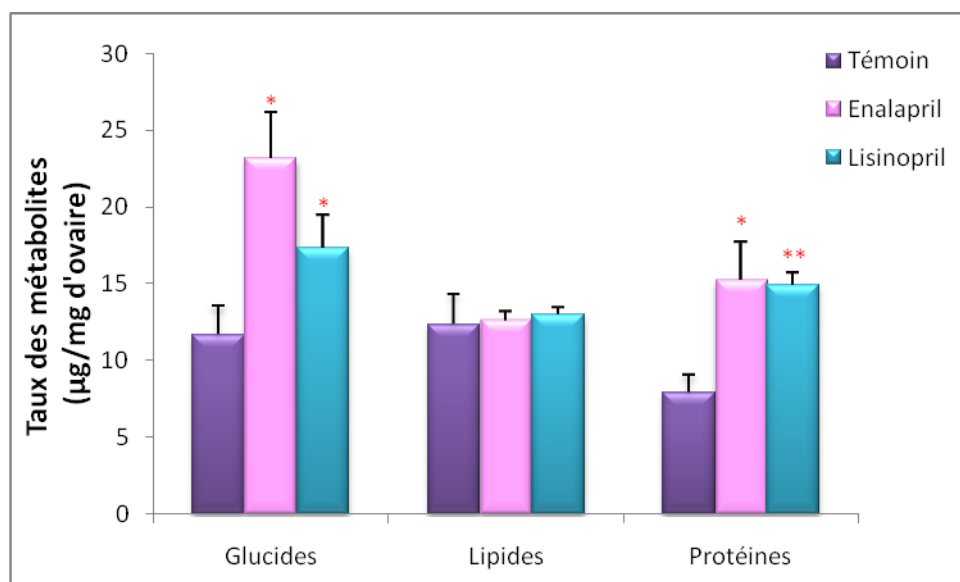
D'après les résultats obtenus, on constate que les taux en lipides ovariens sont approximativement égaux chez les séries témoins et traitées, ce qui laisse l'enalapril et le lisinopril sans aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ). (Tableau 17, Figure 18)

Les taux de protéines ovariennes enregistrés après traitement avec l'enalapril et le lisinopril révèlent une augmentation significative ( $p = 0,04$ ) chez les chrysalides traitées avec l'enalapril et une augmentation très significative ( $p = 0,003$ ) chez les séries traitées avec le lisinopril par rapport aux témoins. La comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative. (Tableau 17, Figure 18)



**Tableau 17 :** Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des métabolites ovariens ( $\mu$ g/mg d'ovaire) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ; n= 4).

Traitement	Métabolites ovariens ( $\mu$ g/mg d'ovaire)		
	Glucides	Lipides	Protéines
Témoin	11,68 $\pm$ 1,81 <b>a</b>	12,37 $\pm$ 1,90 <b>a</b>	7,91 $\pm$ 1,11 <b>a</b>
Enalapril	23,16 $\pm$ 2,97 <b>b</b>	12,61 $\pm$ 0,55 <b>a</b>	15,25 $\pm$ 2,44 <b>b</b>
Lisinopril	16,93 $\pm$ 1,19 <b>b</b>	12,96 $\pm$ 0,44 <b>a</b>	14,89 $\pm$ 0,76 <b>b</b>



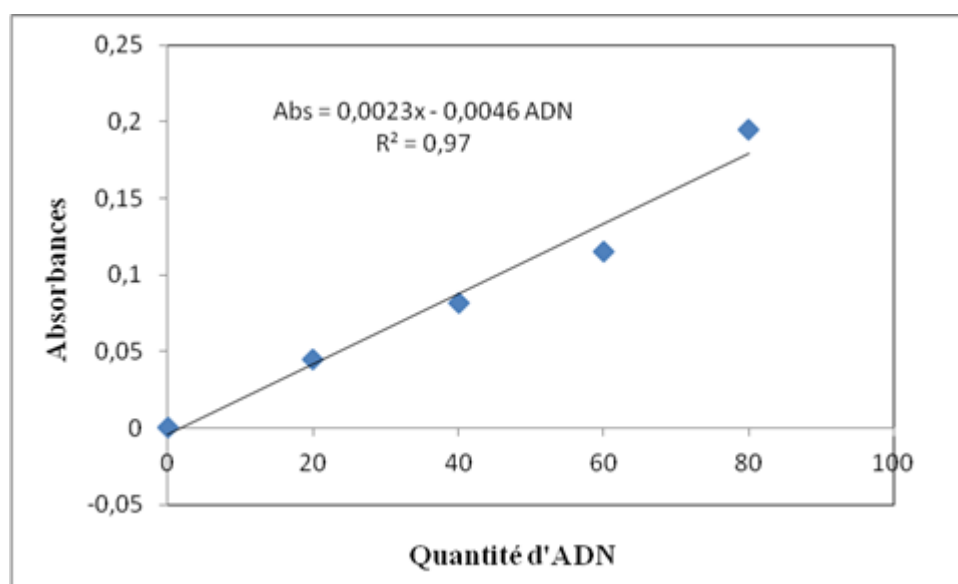
**Figure 18 :** Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des métabolites ovariens ( $\mu$ g/mg d'ovaire) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

### 2.4.3. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur les acides nucléiques

La détermination des quantités d'ADN a été réalisée à partir des courbes de référence exprimant l'absorbance en fonction des quantités d'ADN. (Tableau 18, Fig. 19)

**Tableau 18** : Dosage d'ADN : réalisation de la gamme d'étalonnage ( $m \pm s$ ,  $n=4$ ).

Quantité d'ADN ( $\mu\text{g}$ )	0	20	40	60	80
Absorbances	0	0,045	0,082	0,115	0,195



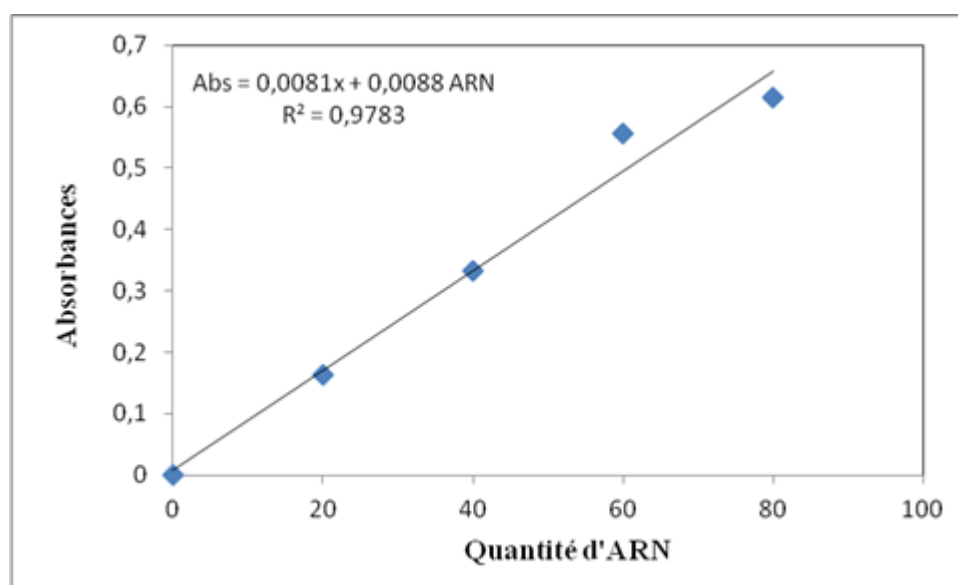
**Figure 19** : Courbe d'étalonnage des Absorbances en fonction des Quantités des ADN ( $\mu\text{g}$ )

(R<sub>2</sub>= coefficient de corrélation).

La détermination des quantités d'ARN a été réalisée à partir de la courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction des quantités d'ARN. (Tableau 19, Figure 20)

**Tableau 19:** Dosage d'ARN : réalisation de la gamme d'étalonnage ( $m \pm s$ ,  $n=4$ ).

Quantité d'ARN ( $\mu\text{g}$ )	0	20	40	60	80
Absorbances	0	0,163	0,332	0,557	0,614



**Figure 20 :** Courbe d'étalonnage des Absorbances en fonction des Quantités des ARN ( $\mu\text{g}$ ) ( $R_2$ = coefficient de corrélation).

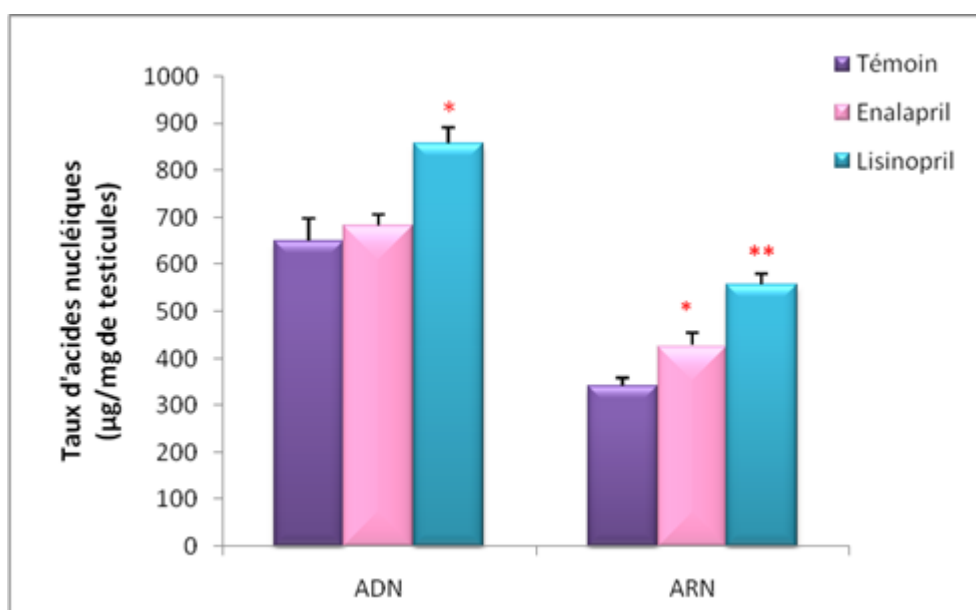
**\*Effets de l'enalapril et le lisinopril sur les acides nucléiques testiculaires :**

Les résultats obtenus sur le taux d'ADN testiculaire montrent que Le lisinopril entraîne une augmentation significative du taux d'ADN ( $p = 0,008$ ) alors que l'enalapril n'a aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ) en comparaison avec les séries témoins. La comparaison des séries traitées entre elles enregistre une différence significative ( $p = 0,006$ ). (Tableau 20, Figure 21).

Concernant l'ARN et comparativement au taux témoin, les taux d'ARN ont été affectés par l'enalapril ( $p = 0,01$ ) d'une manière significative et d'une manière très significative ( $p = 0,001$ ) par le lisinopril où on remarque une élévation du taux d'ARN. La comparaison des séries traitées entre elles, enregistre une différence significative ( $p=0,02$ ). (Tableau 20, Figure 21).

**Tableau 20** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le taux des acides nucléiques testiculaires ( $\mu$ g/mg de testicules) chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitement	Acides nucléiques testiculaires ( $\mu$ g/mg tissue)	
	ADN	ARN
Témoin	650,40 $\pm$ 45,20 a	342,30 $\pm$ 14,50 a
Enalapril	682,30 $\pm$ 22,20 a	427,90 $\pm$ 24,00 b
Lisinopril	857,00 $\pm$ 32,10 b	556,60 $\pm$ 20,90 c



**Figure 21** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur le taux des acides nucléiques testiculaires ( $\mu$ g/mg de testicules) chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

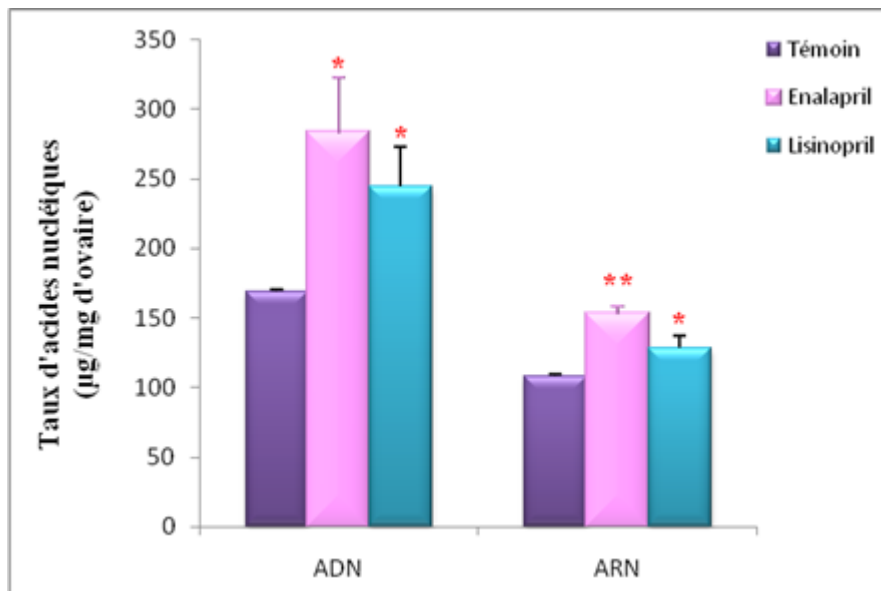
**\*Effets de l'enalapril et le lisinopril sur les acides nucléiques ovariens :**

Les résultats obtenus révèlent que l'administration de l'enalapril et le lisinopril à l'émergence des chrysalides femelles induit une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du taux d'ADN ovariens par rapport aux témoins. La comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative. (Tableau 21, Figure 22)

L'enalapril entraîne une augmentation très significative ( $p = 0,005$ ) du taux d'ARN ovariens alors que le lisinopril provoque une augmentation significative ( $p = 0,05$ ) sur le taux d'ARN ovariens. La comparaison des séries traitées entre elles enregistre une différence significative ( $p = 0,02$ ). (Tableau 21, Figure 22)

**Tableau 21** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des acides nucléiques ovariens ( $\mu$ g/mg d'ovaire) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ; n= 4).

Traitements	Acides nucléiques ovariens ( $\mu$ g/mg tissu)	
	ADN	ARN
Témoin	168,78 $\pm$ 1,18 a	107,51 $\pm$ 1,18 a
Enalapril	282,50 $\pm$ 39,60 b	152,48 $\pm$ 5,26 b
Lisinopril	244,80 $\pm$ 27,50 b	127,99 $\pm$ 8,17 c



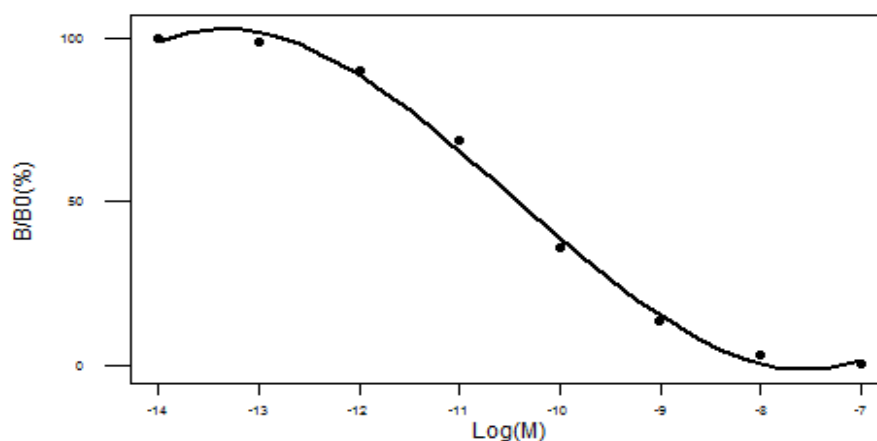
**Figure 22** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5 $\mu$ g/2 $\mu$ l) et du lisinopril (10 $\mu$ g/2 $\mu$ l) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur le taux des acides nucléiques ovariens ( $\mu$ g/mg d'ovaire) chez les adultes d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ; n= 4). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

### 2.5. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur la production des ecdystéroïdes :

La Quantification a été réalisée à partir d'une courbe de référence exprimant le rapport B/B<sub>0</sub> en fonction des logarithmes décimal des concentrations molaires (M) de l'hormone standard l'ecdysone. Les résultats sont exprimés en pg d'équivalent E/mg de tissu. (Tableau 22, Figure 23)

**Tableau 22 :** Analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les adultes d'*E. kuehniella* traités avec l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl). Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B<sub>0</sub> en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E).

Solution standard	Concentration (M)	B/B <sub>0</sub>
1	10 <sup>-14</sup>	100,0
2	10 <sup>-13</sup>	88,0
3	10 <sup>-12</sup>	51,0
4	10 <sup>-11</sup>	19,5
5	10 <sup>-10</sup>	8,0
6	10 <sup>-9</sup>	3,9
7	10 <sup>-8</sup>	1,2
8	10 <sup>-7</sup>	0.4



**Figure 23 :** Analyse quantitative des ecdystéroïdes chez les adultes d'*E. kuehniella* traités avec l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl). Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin), exprimant B/B<sub>0</sub> en fonction des concentrations molaires (M) de l'ecdysone (E).

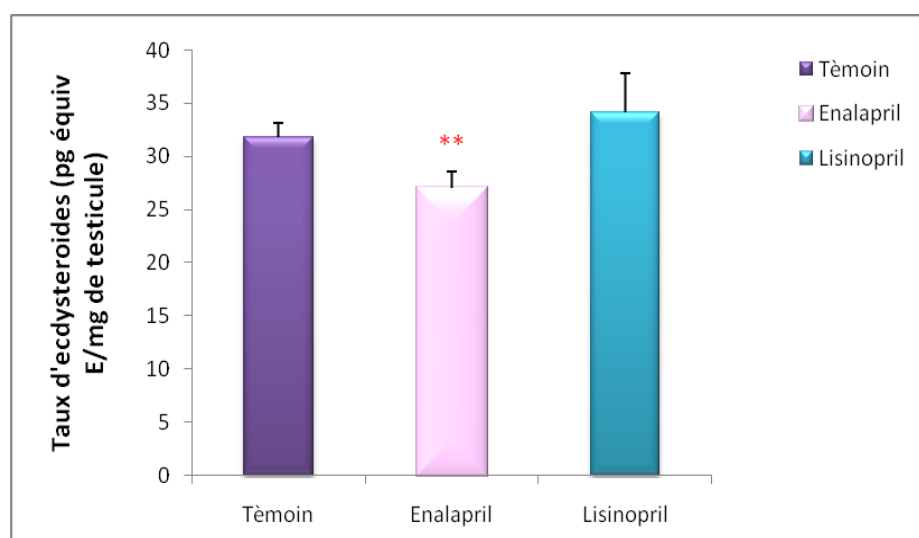


### 2.5.1. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur la production des ecdystéroïdes testiculaires :

Chez les témoins, le taux d'ecdystéroïdes testiculaires est de  $31,84 \pm 1,25$  pg équiv. E/mg de tissu testiculaire, il est significativement diminué après traitement des mâles avec l'enalapril dès l'émergence nymphale où il passe à  $26,99 \pm 1,58$  pg/mg alors que le lisinopril n'enregistre aucun effet significatif en comparaison avec les témoins. La comparaison des séries traitées entre elles enregistre une différence significative. (Tableau 23, Figure 24).

**Tableau 23:** Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur les taux d'ecdysteroïdes exprimés en pg équivalent E/mg de testicule chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Témoin	Enalapril	Lisinopril
Taux d'ecdystéroïdes testiculaires	$31,84 \pm 1,25$ a	$26,99 \pm 1,58$ b	$34,12 \pm 3,73$ a



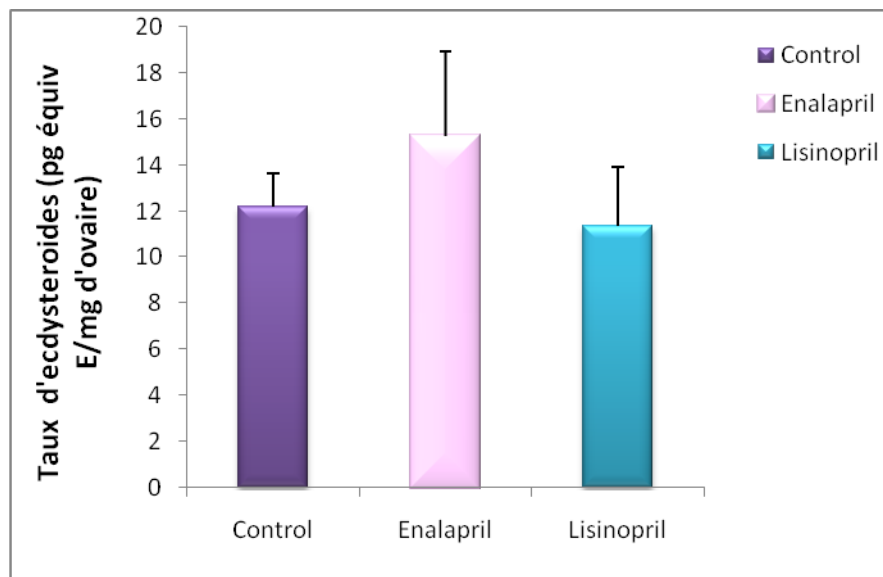
**Figure 24 :** Effet *in vivo* de l'enalapril ( $5\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) et du lisinopril ( $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles sur les taux des ecdysteroïdes exprimés en pg équivalent E/mg de testicule chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

### 2.5.2. Effets de l'enalapril et le lisinopril sur la production des ecdystéroïdes ovariennes :

Chez les femelles les résultats montrent que l'administration de l'enalapril et du lisinopril à l'émergence des chrysalides n'affecte pas le taux d'ecdystéroïdes ovariens exprimé en pg équivalent E/mg d'ovaire et la comparaison des séries traitées entre elles ne présente pas une différence significative. (Tableau 24, Figure 25).

**Tableau 24** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur les taux des ecdysteroides exprimés en pg équivalent E/mg d'ovaire chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ).

Traitements	Témoin	Enalapril	Lisinopril
Taux d'ecdystéroïdes ovariens	12,18± 1,42 a	15,23± 3,71 a	11,37± 2,53 a



**Figure 25** : Effet *in vivo* de l'enalapril (5µg/2µl) et du lisinopril (10µg/2µl) administrés par application topique à l'émergence des chrysalides femelles sur les taux des ecdysteroides exprimés en pg équivalent E/mg de tissu chez les adultes *d'E. kuehniella* ( $m \pm s$ ;  $n= 4$ ). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins.

---

---

# *DISCUSSION*

---

---

### 3. DISCUSSION

#### 3.1. Effets sur la morphométrie des gonades :

Chez les lépidoptères comme chez *Ephestia kuehniella*, l'ovaire est méroïstique polytrophique (William, 1971). Le tractus génital féminin est strictement ectodermique, il se développe à partir d'ébauches situées au niveau des sternites 7, 8 et 9 chez les larves du 6ème stade. La différenciation de ses composants se réalise pendant la nymphose, alors que la différenciation des ovarioles est précoce, elle s'effectue chez la larve du 2ème stade, ceux-ci sont en effet distincts au sein du tissu interstitiel le l'ovaire. Les follicules comprennent un ovocyte surmonté de trophocytes. Grâce à des liaisons cytoplasmiques, les trophocytes fournissent à l'ovocyte un apport important de matériaux nutritifs pendant toute sa première période de développement (Raabe, 1973).

D'après les données acquises pendant notre expérimentation menée *in vivo* sur les mâles et les femelles adultes d'*E. kuehniella*, nous avons constaté que l'enalapril et le lisinopril administrés par application topique à l'émergence des chrysalides mâles et femelles réduisent le poids frais des ovaires et le nombre d'ovocytes ainsi que la taille et le volume de l'ovocyte basal. Ils réduisent également le poids frais et la taille des testicules. De ce fait, ces deux molécules agissent pareillement sur la morphométrie des gonades chez les deux sexes. Ces résultats peuvent s'expliquer par la perturbation de l'ovogénèse, la vitellogénèse et la spermatogénèse (Seth *et al.*, 2002; Dhadialla *et al.*, 1998).

Des résultats similaires ont été rapportés avec de nombreuses molécules d'insecticides et chez de nombreuses espèces. En effet, l'application topique d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine le captopril, perturbe la croissance et le développement des ovaires de *Tenebrio molitor* (Redjehimi-Bouteldja, 2006).

D'autre part Isaac *et al.* (2007) ont constaté que les inhibiteurs de l'ECA injectés aux larves femelles de *Manduca sexta* (4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> stades larvaires) ont ralenti la croissance larvaire. Le lisinopril et le captopril ont réduit la croissance pendant 3 jours après l'injection chez cette même espèce. De plus une étude menée par Isaac *et al.* (2006) sur *Lacanobia oleracea* révèle que le lisinopril et le captopril affectent la durée d'oviposition ainsi que la fécondité des femelles.

Dans le même contexte, l'effet du halofénozide ou RH-0345 un agoniste des ecdysteroides administré à *E. kuehniella*, révèle également son efficacité sur la biométrie des

ovaires en réduisant le poids frais, la taille et le volume des ovocytes et des œufs pondus (Taibi, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus avec le méthoxyfénazole (RH-2485), un autre mimétique de l'hormone de mue, testé sur des femelles d'*E. kuehniella* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2010) et avec le chlorofluazuron, inhibiteur de la synthèse de la chitine testé sur les femelles de *Spodoptera littoralis* (Perveen & Miyta, 2000).

Un autre agoniste des ecdystéroïdes, le RH-5849, provoque une perturbation du développement des ovaires chez les lépidoptères (Aller et Ramsay, 1988 ; Salem *et al.*, 1997), les coléoptères (Wing & Ramsay, 1989) ou encore les diptères (Smaggh & Degheele, 1992). Des perturbations de la morphométrie des ovaires avec le RH-5849 et le tébufénazole (RH-5992) sont également observées chez *E. kuehniella* (Khebbab *et al.*, 2008), *Plodia interpunctella* (Silhacek *et al.*, 1990; Auzoux-Bordenave, 2005), *S. littoralis* (Smaggh & Degheele, 1992) *Spodoptera exempta* (Smaggh & Degheele, 1994c); *Mamestra brassicae* et *Pieris brassicae* (Darvas *et al.*, 1992).

Le mécanisme d'action sur la reproduction n'est pas encore bien établi et l'impact sur les mâles est peu ou pas abordé. Récemment, Bouzeraa & Soltani-Mazouni (2012) ont comparé l'activité de deux agonistes de l'hormone de mue (méthoxyfénazole et tébufénazole) administrés par application topique sur les chrysalides des deux sexes à la fois sur le développement et divers paramètres de la reproduction chez *E. kuehniella*. Le méthoxyfénazole semble manifester des effets plus marqués sur la viabilité et la taille des œufs.

Il a été rapporté aussi que le RH-5992 induit une réduction du poids des testicules chez *E. kuehniella* (Khebbab *et al.*, 2008), réduit également la fertilité des mâles avec une chute du nombre de spermatozoïdes eupyrrènes chez *Helicoverpa zea* (Carpenter & Chandler, 1994), *Cydia pomonella* (Sun & Barrett, 1999), *Argyrotaenia velutinana* et *Choristoneura rosaceana* (Sun *et al.*, 2000).

### **3.2. Effet sur l'épaisseur du chorion :**

Chez les insectes les enveloppes de l'œuf (membrane vitelline et chorion) sont synthétisées par les cellules folliculaires à la fin de la vitellogénèse (Telfer, 2009), elles jouent un rôle important dans le maintien de l'espèce. En effet, elles assurent la protection mécanique de l'œuf, et les échanges respiratoires de l'organisme en voie de développement avec le milieu et elles empêchent également la déshydratation de l'œuf (Wigglesworth, 1965 ; Lafont, 1994).

La vitellogénèse débutent chez *E.kuehniella* à 4 jours après la mue nymphale, et la choriogénèse commence deux à six heures après l'exuviation adulte (Zimowska *et al.*, 1995). Dans certains cas chez les lépidoptères, la sécrétion de des enveloppes de l'œuf nécessite l'action conjointe de deux hormones, l'hormone de mue et l'hormone juvénile (Cassier *et al.*, 1997 ; Kidikora *et al.*, 2006).

D'après les données acquises pendant notre expérimentation, le traitement avec l'enalapril et le lisinopril est sans effet sur l'épaisseur du chorion. Ceci est en accord avec les résultats obtenus avec le captopril chez *T. molitor* par Redjehimi-Bouteldja. (2006) et par Hami. (2013) sur *E. kuehniella* après application du pyriproxifène (un analogue de l'hormone juvénile) à la DL50 seul et en combinaison avec le RH-2485.

D'autres expérimentations montrent que l'administration du RH-5992 et du RH-0345 réduit significativement l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux chez *E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005).

L'application du tébufénozide aux femelles adultes de *Plodia interpunctella* provoque une dégénérescence des ovaires et du chorion après deux jours de traitement (Salem *et al.*, 1997).

D'après nos résultats sur l'épaisseur du chorion après traitement des chrysalides d'*E. kuehniella* par l'enalapril et le lisinopril, on peut suggérer une corrélation de la choriogénèse avec la production des ecdystéroïdes et la vitellogénèse.

### **3.3. Effet sur le taux des métabolites :**

La reproduction chez les insectes est conditionnée par des facteurs physiques et trophiques au cours desquels une grande quantité d'énergie chimiques (protéines, lipides, glucides) est transportée vers les gonades (Marangos *et al.*, 1988).

Sur le plan fonctionnel, la vitellogénèse est une phase d'accroissement ovocytaire. En effet, elle commence par l'accumulation des trois types classiques de réserves vitellines: lipides (triglycérides, lipoprotéines), glucides (glycogène), protéines et sels minéraux (Cassier *et al.*, 1997). Les globules lipidiques paraissent élaborés à partir d'un matériel qui transite par le réticulum puis l'appareil de Golgi. Il provient des corps gras *via* l'hémolymphe sous forme de lipoprotéines, il représente une partie importante des réserves. Les glucides, représentent également l'élément énergétique de l'organisme jouant un rôle essentiel dans la physiologie des insectes (Casier *et al.*, 1997). Les taux de glycogène et de tréhalose, dans les tissus et l'hémolymphe, sont étroitement liés aux événements physiologiques comme la mue et la

reproduction (Wiens & Gilbert, 1968). Enfin, les protéines qui sont nombreuses et variées, sont classées comme suit:

- Vitellines, qui proviennent des vitellogénines présentes dans l'hémolymphe et produites par le corps gras. Ces vitellogénines sont captées par les ovocytes grâce à des récepteurs spécifiques présents sur leurs membranes sous l'effet de la JH (Harnish & White, 1982; Engelmann, 1983; Kunkel & Nordin, 1985). La vitellogénine représente 60 à 90% du vitellus chez la plupart des insectes.

- Protéines circulantes, qui sont captées de façon non spécifique.

- Paravitellines parfois majoritaires qui sont des protéines sécrétées par les cellules folliculaires.

- Protéines produites par les ovocytes et/ou les trophocytes (vitellogénèse endogène).

Pour cette raison, nous avons dosé les principaux métabolites dans les testicules et les ovaires afin de déterminer d'éventuelles variations dans leur métabolisme biochimique. Selon les résultats, il est apparu que l'administration de l'enalapril et le lisinopril entraîne une diminution significative du taux des glucides et des protéines testiculaires ce qui enregistre un effet inhibiteur sur la constitution biochimique chez les mâles, par contre ils provoquent une augmentation du taux des glucides et des protéines ovariens, cet effet stimulateur pourrait être dû à des effets différés au cours de l'ovogénèse.

D'autre part aucun effet n'a été enregistré effet sur les taux en lipides testiculaires et ovariens après traitement par ces deux molécules.

Les résultats acquis par Soltani-Mazouni *et al.*, (2007) révèlent une réduction des taux en glucides et protéines chez *T. molitor* après traitement des femelles par le captopril.

D'autres travaux ont déterminé après traitement des femelles par le méthoxyfénozide entraîne une réduction des taux des glucides, protéines et lipides des ovaires d'*E. kuehniella* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). Un autre agoniste des ecdystéroïdes, le RH-0345, entraîne une diminution des taux de glucides et lipides chez *E. kuehniella* et *T. molitor* (Taibi *et al.*, 2003). Khebbab *et al.* (2008) ont montré que l'administration du RH-5992 aux chrysalides males et femelles d'*E. kuehniella* réduit les taux de glucides et lipides testiculaires et ovariens. Une diminution significative des différents métabolites ovariens (glucides, lipides et protéines) a été enregistrée chez *S. littoralis* après traitement par le chlorfuozuron (Perveen, 2011)

L'activité du sperme a été prouvée par ces constituants biochimiques comme source d'énergie, le liquide séminale également est riche en acides aminés, le glycogène et les

phospholipides (Charniaux & Payen, 1988). La diminution de taux en protéines testiculaires chez *S.littoralis* après traitement par le chlorfluazuron est expliquée par l'accumulation des protéines dans l'hémolymphe, et l'interférence avec les mécanismes contrôlant la spermatogénèse (Perveen, 2011), ce qui est en accord avec nos résultats.

#### **3.4. Effets sur le taux des acides nucléiques :**

Les êtres vivants sont constitués de certaines biomolécules (acides nucléiques, protéines) d'une complexité telle que ces molécules sont dotées de propriétés biologiques notamment la reproduction (Bergeron & Regnault, 1980).

Chez insectes, l'épithélium folliculaire est le seul tissu synthétisant l'ADN (Schlottman & Bonhag 1956 ; Ulmann 1973). Presque tout l'ARN stocké dans les ovocytes méroïstiques, dérive des cellules nourricières alors que le génome de l'ovocyte est inactivé (Berry, 1985). 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 chez *E. kuehniella*, le processus de la vitellogénèse se déroule durant le stade nymphal. Ainsi, à l'émergence des papillons, la vitellogénèse est terminée, également au moment de la maturité, les cellules germinales se transforment en spermatozoïdes après un certains nombres de divisions successives : la mitose (divisions cellulaires classiques) et la méiose qui divise par deux le nombre de chromosomes après réplifications de l'ADN. Selon Ramaswamy & Cohen (1992), l'ARN messenger joue un rôle dans la synthèse des protéines nécessaire à la formation des organites des spermatozoïdes tels que les mitochondries. Plusieurs processus biologiques peuvent influencer sur la quantité d'ARN dans une cellule incluant les processus de détoxification ou de stress ainsi que les variations des autres formes d'ARN.

Nos résultats montrent que le lisinopril stimule la synthèse des acides nucléiques testiculaires et ovariens. De plus l'énélapril n'as pas d'effet sur l'ADN testiculaire mais stimule la synthèse des ARN testiculaire et des acides nucléiques ovariens.

Des résultats obtenus chez *T. molitor* indiquent que le captopril n'a pas d'effet significatif sur le taux ovariens en ADN et ARN (Soltani-amazouni *et al.*, 2007).



Les travaux de Meskache et Soltani-Mazouni. (2013) enregistrent un effet traitement hautement significatif sur la quantité d'ADN testiculaire chez les adultes d'*E. kuehniella*. Celle-ci est réduite par le RH-5849, l'halofenozide et le RH-2485 contrairement au RH-5992 qui la stimule. Une augmentation du taux des acides nucléiques a été enregistrée par Soltani-Mazouni & Hami. (2010) après traitement des femelles d'*E. Kuehniella* par le RH-5992.

Le traitement avec d'autres agonistes des ecdystéroïdes le RH-0345, RH-5849 ainsi le RH-5992 entraîne une réduction du contenu ovarien en ADN chez *T.molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001).

Dans une étude antérieure, Mitlin *et al.* (1977) ont montré que la diminution de l'activité sexuelle chez *Anthonamus grandis* résulte de l'inhibition de la synthèse d'ADN par le diflubenzuron (DFB) un autre inhibiteur de la synthèse de la chitine chez les femelles adultes. Alors que Bendjeddou (1993) après traitement des femelles d'*E. Kuehniella* par le flucycloxuron (FCX) un autre inhibiteur de la synthèse de la chitine, constate une stimulation de la synthèse de l'ADN ovarien chez un lépidoptère *Ephestia kuehniella*.

### 3.5. Effet sur les ecdystéroïdes :

Les ecdystéroïdes sont formés par les insectes à partir des stérols alimentaires, ils les transforment après ingestion en cholestérol. Ce dernier subit diverses oxydations et hydroxylations pour fournir l'ecdysone qui sera à son tour convertie en 20E par l'enzyme Ecdysone-20- monooxygénase (Feyereisen & Durst, 1978; Smith *et al.*, 1979; Smith, 1985).

De nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré l'implication de l'ecdysone ainsi que certaines neurohormones dans le contrôle de la physiologie reproductive (Barth et Lester, 1973 ; Koeppi *et al.*, 1985 ; Hagedorne, 1985 ; raina et klun, 1984). Chez tous les Arthropodes, les ecdystéroïdes servent d'hormones de croissance voire de régulateurs d'embryogenèse, mais, ils servent aussi chez certains à synchroniser les événements liés à la reproduction. Plusieurs travaux ont été consacrés à la régulation endocrine notamment chez les insectes. Ils montrent que les ecdystéroïdes jouent un rôle majeur et sont présents à tous les stades de la vie de l'insecte.

Les ecdystéroïdes sont synthétisés dans les cellules folliculaires et les testicules et jouent un rôle dans la vitellogenèse, la spermatogénèse et la réinitiation de la méiose. (Riddiford, 1985, 1994 ; Romana *et al.*, 1995). En effet, chez les femelles de *Musca domestica*, des faibles doses d'ecdystéroïdes sont enregistrées à la pré-vitellogénèse, suivie par un pic au cours de la vitellogénèse proprement dite, puis une diminution des taux est

enregistrée à la post-vitellogénèse pour la synthèse du chorion (Adams *et al.*, 1988). Ils sont transférés à partir des ovaires maternels, sous forme conjuguée (ester de phosphate ou d'acide gras). Ces conjugués, interprétés comme des formes de stockage, seraient ensuite hydrolysés pour leur rendre leur forme active. chez le criquet, au cours du développement embryonnaire, un pic d'ecdystéroïdes après une douzaine d'heures d'oviposition semble jouer un rôle dans la gastrulation (Lanot *et al.*, 1989). En revanche, il a été démontré qu'un niveau élevé d'ecdystéroïdes est nécessaire à l'élongation de la bande germinative par stimulation des mitoses (Kozlova & Thummel, 2003 ; Lanot *et al.*, 1989; Kidokoro *et al.*, 2006) .

Les résultats obtenus chez *E. kuehniella* montrent que seul l'enalapril réduit très significativement le taux des ecdystéroïdes testiculaires, tandis que l'administration du lisinopril et l'enalapril n'a aucun effet sur le taux des écdysteroides ovariens.

L'analyse quantitative des ecdysteroides au cours du stade nymphale après traitement des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* par le lisinopril révèle une diminution significative dans le 3<sup>ème</sup> jour (Kirane-Amrani & Solani-Mzouni, 2012). Une diminution du taux des ecdystéroïdes ovariens a été enregistrée par Issac *et al.* (2006) après traitements des femelles de *S. littoralis* par le lisinopril. D'autre part Vercruysse *et al.* (2004) ont démontré que l'administration du captopril aux chrysalides de *S. littoralis* exerce un effet inhibiteur sur le taux des ecdysteroides au cours du stade nymphal chez les femelles, alors qu'aucun effet n'a été signalé chez les mâles.

Plusieurs études récentes marquent la présence des interactions réciproques entre l'enzyme de conversion de l'angiotensine et la production des ecdystéroïdes (Loeb *et al.*, 1998; Quan *et al.*, 2001; Vandingenen *et al.*, 2001; Siviter *et al.*, 2002). De plus Loeb *et al.* (1998) montre que la stimulation de la synthèse des ecdystéroïdes par l'ACE peut être due à des effets feedback. Ces expériences ont montré que les deux ACE bovine et l'angiotensine II

bovine stimulent la synthèse des ecdystéroïdes par les testicules chez *Lymantria dispar* au cours du stade nymphale.

D'autres résultats obtenus par Soltani-Mazouni *et al.* (2010) montrent que le traitement des femelles d'*E. kuehniella* par le RH-2485 augmente le taux des ecdystéroïdes ovariens. Des résultats similaires ont été enregistrés par Hami *et al.* (2005) après traitement des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* par le RH-0345.

La concentration des hormones chez les insectes peut être modifiée par des interférences avec la biosynthèse des hormones, de la transformation et de la dégradation.

Plusieurs facteurs, des hormones et des peptides, peuvent influencer la biosynthèse des ecdystéroïdes (Lafont *et al.* 2005).

D'après notre expérimentation l'enalapril semble inhiber la production des ecdystéroïdes testiculaires.

---

*CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES*

---

---

---

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présence de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) chez les vertébrés et les invertébrés, la conservation de sa structure et ces différentes fonctions dans l'osmorégulation, la modulation du processus de mémorisation confèrent à cette enzyme multifonctionnelle sa conservation dans l'évolution.

Dans les présentes expérimentations nous sommes intéressés à l'efficacité de l'enalapril et du lisinopril, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les molécules ont été évalués, en application topique, sur des chrysalides nouvellement exuviées sur quelques paramètres de la reproduction d'un ravageur des stockées de farine, *Ephestia kuehniella* durant la vie adulte où les gonades sont fonctionnelles.

Leurs impacts sont étudiés sur la morphométrie des testicules (poids et taille des testicules), des ovaires (poids de l'ovaire, nombre d'ovocyte par paire d'ovaire et la taille de l'ovocyte basal), la cytologie des ovaires et la biochimie des gonades (contenu en protéines: Bradford, 1976 ; glucides: Duchateau et Florin, 1959, lipides: Goldsworthy *et al*, 1972 acides nucléiques: Schneider, 1957) mais aussi la production des ecdystéroïdes.

L'enalapril et le lisinopril perturbent la spermatogénèse, l'ovogénèse ainsi que la vitellogénèse en provoquant :

- Une diminution de la taille des testicules.
- Une diminution du nombre d'ovocytes et la taille de l'ovocyte basal.
- Une diminution du contenu des différents métabolites (glucides, protéines) testiculaires.
- Une augmentation du des différents métabolites (glucides, protéines) ovariens.
- Une accumulation des acides nucléiques ovariens et testiculaires

L'effet de l'enalapril a été parqué également sur le taux des ecdystéroïdes testiculaires où il a été enregistré une diminution significative par rapport aux témoins.

Il serait intéressant de compléter ce travail par une évaluation de ces molécules sur :

- Une étude le développement de cette même espèce
  - Le potentiel reproducteur des femelles en traitant les mâles
  - Une étude ultrastructurale des gonades
  - Une analyse qualitative et quantitative des protéines ovariennes et testiculaires.
- 
-

---

---

# ***RESUMES***

---

---

---

---

## RESUME

Le peu de travaux réalisés sur le rôle de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le développement nous a conduit à réaliser cette étude dans le but d'inhiber cette enzyme par l'enalapril et le lisinopril des médicaments souvent utilisés dans le traitement de la tension artérielle chez les mammifères, vu l'existence de cette enzyme chez les insectes nos expérimentations consistent à étudier le mode d'action des inhibiteurs de l'ACE afin de mieux connaître leurs effets sur les séries témoins et traitées.

L'enalapril et le lisinopril ont été administrés par application topique, à l'émergence des chrysalides mâles et femelles d'un ravageur des denrées stockées *E. kuehniella* (Lépidoptère) nouvellement exuviées respectivement aux doses de 5µg et 10µg/2µl d'acétone. Nos expérimentations mettent en évidence l'action de ces médicaments sur plusieurs paramètres de la reproduction :

L'étude morphométrique des gonades chez les mâles et les femelles traités par l'enalapril et le lisinopril, révèle une perturbation de la croissance des testicules et ovaires d'*E. kuehniella*. Ils réduisent le poids et la taille des gonades, le nombre d'ovocyte par paire d'ovaire, le volume de l'ovocyte basal au cours de la maturation sexuelle. Ces anomalies morphométriques des gonades induites par l'enalapril et le lisinopril ont affecté la reproduction de l'espèce. De plus les deux molécules n'ont aucun effet sur l'épaisseur du chorion.

L'étude biochimique des gonades d'*E. kuehniella* révèle une inhibition des principaux métabolites (glucides, protéines) testiculaires, une accumulation significative des acides nucléiques testiculaires, glucides, protéines et acides nucléiques ovariens.

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes dans les gonades révèle que l'enalapril inhibe la synthèse des écdystéroïdes testiculaires par rapport aux témoins. Tandis que la production des écdystéroïdes ovariens n'a pas été affectée par les deux molécules.

**Mots clés:** *E. kuehniella*, enalapril, lisinopril, reproduction.

## ABSTRACT

Few works realised on the role of enzyme of conversion of angiotensin (ACE) in the 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, for the existence of this enzyme in insects our experiments are to study the mode of action of ACE inhibitors to better know their effects on control and treated series.

The enalapril and lisinopril are carried out by topical administration to new pupae of stored product insect pests *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, pyralidae), they were used respectively at 5µg and 10 µg/2µl of acetone.

Our experiments highlight the action of this drug on several aspects of the reproduction:

The morphometric study of the gonads in males and females treated with enalapril and lisinopril indicates disruption of the growth of the testes and ovaries of *E. kuehniella*. They reduce the weight and size of the gonads, the number of oocyte, the volume of the oocyte basal during the sexual maturation. These morphometric abnormalities of gonads induced by enalapril and lisinopril have affected the reproduction of the species. In addition both molecules have no effect on the thickness of the chorion.

The biochemical study of the gonads of *E. kuehniella* reveal inhibition of the major testicular metabolites (carbohydrates, proteins), a significant accumulation of testicular nucleic acids, carbohydrates, proteins and ovarian nucleic acids.

Quantitative analysis of ecdysteroids in gonads found that enalapril inhibits the synthesis of testicular ecdysteroids compared to controls. While the production of ovarian ecdysteroids was not affected by the two molecules.

**Key words:** *E. kuehniella*, enalapril, lisinopril, reproduction.



**ملخص:**

الدراسات القليلة التي أجريت لتحديد دور الأنزيم المحول للانجيوتنسين في عملية التطور دفعنا للقيام بهذه الدراسة قصد تثبيط هذا الأنزيم بواسطة الكبتوبريل الذي هو عبارة عن دواء يستعمل عادة لعلاج ارتفاع الضغط الشرياني عند الثدييات , لوجود هذا الإنزيم في الحشرات تهدف التجارب لدراسة طريقة عمل مثبطات الإنزيم لمعرفة تأثيره مقارنة مع الشاهد.

استعمل إنلبريل و لسنبريل عن طريق المعاملة السطحية لعدارى إحدى الحشرات المضررة بالمواد المخزنة *Ephestia kuehniella* (lépidoptère, pyralidère) حديثة الانسلاخ بالجرعات 5 µغ و 10 µغ/ 2ل من الأستون على التسلسل. التجارب التي قمنا بها تحدد تأثير هذا الدواء على عدة مظاهر لعملية التكاثر :

الدراسة المورفومترية للغدد التناسلية عند الذكور والإناث المعاملة ب إنلبريل و لسنبريل ، تشير إلى تعطيل نمو الخصية والمبيض *E. kuehniella*. لأنها تقلل من وزن وحجم الغدد التناسلية، وعدد البويضات، وحجم البويضة القاعدية أثناء النضج الجنسي. هذه التشوهات المورفولوجية التي يسببها إنلبريل و لسنبريل أثرت على تكاثر الأنواع. بالإضافة إلى ذلك كل من جزيئات ليس لها أي تأثير على سمك Chorion .

الدراسة البيوكيميائية لغدد التناسلية من *E. kuehniella* كشفت تثبيط الأيضية الرئيسية للخصية (الكربوهيدرات والبروتينات)، وتراكم كبير من الأحماض النووية في الخصية، والكربوهيدرات، والبروتينات والأحماض النووية في المبيض.

التحليل الكمي ecdysteroids في الغدد التناسلية يثبت أن إنلبريل يثبط إنتاج ecdysteroids في الخصية مقارنة مع الشاهد في حين أن إنتاج المبيض ecdysteroids لم يتأثر.

**الكلمات الرئيسية :**

*Ephestia kuehniella* ; إنلبريل و لسنبريل. التكاثر

---

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams T.S & Filipi P.A., 1988.** Interaction between juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone, the corpus cardiacum-allatum complex, and the ovaries in regulating vitellogenin levels in the housefly, *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* Vol, 34: 11-19.
- Aller H. E & Ramsay J. R., 1988.** RH-5849- A nouvel insect growth regulator with a new mode of action. *BCPC- pest and Diseases* 5:511-518.
- Alrubeai H.F & Gorell T.A., 1982.** Electrophoretic analysis of testicular protein components in the developing *Tenebrio molitor*. *Insect. Biochem.*, **12** : 171-175.
- Altstein M., Aharonson N & Menn J.J., 1993.** Overview: New targets for insect management in crop protection .*Arch. Insect.Biochem.Physiol.***22**:5-12.
- Anderson P. and Hallberg G. 1990.***J. Intern. Morph.Emb.* **19**:13-23.
- 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.
- Auzoux-Bordenave S., Solvar M., Queguiner I., Bozzolan F., Mottier V., Siaussat D., Porcheron P & Debernard S., 2005.** Comparative effects of a non-steroidal ecdysone agonist RH-5992 and 20-hydroxyecdysone in a lepidopteran cell line (IAL-PID2). *Insect Biochem Mol Biol* 35 (9):1033- 1042.
- Barth R.H., Lester L.J., 1973.** Neurohormonal control of sexual behavior in Insects. *Ann. Rev. Entomol.* **18** : 445-472.
- Beenakers A.M.Th., Van der Hostm D.G & Van Marrewijk W.J.A., 1985.** Insect lipids and lipoprotzins and their role in physiological proccess. *Progress in lipid research*, **24**: 19-67.
- Bellé X., 2005.** Vitellogenesis directed by juvenil hormone. In: *Reproduction Biology on Invertebrates*, Vol.12, Part B: *Progress in vitellogenesis*, A.S.Raikhel (eds), Science Publishers, Enfiled, USA/Plymouth, UK, 157-197.
- Bellés X; 1975.** Interaction between corpora allata, fat body and avary in insect reproduction: *wich controls wich Netherlands. J. Zool.*, **45**: 152-156.
- Bendjeddou F; 1993.** La reproduction chez *Ephestia kuehniella* (Zeller) et effet duflucycloxuron. Aspects toxicologiques, biologique et biochimiques. Thèse de magistère,université d'Annaba, Algérie.

- Bendjeddou F., Bouslama Z., Chebira S., & Soltani N., 1998.** Effects of flucycloxuron. A benzoyl phenyl urea derivative, on growth, development and cuticle secretion in *ephestia kuehniella*. *Med. Fac. Landboww. Univ.Gent.***63/2b**: 575-580.
- Bergeron R & Regnault J.P., 1980.** Reproduction et développement. *Collection Biomoduls. Ediction études vivantes. Monreale, Paris.* **28** : 19-28.
- Berry S.J., 1985.** Reproductive system. In Bulm M.S. (Eds): *Fundamentals of insect physiology.* J. Wiley and Sons, New York., pp.437-466.
- Bouzeraa H. & Soltani-Mazouni N., 2012.** Effets du méthoxyfénozide et du tébufénozide sur le développement et quelques paramètres de la reproduction d'*Ephestia kuehniella* après traitement des mâles et des femelles. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 2012, 137(1-4):153-163.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*, **72**:278-284.
- Bull D.L. & Patterson R.S. 1993.** Characterization of pyrethroid resistance in a strain of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J.Econ. Entomol.*, **83**: 20-25.
- Carpenter JE, Chandler LD., 1994.** Effects of sublethal doses of two insect growth regulators on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) reproduction. *J. Entomol. Sci.* **29**: 428-435.
- Cassier P., Lafont R., Descamps M., Porchet M & Soyez D., 1997.** La reproduction des invertébrés: stratégie, modalité et régulation. Edition Masson, pp 354.
- Cochran D. G., 1991.** Extended selection for pyrethroid resistance in the German cockroach (Dictyoptera:Blattellidae). *J.Econ. Entomol.*, **84**: 1412-1416.
- Corvol P., Williams T.A., & Soubrier F., 1995.** Methods in Enzymology Peptidyl dipeptidase A: Angiotensine I-converting Enzyme (Barrett,A J.,ed) vol. **248**: 283-305, Academic Press, London.
- Dhadialla T. S., Carlson G. R. & Le D. P., 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.*, and juvenile hormone activity. *Ann. Revi. Entmol.*, **43**: 545-569.
- Dhadialla T.S, Retnakaran A, Smagghe G., 2005.** Insect growth and development-Disturbing insecticides,in: L. I. Gilbert, K.Latrou, S.S.Gill (eds.), *Comprech Mol.Insect S, Elsevier- Pergamon, Oxford, UK, 2005.6*: 55-115.
- Davis R.E., Williams D.R., Turner P.C., Rees H.H., 2006.** Characterization in relation to development of an ecdysteroid agonist- responsive cytochrome P 450, CYP18A1, in *Lepidoptera*. *Arch. Biochem.biophysics.* **453**: 2-10
- Darvas B., Polgar L., Tag El-Din M. H., Katalin E. & Wing K.D., 1992.**

Developmental disturbances in different insect orders caused by an ecdysteroid agonist, RH-5849. *J. Econ. Entomol.*, **85**: 2107-2112.

**De Reggi M.L., Pitoizet N., Gharib B. & Delbecque J.P. 1992.** New enzyme immunoassay for ecdysteroids using peroxydase enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies. *Xth Ecdysone Workshop, Liverpool* 6-7 th April, Abstract p 91.

**Devonshire A.L., 1989.** Insecticide resistance in *Myrus persicae*: from field to gene and back again. *Pestic. Sci.*, **26**:375.

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

**Duchateau. G . & Folking. M ; 1959.** Sur la thréalosémie des insectes et sa signification. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **67**: 306-322.

**Engelmann F., 1983.** Vitellogenesis controlled by juvenile khormone. *In: Downer R.G.H, Laufer H. (Eds.): Endocrinology of insects.* New York: Alan R. Liss, INC, 259-270.

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

**Feyereisen R & Durst F., 1978.** Ecdysterone biosynthesis: a microsomal cytochrome P-450 linked ecdysone 20-monooxygenase from tissues of the African migratory locust. *Eur J. Biochem.*, **88** (1): 37-47.

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

**Gäde G., Hoffman K.H & Spring J. H., 1997.** Hormonal regulation in insect: Facts, Gaps and future direction. *Physiol.Rev.*, **77** (4): 963-1032.

**Glitho L, Delbecque J.P & Delachambre J., 1976.** Prothoracic gland involution related to molting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* (L.). *Insect physiol.*, **25**:187-191.

**Goldsworkey. G. J, Mordue. W. & Guthkelsh J; 1972.** Studies on insect adipogenic. *Comp. Endocrinal* . **18**: 545.

**Goodman W.G., & Chang E.S., 1985.** Juvenile hormone cellular and hemolymph binding proteins. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Kerkut.G.A. and Gilbert, L.I. (eds), Pergamon Pres, Oxford, **7**:

---

491-510.

- Granger N.A., Rybczynski R & Gilbert L.I., 2000.** Contrôle of juvenil hormone synthetis by corpus allatum.Xxi international Congress of Enthomology, Brazil, August 20-26, 2000.
- Habes D., Morakchi S., Aribi N., Farine J. P. & Soltani N. 2005.** Boric acid toxicity to German cockroach, *Blattella germanica*: Alterationb in midgut structure, and acethylcholinesterase and glutathion s-transferase *Pestic.Biochem.Phusiol.*,**84**: 17-24.
- Hagedorne H.H., 1985.** The role of ecdysteroids in reproduction. In: Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, Oxford,. 205-262.
- Hami M Taibi F., Smaghe G & Soltani-Mazouni N., 2005.** Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides against the Mediterranean flour moth. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, 70/4:767-773
- Hami M ., 2013.** Activité comparée de quelques effecteurs Des ecdysteroides en traitement combine chez un modèle de laboratoire, *Ephestia kuehniella zeller* : Mecanisme d'action. Thèse Doctorat, Université d'Annaba, Algérie.
- 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.C. & White B.N., 1982.** Insect vitellins identification, purification and characterization from eight order. *J.Exp.Zool.*, **220**: 1-10.
- Issac R. E., Lamango N. S, Ekbote U., Taylor C. A., Shirras A. D., 2006.** Angiotensin Converting enzyme as a target for the development of novel insect growth. Regulators. *Peptide* **28 (1)**: 153-162.
- Isaac RE., Lamango NS., Ekbote U., Taylor CA., Hurst D., Weaver RJ., Carhan A., Burnham S., Shirras AD., 2007.** Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators. *Peptides* **28**:153-162.
- Issac R.E., Salzet M. And Huybrecht R., 1999.** Immunocytochemical distribution of angiotensin-I converting enzyme in the central nervous system of Insect and speculation about its possible function. *Eur.J. Entomol.* **96**: 323-326.
- Jacob T.A. and Cox P.D. 1976.** The influence of temperature and humidity on the life cycle of *E.kuehniella*.Z (Lepidoptera: Pyralidae).*J.Srored. Pro. Res.***13**:107-118.
- Johnston C. I., 1992.** Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control.*J.Hypertens*, **10**, S 23-S 26.
- Kallupur V.L., Majumber C & Roe R.M., 1996.,** In vivo and in vitro tissus specific metabolism of jevenil hormon during the last stadium of abbage looper,

- J.Insect.Physiol., **42**: 181-190.
- Karnovsky, M.J. 1965.** A formaldehyd-glutaraldehyde fixation of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **27**: 1374.
- Khebbeb Meh, Gaouaoui R. & Bendjeddou F., 2008.** Tebufenozide effects on the reproductive potentials of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Afr. J. Biotech.*, Vol. 7(8), 1166-1170.
- Kidokoro K, Iwata K., Fujiwara Y & Takeda M., 2006.** Effects of juvenile hormone analogues and 20-hydroxyecdysone on diapauses termination in eggs of *Locusta migratoria* and *Oxya yezoensis*. *J. Insect. physiol.*, **52**: 473-479.
- Kirane-Amrani & 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* Vol. 11(56): 11972-11977.
- Koeppe J.K., Fuchs M., Chen T.T., Hunt L.M., Kovalick G.E., Briers T., 1985.** The role of juvenile hormone in reproduction in : *Comprehensive Insect Biochem. And pharmacology*, Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (eds) *Pergamon Press*, Oxford., **8** : 165-203
- Kolman J., 1990.** Ecdysteroids, *Zool.Sci*, 563.
- Kozlova T.Y. & Thummel C.S., 2003.** Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*, **301**: 911-1914.
- Kunkel, G.G.& Nordin, J.H., 1985.** Yolk proteins. In :G.A. Kerkut & L.I. Gilbert (eds.) *Comprehensive . Insect . Biochem. Physiol. Pharmacol.*, **1**: 83-111.*Pergamon. Press, Oxford.*
- Lafon R., 1994:** Contrôles hormonaux des mues et des metamorphoses des Arthropodes: Faits établis et questions ouvertes. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **119**: (3) 1985 – 199.
- Lafont R., Dauphin-Villemant C., Warren J.T. & Rees H.H., 2005.** Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds.) *Comprehensive molecular insect science*. Vol 3, Elsevier, Pergamon, Amsterdam , pp 125-195.
- Lamango N .S. & Issac R. E., 1994.** Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly *Musca domestica*, that resembles mam-malian angiotensin-converting enzyme.*Biochem.J.* **299**: 651-657.
- Lambreas, C. I., Galante, F. & Mena, I. 1991.** Ovarian condition as an indicator of the phenology of *Bubas bubas* (Coleoptera: Scarabeidae). *Ann. Entomol. Sco. Am.*, **84** (2), 190-194.

- Lemeir E. Van., Camp J & Smaghe G., 2007.** Presence of angiotensin converting enzyme isoforms in larval *Spodoptera littoralis* Lepidoptera Peptides; **28**: 119-126.
- 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*.
- Loeb M. J., Brandt E. P & Birnbaum M. J., 1984.** Ecdysteroid production by testes of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* , from last larval instar to adult. *J. Insect Physiol.* **30** : 375-381
- Loeb MJ, De Loof A, Schoofs L & Isaac E. 1998.** Angiotensin II and angiotensin-converting enzyme as candidate compounds modulating the effects of testis ecdysiotropin in testes of the Gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Gen Comp Endocr* **112**:232-239.
- Marec F & Mirichi R., 1990.** Genetic control of the pest Lepidoptera: Gamma-rainduction of translocation between chromosome of *E.kuehniella*. *J. of Stored research* **26** (2): 109-116.
- 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.*, 2013, 138(1-4) : 177-187.
- Mitlin N., Wiygul G & Hayenes J.W., 1977.** Inhibition of DNA synthesis in Boll Weevils(*Anthonomus grandis Boheman*) strilized by Dimlin. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **7**: 559-563.
- Mrtin D., Wang S.F. & Raikel A.S., 2001.** The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor. *Moll.Cell. Endocrin.*, **173** : 75-86.
- Nauen R & Bretchneider T., 2002.** New modes of action of insecticides. *Pestic outlook.* 241- 245.
- Neubueser D., Warren J .T., Gilbert L.I. & Cohen S.M., 2005.** Molting detective in required for ecdysone biosynthetic. *Devp. Biol.*, **280**: 362-372.
- Pasteur N. & Reymond M. 1996.** Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutation, migration and selection in field population. *Journal of heredity* **87**: 444-449.
- Perveen F& Miyata T., 2000.** Effects of sublethal dose of chlorfluazuron on ovarian development and oögenesis in the common cutworm, *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **93**: 1131-1137.
- Perveen F., 2011.** Effects of sublethal doses of chlorfluazuron on the ovarian
-



- biochemical constituents of *Spodoptera litura*. (Lepidoptera: Noctuidae). *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(62), pp. 13598-13604.
- Porcheron P., Moriniere M., Grassi J & Paradelles P., 1989.** Developement of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetyl cholinesterase as label *J.Insect.Biochem.***19**: 117-122.
- Quan GX, Mita K, Okano K, Shimada T, Ugajin N, Xia Z, Goto N, Kanke E & Kawasaki H., 2001.** Isolation and expression of the ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* **31**:97-103.
- Raabe M., 1973.** Contrôle endocrine de l'ovogénèse chez les insectes. *Ann.Biol. Bioph.* **13**: 49-57.
- Raina A.K & Klun J.A., 1984.** Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. *Science*, **225** : 531-533.
- Ramaswamy S.B., Shengqiang S., Yong I.P. & Fanrong Z., 1997.** Dynamic of juvenil hormon mediated ganadotropism in the Lepidoterea . *Arch. Insect biochel. Physiol.* **35**: 539-558.
- Redjehimi-bouteldja., 2006.** Evaluation d'un Angiotenseur le Captopril sur les ovaires de *Tenebrio molitor*: Aspects cellulaire, biochimique et endocrinien. Thèse de magister, Ecole normale supérieur de Kouba, Alger.
- Rees H.H., 1995.** Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function.*Eur. J. Ent.*, **92**, 9-39.
- Rees .H.H., 1985.** Biosynthesis of ecdysone. *In: Comparative Insect Physiology, Biochemistry and pharmacologie.* Karcut G. A. and Gilbert L. I. (eds.) *Pergamon Press.* Oxford., **7**: 249-293.
- Regg R.P., Orchard I. & Davery K.G., 1992.** 20-hydroxuesdysone as a modulator of electrical activity in neurosecretory cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, **28**: 143-248.
- Riddiford L.M., 1985.** Hormone action at the cellular leve. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and pharmacology.* Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (Eds), *Pergamon, Oxford*, **8**, 37-84.
- Riddiford L.M., 1994.** Cellular and molecular action of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect. Physiol.*, **24** : 213-274.
- Riddiford L.M., Hiruma K., Zhou X & Nelson C.A., 2003.** Insight into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect. Biochem.Mol.Biol.*, **33**: 1327-1338.
- Romana I., Pazscual N. & Bellés X., 1995.** The ovary is the source of circulating ecdysteroids in *B/atella germanica* (*Dictyopetera: Blatellidae*). *Eur. J. Enl.*,

92:93-103.

- Sahlen D., 1994.** Ultrastructure of the eggs hell of *Aeshna juncea* (L). (Odonata : Aeshnidea). *Int. J. Insect Morphol. 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.
- Salem H, Smaghe G & Degheele D 1997.** Effects of tebufenozide on oocyte growth in *Plodia interpunctella*. *Med. Fac. Landbouww. Univ.Gent*, **62**: 9-13.
- Salzet M & Stefano G.B., 1997.** First biochemical evidence for an enzyme related to mammalian renin in an invertebrate the leech *Theromyzon tessulatum*, *Mol.Cell. Endocrinol.* **131**: 1-8.
- Salzet M., Bulet P., Watzet C., Verger- Bocquet M & Malecha, J., 1995 .** Structural characterisation of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. Angiotensin II amide. *J.Biol.Chem.* **270**: 1575-1582.
- Scharf M. E., Kaakeh W & Bennett G.W . 1997.** Changes in an insecticide-resistant field population of German cockroach (Dictyoptera-Blattella) after exposure to an insecticide mixture. *J. Econ. Entomol.*, **90**: 38-48.
- Schneider W.C., 1957.** Determination of nucleic acids in tissue by pentose analysis, *In* Methods in enzymology, S.P.Colowich et N.O. Kaplan (eds). *Acad. Press, New-york*: vol.3. pp. 680-684.
- Schoofs L., Veelaert D., De. Loof A., Huybrechts R. & Issac 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.
- Seth R. K., Rao D. K & Reynolds S. E., 2002.** Movement of spermatozoa in the reproductive tract of adult male *Spodoptera littura* : daily rhythm of sperm descent and the effect of light regime on male reproduction. *J. Insect Physiol.* **48** : 119-131.
- Siegfried B. D & Scott J.G., 1992.** Insecticide mechanisms in German cockroach. *Blattella germanica* (L) mechanisms of insecticide resistance. *American Chemical society. Washington, DC*.
- Silhacek D. L., Oberlander H & Porcheron P., 1990.** Action of RH 5849, a non steroidal mimic On *Plodia interpunctella* (Hübner) *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **15**: 201-212.

- Siviter RJ, Taylor CAM, Cottam DM, Denton A, Dani MP, Milner MJ, Shirras AD & Isaac RE. 2002.** Ance, a *Drosophila* angiotensin-converting enzyme homologue, is expressed in imaginal cells during metamorphosis and is regulated by the steroid, 20-hydroxyecdysone. *Biochem J* **367**:187-193.
- Shibko S, Kaivistoinen P., Tratnyck C. A., Newhell A. R & Freidman L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA. DNA. lipid and glycogena from a single rat liver homogenate a from a sub cellular fraction. *Analytic Biochem* **19**: 514-528.
- Smaghe G & Degheele D., 1992.** Effects of the non steroidal ecdysteroid agonist, RH-5849 on production of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) *Parasitica*, **48**: 23-29.
- Smaghe G & Degheele D., 1994.** The significance of pharmacokinetics and metabolism to the biological activity of RH-5992 (tebufenozide) in *Spodoptera exempta*, *Spodoptera exigua*, and *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest. Biochem. Physiol.* **49**: 224-234.
- Smith S. L., Bollembacher W. E., Cooper D. Y., Schleyer H., Wielgus J. J. & Gilbert L. I., 1979.** Ecdysone 20-monooxygenase: Characterization of an insect cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase.
- Smith S. L., 1985.** regulation of ecdysteroid titer. Synthesis, in: comprehensive insect physiology, *Biochemistry and pharmacology*, vol. 1.7. Kerkut G and Gilbert L.I. (eds.) Pergamon Press. Oxford., 7: 323-33
- Soltani N., Pitoizet N., Soltani-Mazouni N., Delachambre J & Delbecque J.P., 1997.** Activity of an anti-ecdysteroid compound (KK-42) on ovarian development and ecdysteroid secretion in mealworm. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **62** (2): 531-537.
- Soltani-Mazouni N., Taibi F., Berghiche H., Smaghe G. & Soltani N. 2001-** RH-0345 restored partly the effects induced by KK-42 on reproductive events in mealworms *Med. Fac Landbouww. Univ. Gent* 66/2a: 437-443.
- Soltani-Mazouni N & Bouteldja D., 2007.** *In vivo* activity of captopril, an inhibitor of angiotensin converting enzyme, in mealworms: ecdysteroid amounts and composition of ovaries. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University*, **72/3**: 623-627.
- Soltani-Mazouni N & Hami M., 2010.** Effets de deux agonistes des ecdystéroïdes sur la reproduction chez *Ephestia kuehniella* (Insectes, Lépidoptères) : dosage des acides nucléiques et des protéines ovariens. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat*, N° 47, Tome I, 153-156.
- Soltani-Mazouni N., Hami M & Gramdi H., 2012.** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia Kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction and Development*, Vol 56(2): 157-163.

- Staal G .B., 1982.** Insect control with growth regulators interfering with endocrine system. *Entomol. Exp.Appl.*, **31**,15-23
- Stay B. & Woodhead A. P., 1993.** Neuropeptide regulator of Insect *corpora allata*. *Zool.*, **33**: 357-364.
- Sun C.N., Huang S.Y., Hu N.T. & Chung W.Y., 2001.** Glutathione s-transferases and insect resistance to insecticides. *National Chang-Hsing University taichung, Taywan 40227, Republic of China*.pp: 269-254.
- Sun X, Barrett & BABiddinger DJ., 2000.** Fecundity and fertility reductions in adult leafrollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonist tebufenozide and methoxyfenoside. *Entomol. Exp. Appl.*, **94**: 75-83.
- Sun X. & Barrett B.A., 1999.** Fecundity and fertility changes in adult codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to surfaces treated with tebufenozide and methoxyfenozide. *J. Econ. Entomol.*, **92**, 1039-1044.
- Taibi F., Smaghe G., Amrani L. & Soltani-Mazouni N., 2003.** Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **135** : 257-267.
- Taibi, 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. Université d'Annaba. Algérie.
- Telfer W. H., 2009.** Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect Sci.*, **9**, 1-21.
- Traut W., et Traut G., 1991.** A new useful genetic marker, white body, in *E. kuehniella*. *Journ. Stor. Prod. Rec.* **27** (23): 161-162.
- Tu M.P., Yin C.M. & Tatar M., 2002.** Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants. *Aging cell.*,**1**: 158 -160.
- Turner A.j., & Hooper N.M., 2002.** The angiotensin converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends pharmacol.Sci.* **23**:177-183.
- Vandingenen A, Hens K, Macours N, Zhu W, Janssen I, Breuer M, De Loof 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**:161-167.
- Veelaert D., Schoofs L & De Loof A., 1998.** Pestidergic control of the corpus cardiacum-corpora allata complex of locusts. *Int.Rev.Cytol.* **82**:249-302.
- Vercruyssen L., Gelman D., Rees E & Hooghe B., 2004.** The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril reduces oviposition and ecdysteroid levels in Lepidoptera. *Arch. Insect. Biochem. Physiol* **57**: 123-132.

- Verger-Boquet M., Wattez C., Salzet M & Malecha J., 1992.** Immunocyto-chemical identification of peptidergic neurons in compartment 4 of the supraesophageal ganglion of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.) *Can. J.Zool.***70**: 856-865.
- Wang S.F., Zhu J., Martin D. & Raikhel A.S., 2004.** Regulation of vitellogenin gene expression by ecdysteroids. *In: Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 12, Part B: Progress in.*
- Weiranther E., 1989.** Require mints for screening pigment. Migration in the eye of *E.kuehniella*. *Jour.Inc.Phys.*, **35**:925-934.
- Wiens A.W. & Gilbert T., 1968.** Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in *Leucophaea maderae*. *J. Insect. Physiol.*, **13**: 779-794.
- Wigffels G., Fitzgerald C., Gough J., Riding G., Elvin C., Kemp D and Willadsen P., 1996.** Cloning and characterization of angiotensin –converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, its and its expresssion in the maturing male reproductive system *Eur.J Biochem.* **237**: 414-423.
- Wigglesworth V.B., 1965.**The principale of Insect physiology, Methvem and Colt, Londre.
- William J., C. K., 1971.** Follicle cell protein synthesis in moth, *Ephestia kuehniella* oocytes. *Insect Physiol.*, Vol., 17: pp. 217-232
- Wing KD & Ramsay JR., 1989.** Other hormone agents: Ecdysone agonists. *In Prog. Prospect. Insect. Control. BCPC Monogr.* **43**: 107-117.
- Yamashita O & Suzuki K., 1991.** Roles of morphogenic hormones in embryonic diapause, pp. 81-128. In P.A. Gupa (eds) : morphogenic hormones of Arthropodd. Roles in histogenesis, organogenesis and morphogenesis. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, HJ.
- Zimowski G., Silhacek D.L. Schaaya E. & Shirk P.D., 1991.** Immunofluorescebt analysis of follicular growth and development in whole ovaries of the Indian meal moth. *J. mrphol.*, **209**: 215-228.
-



---

---

# *ANNEXE*

---

---

---

---

## **Production scientifique (publication et communications):**

### **Publication**

**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, pp.186-194.

### **Communications internationales (4)**

**Bensalem F** & Soltani-Mazouni N., Evaluation de deux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur la composition biochimique des ovaires d'un ravageur *Ephestia kuehniella*, *1er Congrès International sur l'Aide à l'Agriculture Algérienne Annaba, 22–24 Novembre 2011*.

**Bensalem F** & Soltani-Mazouni N. Evaluation de deux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur la composition biochimique et la morphométrie des testicules d'un ravageur *Ephestia kuehniella*. *Les 3eme journées scientifiques de l'ATT Toxicologie-Environnement-Santé* 03 au 05 Février 2012 Tabarka, Tunisie

**Bensalem F** & Soltani-Mazouni N. Impact de deux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur le taux des ecdystéroïdes ovariennes et la morphométrie des ovaires d'un ravageur *Ephestia kuehniella*. *Congrès International sur: 50 ans de Formation et de Recherche ENSA*, Alger 22-24 Avril 2013.

**Bensalem F** & **Soltani-Mazouni N.** Impact de deux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur les taux d'acides nucléiques et de protéines ovariens chez un ravageur *Ephestia kuehniella*. La deuxième édition du Congrès International De la bio-Surveillance de l'Environnement Les 24, 25 et 26 Octobre 2013 A Casablanca-Maroc

---

---



## **Effect of Two Inhibitors of the Angiotensin Converting Enzyme in the Mediterranean Flour Moth: Biochemical Composition and Ecdysteroid Amount of Gonads**

**Fatiha Bensalem**

*PhD Student, Laboratory of Applied Animal Biology  
Reproduction & Development Group, Faculty of Sciences, Department of Biology  
Badji Mokhtar University of Annaba, 23000-Annaba, Algeria  
E-mail: bensalem.fatiha@hotmail.com*

**Nadia Soltani-Mazouni**

*Corresponding Author: Pr., Dr., Laboratory of Applied Animal Biology  
Reproduction & Development Group, Faculty of Sciences, Department of Biology  
Badji Mokhtar University of Annaba 23000-Annaba, Algeria  
E-mail: mazouni\_nadia@yahoo.fr, nadia\_mazouni@univ-annaba.org  
Web site: <http://www.lbaa-univ-annaba.org>*

### **Abstract**

In mammals, the angiotensin converting enzyme (ACE) is a metallopeptidase associated with the regulation of blood pressure. It was found in several species of insects belonging to different orders and shown that this enzyme stimulates the synthesis of molting hormone (ecdysteroids) and inhibits the action of testicular ecdysiotropine. The Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), is a cosmopolitan pest of stored products. In the present study we evaluate the effects of two ACE inhibitors, enalapril and lisinopril, on biochemical composition (carbohydrates, proteins, lipids, ARN, ADN) and ecdysteroid amounts in *E. kuehniella* gonads from newly emerged adults after topical treatment of pupae. Enalapril and lisinopril were applied topically (5 and 10 µg/insect respectively) on newly moulted male and females pupae of *E. kuehniella*. The results show that enalapril and lisinopril decreased ( $p < 0.05$ ) the testicular amounts of carbohydrates and proteins, and increased the ovarian amounts of carbohydrates, proteins. No significant difference was recorded on the testicular and ovarian lipid contents as compared to controls. Lastly, treatment was found to increase the amounts of ARN, ADN in both ovaries and testes. In the second series of experiment, enzyme immunoassay measurements of ecdysteroids were made in gonads from newly emerged adults after pupal treatment. Only enalapril was found to affect significantly ( $p < 0.05$ ) the ecdysteroid amounts in testicles.

**Keywords:** *Ephestia kuehniella*, Gonads, Enalapril, Lisinopril, Carbohydrates, Lipids, Proteins, ARN, ADN, Ecdysteroids.

### **1. Introduction**

Angiotensin-converting enzyme (ACE) is a zinc metallopeptidase functioning primarily as a dipeptidylcarboxypeptide (Marcous et al., 2004). In mammals, ACE is involved in the homeostatic

regulation of blood pressure and electrolyte balance and is strongly linked with a number of cardiovascular and renal diseases (Shen et al., 2008). Moreover, it is well known that this enzyme is involved in the renin-angiotensin system through the conversion of angiotensin I to angiotensin II, a potent vasoconstrictor, and in the metabolic inactivation of bradykinin a vasodilatory peptide (Corvol et al., 2004). To date, synthetic ACE inhibitors like enalapril, lisinopril and captopril are widely used as antihypertensive drugs (Cushman et al., 1977, 1979). More recently, insect cell extracts were found to exhibit *in vivo* antihypertensive activity without an extra digestion requirement (Staljanssens et al. 2011). Since the discovery of an ACE in *Musca domestica*, ACE-like activity has been detected in several insect species from different orders (Wijffels et al., 1996; Williams et al., 1996; Fernandez et al., 2001; Lemeire et al., 2007). Therefore, inhibiting ACE activity is expected to interfere with the peptidergic endocrine system and to have detrimental effects on growth, development and reproduction (Issac et al., 2007).

The Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), is a serious worldwide pest of flour mills (Caspari and Gottlieb 1975). Recently, *E. kuehniella* has been used as a model target lepidopteran to investigate normal development (El Ouar et al., 2010, Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011). As a consequence, these data provide a strong basis to investigate the potential effect of these compounds on development and reproduction of pest insects, particularly Lepidoptera. In *Tenebrio molitor*, we have shown that this compound affected the morphometric measurements of ovary and no significant effect was observed on both thickness and fine structure of chorion (Soltani-Mazouni et al., 2007). More recently, Kirane-Amrani and Soltani-Mazouni (2012) tested enalapril, lisinopril and captopril in *E. kuehniella* pupae and showed that only lisinopril reduced significantly the ecdysteroid contents in whole body extracts at day 3. In order to complete these findings, the present study was designed to evaluate the impact of enalapril and lisinopril applied topically on newly ecdysed pupae of *E. kuehniella* on carbohydrates, lipids, nucleic acids and ecdysteroid amounts of ovaries and testicles from newly emerged adults.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Experimental Animals**

*Ephestia kuehniella* was reared on wheat flour at 27°C and 80% relative humidity in almost continuous darkness Soltani-Mazouni et al. (2012). Newly moulted pupae were collected from a stock colony and sexed using characters described previously Butt & Cantu (1962).

### **2.2. Chemicals and Treatments**

The ACE inhibitors were enalapril and lisinopril (courtesy of Pr. G. Smagghe, Ghent University, Belgium). Enalapril was purchased from Sigma (Bornem, Belgium) and lisinopril was provided by Merck & Co. Inc. (Whitehouse Station, NJ). The compounds (enalapril 5 and lisinopril 10 µg/pupa) were applied topically to newly moulted male and female pupae (< 8 h) on the abdominal sternites with the use of a Gilson automatic micropipette. In the controls, pupae were dosed with 2 µl of acetone. From the start of the experiment, the pupae were examined daily for aberrations and survival until adult emergence.

### **2.3. Biochemical Composition of Gonads**

As described above, newly moulted pupae were topically treated. Subsequently, newly emerged adults were collected and testicles and ovaries removed. Each gonad was homogenized in trichloroacetic acid (20%, w/v) and carbohydrates, lipids and proteins were extracted from testicles and ovaries according to Shibko et al. (1966) and the amounts of the principal components (carbohydrates, proteins, lipids) determined as described previously (Soltani-Mazouni et al., 2012). The quantification of the amounts

was performed based on the anthrone procedure of Duchateau and Florkin (1959), of total proteins based on Bradford (1976), and of lipids based on the vanillin method of Goldsworthy et al. (1972). DNA and RNA were extracted (Soltani-Mazouni and Soltani, 1994). Then DNA was determined following Schneider (1957) and RNA according to Burton (1956).

#### 2.4. Enzyme Immunoassay of Ecdysteroids

Newly emerged adults were collected from control and treated series. Testicles and ovaries were dissected and individually extracted with 500  $\mu$ l of methanol by sonication, and after centrifugation (5000 g, 10 min), the supernatants were taken and evaporated. Then the extracts were suitably resuspended in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4) and each individual sample was analyzed in duplicate by an enzyme immunoassay (EIA) as previously described (Soltani-Mazouni et al., 2012) using pyroxydase as an enzymatic tracer and tetramethyl benzidine as a color reagent. The ecdysteroid antiserum (polyclonal antibody) used was 7 times more sensitive to ecdysone (E) than to 20-hydroxyecdysone (De Reggi *et al.*, 1992). Data are expressed as pg ecdysone equivalents per mg of tissue (pg equivalent E/mg).

#### 2.5. Statistics Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). The data were subjected to one way analysis of variance (ANOVA) and treated series were separated by Tukey's test. Comparison of mean values was made by Student's *t*-test. All statistical analyses were performed using MINITAB Software (Version 16, PA State College, USA) and  $p < 0.05$  was considered to be a statistically significant difference). The number of insects tested per series and the repeats were given with the results.

### 3. Results

#### 3.1. Effect on Carbohydrate, Lipid and Protein Amounts of Gonads

The compounds were tested *in vivo* by topical application on newly molted male and female pupae. Quantitative evaluation of the main biochemical components was determined in each gonad from newly emerged adults (Tables 1 & 2). Results showed that enalapril and lisinopril reduced significantly the testicular contents of carbohydrates ( $p < 0.05$ ), proteins ( $p < 0.01$ ) (Table 1). However, they are no significant ( $p = 0.2$ ) effect on lipids amounts. One way ANOVA shows significant ( $p = 0.01$ ) effects of treatment on carbohydrates amounts ( $F = 11.16$ ,  $df = 2, 9$ ) and a significant ( $p = 0.000$ ) effects treatment on proteins amounts ( $F = 262.67$ ,  $df = 2, 9$ ).

**Table 1:** Effect of enalapril (5  $\mu$ g/insect) and lisinopril (10  $\mu$ g/insect) applied topically on newly molted male pupae of *Ephestia kuehniella* on testicular amounts of carbohydrates, lipids and proteins (means  $\pm$  SD,  $n = 4$ ; for each component, values followed by the same letter are not significantly different at  $p > 0.05$ )

Treatment	Testicular amounts ( $\mu$ g/mg tissue)		
	Carbohydrates	Lipids	Proteins
Control	48.23 $\pm$ 4.36 a	18.54 $\pm$ 0.33 a	55.40 $\pm$ 2.42 a
Enalapril	31.19 $\pm$ 6.65 b	17.25 $\pm$ 1.16 a	26.23 $\pm$ 0.95 b
Lisinopril	32.17 $\pm$ 3.25 b	14.28 $\pm$ 1.88 a	38.19 $\pm$ 1.88 c

Topical application of enalapril and lisinopril on newly molted female pupae caused a significant increase on the ovarian amounts of carbohydrates ( $p < 0.05$ ), proteins ( $p < 0.01$ ) (Table 2). However, there was no significant effect ( $p > 0.05$ ) of treatments on lipid amounts. One way ANOVA revealed a significant ( $p = 0.003$ ) effects of treatment on carbohydrates amounts ( $F = 17.55$ ,  $df = 2, 9$ ) and a significant ( $p = 0.002$ ) effects of treatment on proteins amounts ( $F = 19.87$ ,  $df = 2, 9$ ).

**Table 2:** Effect of enalapril and lisinopril on amounts of carbohydrates, lipids and proteins in ovaries from newly emerged adults of *Ephesia kuehniella* after treatment of female pupae (means  $\pm$  SD, n = 4; for each component, values followed by the same letter are not significantly different at  $p > 0.05$ ).

Treatment	Ovarian amounts ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )		
	Carbohydrates	Lipids	Proteins
Control	11.68 $\pm$ 1.81a	12.37 $\pm$ 1.90 a	7.91 $\pm$ 1.11 a
Enalapril	23.16 $\pm$ 2.97 b	12.61 $\pm$ 0.55 a	15.25 $\pm$ 2.44 b
Lisinopril	16.93 $\pm$ 1.19 b	12.96 $\pm$ 0.44 a	14.89 $\pm$ 0.76 b

### 3.2. Effect on Nucleic Acid Amounts of Gonads

Concerning the nucleic acid amounts, the two compounds caused a significant ( $p = 0.001$ ) increase in both amounts of RNA in testicles ( $F = 85.89$ ,  $df = 2, 9$ ) (Table 3), amounts of RNA ( $p = 0.000$ ,  $F = 47.42$ ,  $df = 2, 9$ ) and DNA ( $p < 0.05$ ) in ovaries (Table 4). Only lisinopril was found to increase significantly ( $F = 31.32$ ;  $df = 2, 9$ ;  $p = 0.001$ ) the testicular DNA amount (Table 3).

**Table 3:** Effect of enalapril and lisinopril on nucleic acid amounts in testicles from newly emerged adults of *Ephesia kuehniella* after treatment of male pupae (means  $\pm$  SD, n = 4; for each nucleic acid, values followed by the same letter are not significantly different at  $p > 0.05$ )

Treatment	Testicular amounts ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)	
	RNA	DNA
Control	342.30 $\pm$ 14.50 a	650.40 $\pm$ 45.20 a
Enalapril	427.90 $\pm$ 24.00 b	682.30 $\pm$ 22.20 a
Lisinopril	556.60 $\pm$ 20.90 c	857.00 $\pm$ 32.10 b

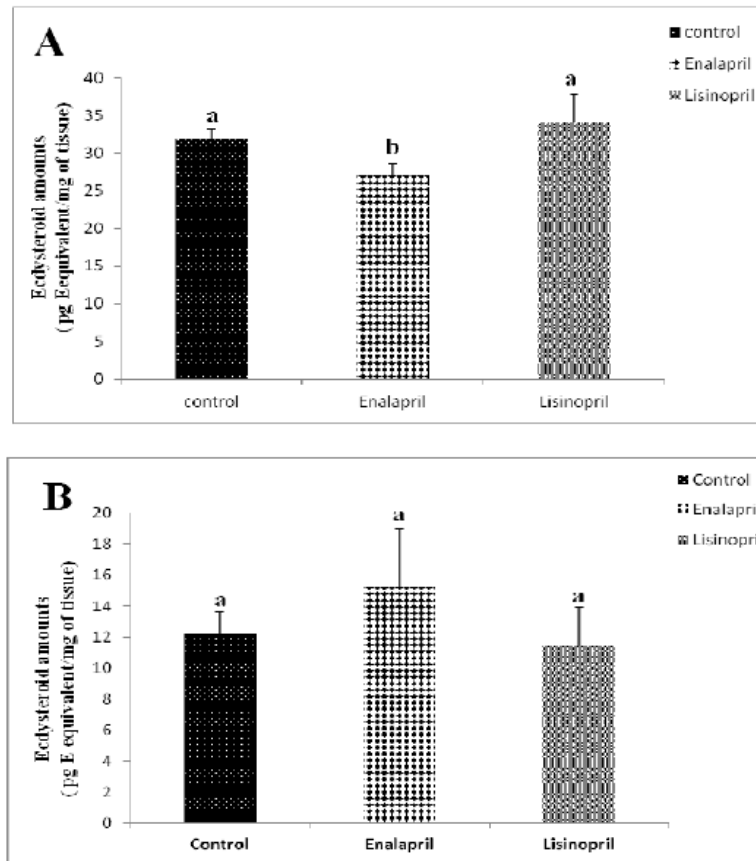
**Table 4:** Effect of enalapril and lisinopril on nucleic acid amounts in ovaries from newly emerged adults of *Ephesia kuehniella* after treatment of female pupae (means  $\pm$  SD, n = 4; for each nucleic acid, values followed by the same letter are not significantly different at  $p > 0.05$ )

Treatment	Ovarian amounts ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)	
	RNA	DNA
Control	107.51 $\pm$ 1.18 a	168.78 $\pm$ 1.18 a
Enalapril	152.48 $\pm$ 5.26 b	282.50 $\pm$ 39.60 b
Lisinopril	127.99 $\pm$ 8.17 c	244.80 $\pm$ 27.50 b

### 3.3. Effect on Ecdysteroid Amounts of Gonads

Enzyme immunoassay measurements of ecdysteroids were made on gonads dissected from newly emerged adults after treatment of pupae. Results showed that only enalapril reduced ( $p = 0.001$ ) significantly the testicular hormonal amounts. There was no effect on the rate of ovarian amount of ecdysteroids after treatment by enalapril and lisinopril (Fig. 1).

**Figure 1:** Effect of enalapril and lisinopril on ecdysteroid amounts (pg E equivalent/mg of tissue) in testicles (A) and ovaries (B) from newly emerged adults of *Ephesia kuehniella* after treatment of pupae (means  $\pm$  SD, n = 4; values followed by the same letter are not significantly different at  $p > 0.05$ ).



#### 4. Discussion

Mammalian angiotensin converting enzyme plays an important role in blood pressure regulation. It activates angiotensin I by converting it into the vasoconstrictive peptide angiotensin II and deactivates the vasodilator, bradykinin I, resulting in an increase in blood pressure (Erdos and Skidgel, 1987). On the other hand some of the beneficial effects of ACE like enalapril and lisinopril occur independently of the ability of this drug to reduce arterial blood pressure. The beneficial effects of ACE inhibitors were thought to be primarily due to the inhibition of angiotensin II formation. The prevalence of insect ACE in hemolymph (Macours et al., 2003; Ekbote et al., 2003, Lemeire et al., 2008), together with its broad *in vitro* substrate specificity suggests a role in the processing of neuropeptides and peptide hormones (Isaac et al., 2000). Recently, in *Drosophila melanogaster* crystal structures, an ACE homologue, complex with a natural product-phosphonotriptide K-26 (Akif et al., 2010) or with novel inhibitors and hypertensive drugs (Akif et al., 2011) were presented, and loss of ACE-related peptidase was reported to disrupt night-time sleep in adults (Carhan et al., 2011). Loeb et al. (1998) show that bovine ACE and bovine angiotensin II elicit synthesis of ecdysteroid by testes and inhibit the action of testis ecdysiotropin in *Lymantria dispar*. Kirane-Amrani and Soltani-Mazouni (2012) reported that enalapril, lisinopril and captopril applied topically on newly ecdysed *E. kuehniella* pupae reduced significantly the ecdysteroid contents in whole body extracts at day 3.

In this study we evaluate the effect of ACE inhibitors applied topically on reproduction of *E. kuehniella* an important pest in stored products worldwide. In addition, we report the effect of ACE

inhibitors on biochemical composition and ecdysteroid amount of gonads. In *Lepidoptera* especially in *E. kuehniella* the process of vitellogenesis (Telfer et al., 2009) and spermatogenesis (Perveen, 2011) take place during the pupal stage. The intermediary metabolism is directly involved in several physiological processes (growth, immunity, molt, reproduction and sexual maturation) which require a quantitative and qualitative contribution of various metabolites namely proteins, carbohydrates and lipids.

Proteins play an important role in the formation of gametes (Borsa and Millet, 1992). Carbohydrates are used in the development of genital products. Lipids are also an important energy source in insects; they have also a very important role in vitellogenesis and prostaglandin synthesis (Stanley-Samuelson et al., 1996). Biochemical analyses made at the end of the vitellogenesis process (i.e. at adult emergence), showed that enalapril and lisinopril applied prealably on newly molted pupae exerted an inhibitory effect on both carbohydrates, proteins amounts of testicles and a significantly increase on testicular contents of DNA and RNA, also they induced a significantly increase on ovarian contents of carbohydrates, proteins, DNA and RNA. It has been reported that captopril applied topically on newly emerged adult females of *T. molitor* reduced significantly both carbohydrate, lipid, protein and RNA amounts of ovaries (Soltani-Mazouni et al., 2007). The biochemical modifications obtained in our current study with *E. kuehniella* suggest an interference with the reproductive events probably *via* the vitellogenesis process and/or its endocrine regulation. This is supported by the reduction of vitellogenin titers in *Neobellieria bullata* (Diptera: Sacrophagidae) (Vandingenen et al., 2001) and altered oviposition in *Spodoptera littoralis* (*Lepidoptera*: Noctuidae) (Vercruysse et al., 2004). The activity of sperm is provided by these biochemical constituents as source of energy and the seminal fluid is rich in amino acids, glycogen and phospholipids (Charniaux and Payen, 1988). The decrease in testis protein contents in chlorfluazuron-treated males of *S. littoralis* may have several causes, such as lack of protein in the haemolymph of the males, and/or interference with the mechanism controlling spermatogenesis (Perveen, 2011). This agrees with our results.

Ecdysteroids are synthesized by the follicle cells in the ovaries and are available to develop embryos and pre-hatching larvae (Lafont et al., 2005). In this study, enalapril was found to decrease the amounts of ecdysteroids in testes of adult males from treated pupae of *E. kuehniella*; however, there was no effect on the rate of ovarian amount of ecdysteroids after treatment by enalapril and lisinopril. Kirane-Amrani and Soltani-Mazouni (2012) showed that lisinopril induced a significant decrease at 3 days on the whole body content of ecdysteroids. Vercruysse et al. (2004) also reported that the captopril treatment exerted an inhibitory effect on ecdysteroid levels in female but not in male adults of *S. littoralis*. ACE is not only thought to have a role during metamorphosis. Several studies suggest a physiological role for the enzyme in insect reproduction. When males of *Anopheles stephensi* mosquitoes were treated with ACE-inhibitors and allowed to mate with blood fed females, a drastic reduction in fecundity was observed (Isaac et al., 1999) probably *via* an interference on spermatogenesis or oogenesis processes. Similarly, when *A. stephensi* females were fed with a blood meal containing either captopril or lisinopril, a reduction in fecundity in a dose-dependent manner was observed (Ekbote et al., 2003).

## 5. Conclusion

The overall results demonstrate that both of enalapril and lisinopril applied on newly moulted male and female pupae of *E. kuehniella* affect the amounts of ovarian and testicular biochemical constituents, except the lipid levels. Moreover, only testicular ecdysteroid amounts were affected by enalapril. This finding suggests an interference with the reproductive events probably *via* the spermatogenesis.

## Acknowledgements

This study was financed by the Algerian Fund for Scientific Research and by the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria (CNEPRU and PNR projects Pr. N. Soltani-Mazouni).

## References

- [1] Akif, M., G., Masuyer, S.L., Schwager, B.J., Bhuyan, G., Muges, R.E., Isaac, E.D., Sturrock, and K.R., Acharya, 2011. "Structural characterization of angiotensin I-converting enzyme in complex with a selenium analogue of captopril". *FEBS J.* 278, pp.3644-3645.
- [2] Akif, M., I., Ntai, E.D., Sturrock, R.E., Isaac, B.O., Bachmann, and K.R., Acharya, 2010. "Crystal structure of a phosphonotripeptide K-26 in complex with angiotensin converting enzyme homologue (AnCE) from *Drosophila melanogaster*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, pp.532-536.
- [3] Borsa, P. and B., Millet, 1992. "Recruitment of the clam *Ruditapes decussatus* in the lagoon of Thau, Mediterranean". *Estuarine. Coastal and Shelf Science.* 35, pp. 289-300.
- [4] 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, pp. 248-254.
- [5] Burton K., 1956. "A study of the condition and mechanism of diphenylamine reaction of the coloremtric estimation of the desoxyribose nucleic acid". *Biochem.J.* 62, pp. 315-322.
- [6] Butt, B.A. and Cantu E.,1962. "Sex determination of lepidopterous pupae". *United States Department of Agriculture.* pp. 1-7.
- [7] Carhan, A., K., Tang, C.A., Shirras, A.D., Shirras, and R.E., Isaac, 2011. "Loss of Angiotensin-converting enzyme-related (ACER) peptidase disrupts night-time sleep in adult *Drosophila melanogaster*". *J.Exp. Biol.* 214, pp. 680-686.
- [8] Caspari, E.W., Gottlieb, F.J., 1975. "The Mediterranean meal moth *Ephestia kuehniella*. In: King RC, editor. Vol. 2. Handbook of genetics". *New York: Plenum.* p. 125-147.
- [9] Charniaux-Cotton, H. and Payen, G., 1988. "Crustacean reproduction. In Endocrinology of Selected Invertebrate" Types 2 editors. Laufer, H. and Downer, R. G. H. *New York: Alan Liss.* pp. 279-303.
- [10] Corvol, P., Eyries, M., Soubrier, F., 2004. "Peptidyl-dipeptidase A/Angiotensin I-converting enzyme". In: Barrett AJ, Rawlings, N.D., Woessner, J.F., editors. Handbook of proteolytic enzymes, vol. 1. *Amsterdam: Elsevier Academic Press.* pp. 332-346.
- [11] Cushman, D.W., H.S., Cheung, E.F., Sabo, and M.A., Ondetti, 1977. "Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids". *Biochemistry.* 16, pp. 5484-5491.
- [12] Cushman, D.W., H.S., Cheung, E.F., Sabo, B., Rubin, and M.A., Ondetti, 1979. "Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme (kinase II)". *Fed. Proc.* 38, pp. 2778-2782.
- [13] De.Reggi, M.L., N., Pitoizet, B., Gharib, B., Gharib, and J.P., Delbecque, 1992. "New enzyme immunoassay for ecdysteroids using peroxydase enzyme and polyclonal antibodies". Xth Ecdysone Workshop, *Liverpool 6-7<sup>th</sup> April. Abstract.* p. 91.
- [14] Duchateau, G. and M., Florkin, 1959. "Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification". *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 67, pp. 306-314.
- [15] Ekbote, U., M., Looker, and R.E., Isaac, 2003a. "ACE inhibitors reduce fecundity in the mosquito, *Anopheles stephensi*". *Comp. Biochem. Physiol.* 134, pp.593-598.
- [16] Ekbote, U.V., R.J., Weaver, and R.E., Isaac, 2003. "Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: changes in levels of activity during development and after copulation suggest roles during metamorphosis and reproduction". *Insect Biochem Mol Biol.* 33, pp. 989-998.
- [17] El Ouar, I., N., Aribi, and N., Soltani-Mazouni N., 2010. "Dosage des ecdystéroïdes chez *Ephestia kuehniella*". *Travaux de l'Institut Scientifique. Série Zoologie.* 4, pp. 137-140.
- [18] Erdos, E.G. and R.A., Skidgel, 1987. The angiotensin-I-converting enzyme. *Lab Invest.* 56, pp. 345-348.

- [19] Fernandez, M., X., Liu, M.A., Wouters, S., Heyberger, and A., Husain, 2001. "Angiotensin I-converting enzyme transition state stabilization by His 1089". *J. Biol. Chem.* 276, pp. 4998-5004.
- [20] Goldsworthy, G.J., W. Mordue, J., Guthkelch, 1972. "Studies on insect adipokinetic hormones". *Gen. Comp. Endocrinol.* 18, pp. 545.
- [21] Isaac, R.E., U., Ekbote, D., Coates, and A.D., Shirras 1999. "Insect angiotensin-converting enzyme- A processing enzyme with broad substrate specificity and a role in reproduction". *Ann. NY Acad. Sci.* 897, pp. 342-347.
- [22] Isaac R.E, N.S., Lamango, U., Ekbote, C.A., Taylor, D., Hurst, R.J., Weaver, A., Carhan, S., Burnham, and A.D., Shirras, 2007. "Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators". *Peptides.* 28, pp. 153-162.
- [23] Isaac R.E., R.J., Siviter, P., Stancombe, D., Coates, and A.D., Shirras, 2000. "Conserved roles for peptidases in the processing of invertebrate neuropeptides". *Biochem Soc Trans.* 28, pp. 460-464.
- [24] Kirane-Amrani, L. and N., Soltani-Mazouni, 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.
- [25] Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J.T. and Rees H., 2005. "Ecdysteroid chemistry and biochemistry". In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SK, editors. Vol. 3. Comprehensive molecular insect science. *Oxford: Elsevier.* p 125-195.
- [26] Lemeire, E., J. Van.Camp, and G., Smagghe, 2007. "Presence of angiotensin converting enzyme isoforms in larval Lepidoptera (*Spodoptera littoralis*)". *Peptides.* 28, pp. 119-126.
- [27] Lemeire, E., B., Vanholme, T., Van.Leeuwen, J., Van.Camp, and G., Smagghe, 2008. "Angiotensin- converting enzyme in *Spodoptera littoralis*: molecular characterization, expression and activity profile during development". *Insect Biochem Mol Biol.* 38, pp. 166-175.
- [28] Loeb, M.J, A., De.Loof, L., Schoofs, and R.E., Isaac, 1998. "Angiotensin II and angiotensin-converting enzyme as candidate compounds modulating the effects of testis ecdysiotropin in testes of the gypsy moth, *Lymantria dispar*". *Gen. Comp. Endocr.* 112, pp. 232-239.
- [29] Macours, N., J. Poels, K., Hens, C., Francis, and R. Huybrechts, 2004. "Structure, evolutionary conservation and functions of angiotensin- and endothelin-converting enzymes", *Int. Rev. Cytol.* 239, pp.47-97.
- [30] 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
- [31] Schneider, W.C., 1957. "Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis". In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (eds): *Methods in enzymology*, Vol. 3, *Academic Press, London.* p. 680-684.
- [32] Shen, X.Z., H.D., Xiao, P. Li, C.X., Lin, S., Billet, D., Okwan-Duodu, J.W., E.A., Adams, Xu.Y., Bernstein, and S., Fuchs, 2008b. "New insights into the role of angiotensin-converting enzyme obtained from the analysis of genetically modified mice". *J. Mol. Med.* 86, pp. 679-684.
- [33] Shibko, S, P., Koivistoinen, C., Trapinec, A., Newhall, and L., Friedman, 1966. "A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from sub cellular fraction". *Anal. Biochem.* 19, pp. 415-528.
- [34] Soltani-Mazouni, N, D., Bouteldja, E., Lemeire, and G., Smagghe, 2007. "In vivo effect of ACE inhibiting in mealworms on ovarian composition and ecdysteroid amounts". *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 72, pp. 623-627.



- [35] Soltani-Mazouni, N, M., Hami, and H., Gramdi, 2012. "Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller". *Invert. Reprod. Dev.* 56, pp. 157-163.
- [36] Soltani-Mazouni, N. and N., Soltani, 1994. Diflubenzuron affected DNA synthesis in the ovaries of *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Reprod. Dev.* 25, pp. 19-21.
- [37] Staljanssens, D., J.V., Camp, G. Herregods, M., Dhaenens, D. Deforce, J., Van.de.Voorted, and G., Smagghe, 2011. "Antihypertensive effect of insect cells: *In vitro* and *in vivo* evaluation". *Peptides.* 32, pp. 526-530.
- [38] Stanley-Samuels, D.W., and W., Loher, 1986. "Prostaglandins in insect reproduction." *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, pp. 841-853.
- [39] Telfer, W. H., Rubenstein, E. and Pan, M. L., 1981. How the ovary makes yolk in *Hylophora*. In: "Regulation of insect development and behaviour" (edited by M. K. Wroclaw) *Technical University Press, London, UK.* p. 637-654.
- [40] Vandingenen, A., K., Hens, N., Macours, W., Zhu, I., Janssen, M., Breuer, A., Deloof, and R., Huybrechts, 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.
- [41] Vercruyse, L., D., Gelman, E., Raes, B., Hooghe, V., Vermeirssen, J., Van.Camp, G., Smagghe, 2004. "The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril reduces oviposition and ecdysteroid levels in Lepidoptera". *Insect. Biochem. Physiol.* 57, pp. 123-132.
- [42] 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.
- [43] Williams, T.A., A., Michaud, X., Houard, M.T., Chauvet, F., Soubrier, and P., Corvol, 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". *J. Biochem.* 318, pp. 125-131.
- [44] Yezli-Touiker, S., N., Soltani-Mazouni, 2011 "Profile des ecdystéroïdes Durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidea)". *Synthèse* 22, pp. 48-55.