



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
جامعة باجي مختار - عنابة
Université BADJI Mokhtar - Annaba



Faculté Des Sciences
Departement de Biologie

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE DOCTORAT EN SCIENCES

Specialité : Science et Biologie Animale

**Etude des effets secondaires d'un insecticide sélectif, le Dimilin sur
la physiologie de la Crevette, *Penaeus kerathurus* (Crustacé,
Décapode). Etude ultra structurale et composition biochimique de
la cuticule**

Presentée et soutenue par :

M^{me} Madi - Morsli Mounira Seloua

JURY

Président :	Pr. N. SOLTANI	Université d'Annaba
Directeur de thèse :	Pr. M.E.H. Khebbeb	Université d'Annaba
Examineur :	Pr. H. NASRI	Université d'EL Tarf
Examineur :	Pr. L. CHAOUI	Université d'Annaba
Examineur :	Dr .F. TINE,	Université de Tebessa
Examineur :	Dr. N. ZAIDI	Université de Skikda

Année universitaire 2015 /2016

Remerciements

A l'horizon de ces années de travail, je tiens à exprimer mes remerciements à tous ceux qui, par leurs conseils et leurs soutiens m'ont aidée à la réalisation de cette thèse.

Je suis très honorée que M^r Noredine Soltani (Pr, université d'Annaba), ai accepté de présider ce jury, je ne le remercierai jamais assez de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses conseils et son expérience m'ont énormément aidé à évoluer en tant qu'enseignante, je lui en suis très reconnaissante.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse Mr Mohamed El Hedi Khebbeb (Pr, université d'Annaba) qui m'a considérablement guidée dans mon raisonnement, Son encadrement scientifique et ses bons conseils m'ont énormément aidée à évoluer professionnellement.

J'assure de ma sincère reconnaissance à M^{me} Lamia Chaoui (Pr, Université d'Annaba), Mr Hichem Nasri (Pr, Université d'El Tarf), M^{me} Fouzia Tine (Maitre de conférences, université de Tébessa) et Melle Nejoua Zaidi (Maitre de conférences, Université de Skikda) d'avoir bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse en dépit de leur nombreuses responsabilités, leur compétences et commentaires avisés seront d'un apport considérable à ce travail.

Il m'est impossible d'oublier mes chers collègues du département des sciences vétérinaires de l'université d'El Tarf et du département de biologie animale de l'université d'Annaba pour leur dévouement et leurs encouragements bienveillants, je leur assure mes très vives et sincères reconnaissances.

Enfin, je laisse le meilleur pour la fin en adressant ces quelques mots d'Amour à mes adorables parents à qui je dédie cette thèse, qu'ils attendent depuis longtemps.

Merci pour tout.

Dédicaces

Je dédie cette thèse au mérite de mes parents, amour de ma vie qui m'ont tant donné au fil du temps tous les encouragements, les sacrifices et leur soutien moral. Si je suis là aujourd'hui et c'est bien grâce à eux.

*A mes adorables filles **Maissa** et **Jihene** que dieux les garde et je leur souhaite une bonne réussite dans leur vie.*

A mon chère marie qui m'a toujours mis en confiance.

*Sans oublier mes deux frères **Yacine** et **Mehdi** et leur douces femmes.*

*A mes amours de nièces et neveux, **Lydia**, **Norane** et **Kenzy**.*

*A ma chère tante **Mabrouka** qui m'a été d'une grande aide.*

*A toute la famille **Morsli** qui m'ont apporté beaucoup de bien.*

Merci pour tout.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION GENERALE.....	1
2. MATERIEL ET METHODES	7
2.1. Présentation de la crevette :	7
2.2. Présentation du site d'échantillonnage et collecte:	8
2.3. Anatomie de la crevette :	9
2.4. Technique d'élevage:	11
2.5. Datation des crevettes :	11
2.6. Insecticide et traitement :	14
2.7. Détermination de la composition biochimique de la cuticule :	15
2.8. Technique de microscopie électronique à transmission :	15
2.10. Extraction et analyse des résidus par CLHP:	20
2.11. Analyse statistique des données :	21
3. RESULTATS	23
3.1. Composition biochimique de la cuticule :	23
3.1.1. Effet sur le taux de chitine cuticulaire.....	23
3.1.2. Effet sur le taux de protéines cuticulaires	26
3.1.3. Sur effet sur le taux des sels calciques :	29
3.2. Epaisseur et structure fine de la cuticule :	31
3.2.1. Etude du tégument en microscopie photonique :	31
3.2.2. Etude de la structure fine de la cuticule	33
3.3. Composition biochimique de l'hémolymphe et de la chair :	40
3.3.1. Effet du traitement sur les protéines hémolympatiques :	40
3.3.2 Effet du traitement sur les glucides et hémolympatiques :	40
3.3.3. Effet du traitement sur les lipides hémolympatiques :	41
3.3.4 Effet du traitement sur les proteines dans la chair :	42
3.3.5 Effet du traitement sur les glucides dans la chair :	42
3.3.6 Effet du traitement sur lipides dans la chair :	43
3.4. Analyse des résidus du dimilin par H.P.L.C :	43
3.4.1. Spectre d'absorption du standard :	43
3.4.2. Linéarité de la réponse du détecteur U.V :	44
3.4.3. Analyse des résidus dans l'eau de mer :	45
4. DISCUSSION:	49

5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES:	67
6. RESUME:	70
7.REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:	74
8. PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	97

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure.	Titre	Page
Figure 1	Morphologie de <i>Penaeus kerathurus</i> .	7
Figure 2	Distribution géographique de <i>P. kerathurus</i> dans le monde (Ancarta, 2004).	8
Figure 3	Situation géographique de la zone d'échantillonnage dans la baie d'Annaba (36°52' et 37°16') γ : embouchure de l'oued. (Embouchure de l'oued Seybouse, 1; embouchure de l'oued Mafragh, 2) (Ancarta, 2004).	9
Figure 4	Anatomie externe d'une crevette. (Anatomie d'une crevette: Crusta-Fauna.htm).	10
Figure 5	Anatomie interne d'une crevette. (Anatomie d'une crevette: Crusta-Fauna.htm).	10
Figure 6	Observation au microscope photonique d'un fragment d'uropode de <i>Penaeus kerathurus</i> montrant les caractéristiques des différents stades de mue. A: Stade A (Gr \times 136), B: Stade B (Gr \times 227), C: Stade C (Gr \times 136), D: Stade D (Gr \times 182). (ebs: étirement de la base des soies; ee: espace exuvial; e: épiderme).	12
Figure 7	Formule chimique du diflubenzuron. (Lechekhab &al., 2009).	14
Figure 8	Dosage des glucides : courbe de référence.	18
Figure 9	Dosage des lipides : courbe de référence.	19
Figure 10	Dosage des protéines : courbe de référence	20
Figure 11	Durée relative (en jours) des différents stades du cycle de mue de <i>P. kerathurus</i> (— = un jour). Taux (%) de chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).	23
Figure 12	Taux (%) de la chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$)	24
Figure 13	Effet du dimilin sur le taux (%) de chitine dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$).	26
Figure 14	Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).	27
Figure 15	Effet du dimilin sur le taux (%) de protéines dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$).	28
Figure 16	Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).	29
Figure 17	Effet du dimilin sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule à l'intermue chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$).	31

Figure 18	Coupes histologiques observées au microscope photonique chez <i>Penaeus kerathurus</i> témoins et traités au dimilin.	32
Figure 19	Observation en microscopie électronique à transmission de la cuticule de <i>Penaeus kerathurus</i> témoins.	34
Figure 20	Observation en microscopie électronique à transmission de la cuticule de <i>Penaeus kerathurus</i> témoins. Fig.F : Détail du tégument au stade D, montrant le début d'apolyse (flèche) (x12800).Fig.G : Tégument au stade D, on observe sous l'espace éxuvial (e-e) la nouvelle cuticule (n.c) sécrétée par l'épiderme(e) (x12800).	35
Figure 21	Observation en microscopie électronique à transmission chez <i>Penaeus kerathurus</i> traitées au dimilin pendant 24 heures.	37
Figure 22	Observation en microscopie électronique à transmission chez <i>Penaeus kerathurus</i> après traitement continu au dimilin avec une dose de 1µg/l.	39
Figure 23	Evolution des concentrations des protéines hémolympatiques (mg/ml) chez <i>P.kerathurus</i> témoins et traités au dimilin (1µg/l, pendant 24 heures) au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, n= 3-7).	44
Figure 24	Evolution du taux des protéines (mg/g) dans la chair de <i>P.kerathurus</i> témoins et traités au dimilin (1µg/l, pendant 24 heures) au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, n= 3-7).	45
Figure 25	Evolution des concentrations en lipides hémolympatiques (mg/ml) chez <i>P.kerathurus</i> témoins et traités au dimilin (1µg/l, pendant 24 heures) au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, n= 3-7).	46
Figure 26	Evolution du taux des lipides dans la chair (mg/m) chez <i>P.kerathurus</i> témoins et traités au dimilin (1ug/l, pendant 24 heures) au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, n= 3-7).	47

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau.	Titre	Page
Tableau 1	Les différents stades de mue et leurs caractéristiques (Robertson <i>et al.</i> 1987).	13
Tableau 2	Taux (%) de chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).	23
Tableau 3	Taux (%) de la chitine dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins. Analyse de la variance à un critère de classification.	25
Tableau 4	Taux (%) de chitine dans la cuticule des différents stades de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins. Test de Tukey : Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.	25
Tableau 5	Effet du dimilin sur le taux (%) de chitine dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$).	25
Tableau 6	Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).	26
Tableau 7	Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins. Analyse de la variance à un critère de classification.	27
Tableau 8	Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins. Test de Tukey: les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.	28
Tableau 9	Effet du dimilin sur le taux (%) de protéines dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$)	28
Tableau 10	Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).	29
Tableau 11	Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins. Analyse de la variance à un critère de classification.	30
Tableau 12	Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez <i>P. kerathurus</i> témoins. Test de Tukey: les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5	30
Tableau 13	Effet du Dimilin sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule à l'intermue chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).	30

Tableau 14	Épaisseur (μm) des différentes couches cuticulaires mesurés à la fin de la post- mue chez <i>Penaeus kerathurus</i> témoins et traités au diflubenzuron ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les valeurs d'une même couche affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$).	35
Tableau 15	Les variations des concentrations des protéines hémolympatiques (mg/ml) chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, $n = 3-4$).	40
Tableau 16	Variations des concentrations des glucides hémolympatiques (mg/g) chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, $n = 3-7$).	41
Tableau 17	Variations des concentrations des lipides hémolympatiques (mg/ml) chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, $n = 3-9$).	41
Tableau 18	Evolution des protéines totales (mg/g) dans la chair chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, $n = 3-6$).	42
Tableau 19	Evolution des concentrations des glucides totaux (mg/ml) dans la chair chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, $n = 3-10$).	42
Tableau 20	Evolution des concentrations des lipides (mg/g) dans la chair chez <i>P. kerathurus</i> témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm S$, $n = 3-6$).	43
Tableau 21	Spectre d'absorption du diflubenzuron : Absorbance en fonction de la longueur d'onde.	43
Tableau 22	Réponse du détecteur U.V de l'HPLC : quantité (μg) du standard. (diflubenzuron en fonction de l'aire du pic. (UA= unité arbitraire).	44
Tableau 23	Evolution du taux de résidus de dimilin dans une eau de mer comprenant une concentration de départ de $10 \mu\text{g/l}$ ($m \pm \text{SD}$, $n = 3$).	47

INTRODUCTION GENERALE

1. INTRODUCTION GENERALE

L'espace marin souffre d'un grand malaise écologique, et le peuplement des côtes fait que la pollution augmente d'une façon vertigineuse et dangereuse, par les déversements de toutes sortes de polluants détruisant notre faune et notre flore. Sans oublier les pesticides et les déchets ménagers qui y sont déversés quotidiennement (Arzul & *al.*, 2004) causant des dégâts dans la chaîne alimentaire et donc à la santé humaine (Mc Cauley & *al.*, 2000 ; Long, 2000).

En plus dans notre société qui devient très technologique le littoral se trouve exposé continuellement à des substances et des micropolluants directement rejetés dans les mers et les océans, sans oublier aussi les rejets dans l'air qui sont ensuite répandus dans les sols et drainés par les rivières et les fleuves (Damiens & *al.*, 2004 ; Valavanidis & *al.*, 2006).

On compte plusieurs milliers de produits chimiques commercialisés sous plusieurs formes différentes et qui sont utilisés dans l'industrie et par l'homme et qui deviennent des polluants potentiels de l'écosystème global (Stageman & Hahn, 1994 ; Scott & Sloman, 2004). La présence de ces pesticides dans l'eau, (comme les hydrocarbures, métaux lourds, et certaines substances chimiques) et dans les sols agricoles (comme les pesticides et insecticides) polluent le bassin méditerranéen où vivent de grandes populations (Sarkar & *al.*, 2006 in Sifi & *al.*, 2007).

Tous ces problèmes ont fini par attirer l'attention des consommateurs et des pouvoirs publics (Pilette & Pease, 1993). De ce fait la législation concernant ces pesticides est devenue de plus en plus exigeante au fil des ans, nécessitant la réalisation de tests toujours plus sensibles. Des méthodes conventionnelles, telles que la chromatographie liquide à haute performance ou la

chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont permis déjà , dans certains cas, la détermination des concentrations au niveau requis par la législation. Toutefois, leurs limites ont poussé à la mise au point de tests rapides permettant de réaliser un nombre important d'analyses sur le terrain et en laboratoire. A l'heure actuelle ce sont les tests immuno enzymatiques qui sont développés dans certains laboratoires (Ramade, 1992 & Ishaaya, 1998).

La préoccupation des scientifiques sur la pollution des milieux aquatiques a donné la priorité à une discipline nouvelle qui est l'écotoxicologie. Elle se développe au fur et à mesure qu'augmentent les rejets polluants et les accidents qui en résultent (Valavanidis & *al.*, 2006 et Vander Oost & *al.*, 2003).

Les analyses écotoxicologiques faites sur les pesticides utilisés nous renseignent sur leur impact sur la santé de l'homme qui n'est pas prise en considération par des autorités compétentes. Ramade, 1992 a montré que si les pesticides ne sont pas dégradés rapidement après leurs applications, ils peuvent contaminer les différents biotopes et donc atteindre l'homme. Les effets secondaires des pesticides conventionnels ont encouragé le développement de molécules plus sélectives qui agissent sur plusieurs processus métaboliques et à faibles doses (Dhadialla & *al.*, 2005, 2010) : les régulateurs de la croissance des insectes. Ils ont été découverts dans les années 70 (Staal, 1982).

Parmi ces molécules nous avons testé dans notre étude le diflubenzuron le premier représentant de la classe de benzoylphenyl urée (BPU). C'est un inhibiteur de la synthèse de la chitine (Soltani *et al.*, 1993, Merzendorfer, 2013). Cette molécule agit sur la sécrétion de la cuticule et perturbe la synthèse de la chitine (Ishaaya & Casida, 1974, Ishaaya, 1990, Chebira *et al.*, 1996 et Soltani *et al.*, 1999).

Il a été commercialisé à partir de 1970 (Retnakaran & *al.*, 1985), il a fait l'objet de plusieurs recherches et des revues lui ont été consacrées (Grosscurt & *al.*, 1987 ; Retnakaran & Wright, 1987). Il représente une nouvelle classe d'insecticides de synthèse.

L'impact de ces composés toxiques ont été largement étudiés dans notre laboratoire sur plusieurs organismes visés, spécialement sur les insectes à intérêt agronomique , tels que *Tenebrio molitor* et *Ephestia kuhniella* (Soltani & *al.*, 2002 ; Taibi & *al.*, 2003 ; Amrani & *al.*, 2004 Soltani – Mazouni & *al.*, 2004 ; Aribi & *al.*, 2006 ; Chebira & *al.*, 2006 ; Berghiche & *al.*, 2008 ; Khebbab & *al.*, 2008) à intérêt médical, chez la blatte germanique *Blattella germanica* (Habes & *al.*, 2006 ; Kilani – Marakchi & *al.*, 2006) , les moustiques du genre *Culex* (Rehimi & Soltani 1999 ; Boudjelida & *al.*, 2008 ; Tine – Djebbar & Soltani, 2008) , les abeilles tels que

Apis mellifera (Achou & Soltani , 1997 ; Barour & al., 2005 ; Loucif – Ayad & al., 2008) et les chenilles de *lymantia dispar* (Ouakid & al., 2005) ; ainsi que sur des espèces non visées telles que le myriapode *Eupolybothrus nudicornis* (Daas & al., 1996 ; Dass & al., 2007), le poisson *Gambousia affins*, (Drardja- Beldi & Soltani , 2003 ; Soltani & al., 2008), la crevette *Penaeus kerathurus* (Soltani & Bezzazel , 2002 ; Morsli & Soltani , 2003) et l'haricot de mer *Donax trunculus* (Soltani & al., 2005 ; Beldi et al., 2006).

Les Arthropodes constituent l'un des meilleurs matériels d'analyse expérimentale de la morphogénèse. Ils sont caractérisés par un corps segmenté et un tégument périphérique composé d'un épiderme sécrétant une cuticule rigide qui impose une croissance discontinue qui se fait par mues successives. Les crustacés occupent une place importante et originale au sein de l'embranchement des Arthropodes. Ils ont fait l'objet de recherche dont l'impact des polluants chimiques sur leur reproduction (Mc Cauley & al., 2000 ; long, 2000). Plusieurs travaux ont été réalisés sur les crustacés comme ceux de Weis & al., 1987, Cardinal & al., 1979 ; Costlow , 1979 ; Galka & al., 1980 ; Ali & al., 1988 et Bouliguand ,1988. La plupart des auteurs se limitent à une description des couches successives telles qu'elles apparaissent en intermue (Compère, 1988). Les premières études réalisées en microscopie électronique révèlent deux principales divisions de la structure une fine couche qui est l'épiderme et une couche plus épaisse qui est la procuticule subdivisée en trois strates, la couche pigmentaire, la couche principale et la couche membraneuse. Ces couches reposent sur l'épiderme, couche unicellulaire qui secrète la cuticule (Hadley, 1986).

Comme tous les Arthropodes, les crustacés possèdent un exosquelette chitino protéique appelé exocuticule, il est imprégné de carbone et de sel calciques, il est plus ou moins rigide sauf en certaines zones où il demeure souple pour permettre les articulations des différentes parties du corps et des appendices. Cette cuticule qui constitue le squelette externe est peu extensible ce qui rend nécessaire le recours au phénomène de mue qui est un processus cyclique, décrit par Drach (1939,1944) chez les crustacés. Il est influencé par l'action de facteurs extinsèques (température, salinité, alimentation...) et intrinsèques (sexe, gamétogénèse, hormone,...) (Bourguet & al., 1977).

Le phénomène de mue est une caractéristique physiologique des Arthropodes en général et des crustacés en particulier. Il se manifeste par un renouvellement périodique de la cuticule et par une série de modification tissulaire et comportementale.

La biominéralisation est un processus important qui a lieu au moment de la formation de la nouvelle cuticule chez les crustacés. Ce procédé consiste à la formation de la structure

minéralisée par les organismes vivants. Il est contrôlé par une matrice organique appelée de nos jours matrice minéralisée (Mann, 1983). La première fonction importante de ce processus est le durcissement du squelette. Cette structure offre un soutien pour les muscles et la protection contre les agressions environnementales, sans oublier la protection contre les prédateurs, y compris l'évolution défavorable de la composition ionique des océans notamment la concentration en ions Ca^{++} (Pouget & al., 2009).

Ce processus de biominéralisation est bien développé chez les crustacés, l'un des groupes les plus remarquables à cet égard, en conséquence la présence d'un exosquelette rigide, la croissance et l'ensemble de la physiologie de ces animaux sont liés à ces cycles de mue, qui sont caractérisés par le renouvellement complet de l'exosquelette. Chez les crustacés, il y'a la présence d'un hypoderme cellulaire qui soutient la cuticule calcifiée appelé également carapace, elle est responsable de la synthèse de cette dernière. Les différentes couches qui la constituent sont : l'épicuticule, l'exocuticule, l'endocuticule et la couche membraneuse. La calcification de cette cuticule a été étudié chez les décapodes (Travis, 1963 ; Jeuniaux, 1963).

La présence de la cuticule affecte profondément la biologie des crustacés, plus encore que celle des autres Arthropodes et spécialement le développement, la croissance et divers aspect de leur écologie. On s'accorde alors à souligner les caractères qui singularisent la cuticule des crustacés des autres Arthropodes. Elle est d'une seule venue, elle pénètre même profondément au niveau des invaginations ectodermiques. Elle est essentiellement de nature chitinoprotéique et peu extensible, ce qui impose une croissance par paliers grâce à un système de mues impliquant la synthèse d'une nouvelle cuticule à intervalles variables. Il y'a synthèse de la chitine par l'ectoderme elle est toujours associée à des protéines pour former la trame des exosquelettes (Jeuniaux, 1963, 1982).

C'est pendant la période préecdysiale, après l'apolyse (Stade D1 à D4) des stades de mues de Drach, 1939, que l'épiderme sécrète la partie de la nouvelle cuticule qui deviendra ensuite la couche pigmentaire (Travis, 1955).

La cuticule des crustacés est une structure hautement organisée dans laquelle la chitine et les protéines sont associées en microfibrilles qui s'organisent en macromolécule dans la couche principale, en réseau réticulés dans la couche pigmentaire et entre les deux s'insèrent les dépôts minéraux qui jouent un rôle principal dans la rigidité de la cuticule comme il a été démontré chez le *Crabe maenas* (Goffinet & al., 1987).

Les crustacés sont des ressources halieutiques d'une grande importance économique. Se sont des espèces à haute valeur nutritionnelle en raison de la qualité de leur composition biochimique en protéines, glucides et lipides et leur richesse en élément minéraux, en vitamines et en acides gras insaturés (Caers et al., 2000). La physiologie et la biochimie de ces crevettes *Peneides* sont relativement bien connues, ce qui nous a permis de voir les réponses de ces organismes aux différentes perturbations environnementales et aux pesticides rejetés par la mer (Parant, 1998).

La ville d'Annaba est un important pôle économique et touristique situé sur les côtes algériennes appelé le golfe d'Annaba. La pollution qui en découle provient de l'activité humaine et industrielle et qui se retrouve dans le milieu marin où vivent plusieurs espèces de Mollusques et de Crustacés (Sifi & al., 2007).

Le littoral d'Annaba est exposé à plusieurs agressions toxiques et donc une dégradation qualitative et quantitative des ressources dont la crevette *Penaeus kerathurus* à cause de certains rejets urbains et industriels qui ne sont pas contrôlés. C'est pour cela que nous avons étudié la qualité des eaux du golfe d'Annaba où vit cette crevette, ainsi que l'impact des pesticides sur la cuticule de cette espèce.

Les recherches envisagées dans notre travail visent à évaluer : - l'effet du Dimilin sur l'espèce *P. kerathurus* au cours du cycle de mue, en étudiant d'abord l'impact sur la composition biochimique de la cuticule, et sur la structure de la cuticule en microscopie photonique et électronique à transmission afin de déceler d'éventuelles perturbations de cette composition chimique au cours d'un cycle de mue chez les animaux témoins et traités au Dimilin, puis l'effet sur la biochimie de l'hémolymphe et la chair, et enfin terminer par une étude de la dégradation de cette molécule dans l'eau de mer.

MATERIEL ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. PRESENTATION DE LA CREVETTE :

L'espèce étudiée est un crustacé Décapode, Peneïdé appelé communément *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775). Toutefois, elle a fait l'objet de plusieurs appellations comme par exemple matsagoune, caramote mazzancolla, tout dépend de la région correspondante. Elle se distingue des autres crevettes par une carapace lisse, un rostre denté de 8 à 13 dents sur le bord ventral, un abdomen assez long et segmenté, il se détermine par un telson, armé de trois paires d'épines mobiles (Fig. 1). Sa couleur varie selon le sexe, elle est d'un gris rose avec une alternation des barres transversales. Pour ce qui est de la taille, la longueur maximale est de 18 cm pour les males et 22,5cm pour les femelles.

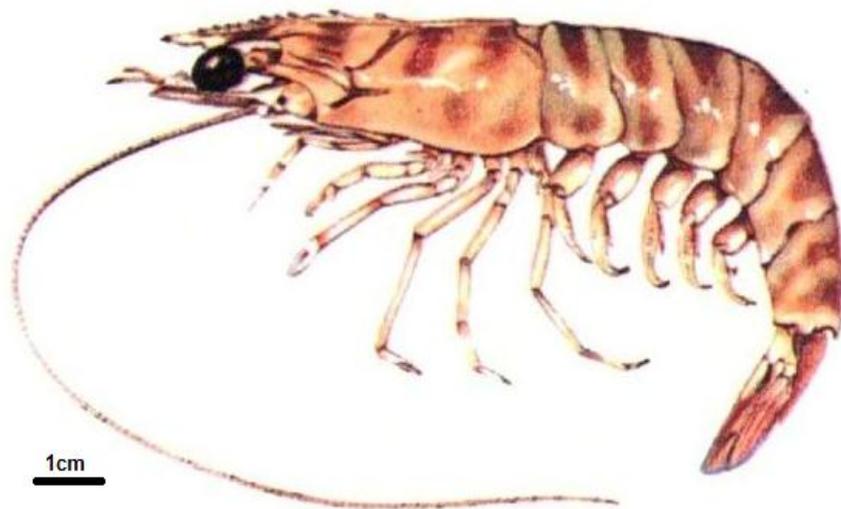


Figure 1. Morphologie de *Penaeus kerathurus* (Morsli, 1994)

La classification de l'espèce *P. kerathurus* a été faite selon Kaestner, 1970. Sa position systématique est la suivante :

Embranchement	Arthropoda
Sous-embranchement	Antenna, Mandibulata
Classe	Crustacea
Ordre	Decapoda
Sous-ordre	Penaeïdea
Famille	Penaeïdea
Genre	<i>Penaeus</i>
Espèce	<i>kerathurus</i> (Forsk., 1775)

2.2. PRESENTATION DU SITE D'ÉCHANTILLONNAGE ET COLLECTE :

Ce crustacé se trouve dans la méditerranée en grand nombre (Lagardere, 1971). La distribution de cette espèce est très large dans le monde. C'est ce qui nous a permis de la découvrir dans toute la méditerranée (Holthuis 1980, 1987). Elle a été retrouvée sur le littoral marocain par (Zariquiey Alvarnez ,1952) et par (Munoz-Sevilla, 1982). Elle a été observée aussi en Tunisie par (Azzouz, 1981), ainsi qu'en Adriatique par (Karlovac ,1959) et enfin en Israël par(Holthuis & Gottieb ,1958). *P. kerathurus* est présente également dans l'Atlantique et des îles britanniques jusqu'à l'Angola (Fig. 2).

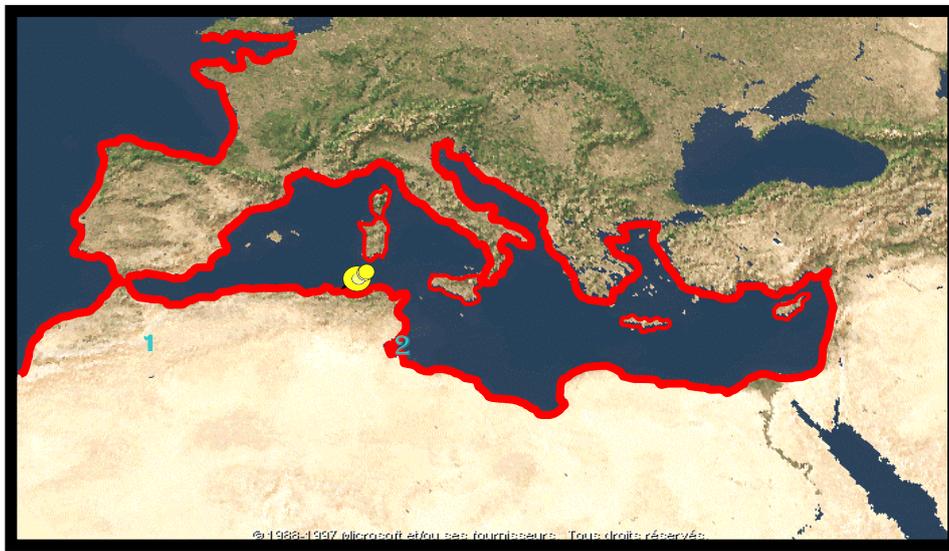


Figure 2 : Distribution géographique de *P. kerathurus* dans le monde (Ancarta, 2004).

Cette espèce est très répandue dans l'Est du pays et surtout dans le golfe d'Annaba (Derbal, 1991). Son échantillonnage se fait au voisinage des Oued mafragh et Seybouse où cette espèce se réfugie particulièrement en hiver. Les crevettes, une fois adultes deviennent de bons fouisseurs la journée et s'activent à la tombée du crépuscule ; C'est pour cela que la pêche est plus pratique, le soir. Elle se fait au chalut. En saison chaude, elles migrent vers les eaux peu profondes, car il y a moins de courants pour se reproduire (Lumare, 1978).

Dans notre cas l'échantillonnage se fait entre la plage de Sidi Salem et El-Battah. Ces deux sites se trouvent dans le golfe d'Annaba, qui est limité à l'est par le Cap Rosa (8°15' L.E et 36° 58' L.N) et à l'ouest par le Cap de garde (7°16' L.E et 36° 58' L.N), et la distance séparant les deux caps est d'environ 40 km (**Fig. 3**).

Notre choix s'est porté sur le site de Sidi Salem qui est non loin d'Annaba, pour faciliter le transport de cette espèce. Il est caractérisé par l'embouchure de l'oued Mafragh qui est très riche en composés organiques et minéraux Attoum & *al.*, 2001.

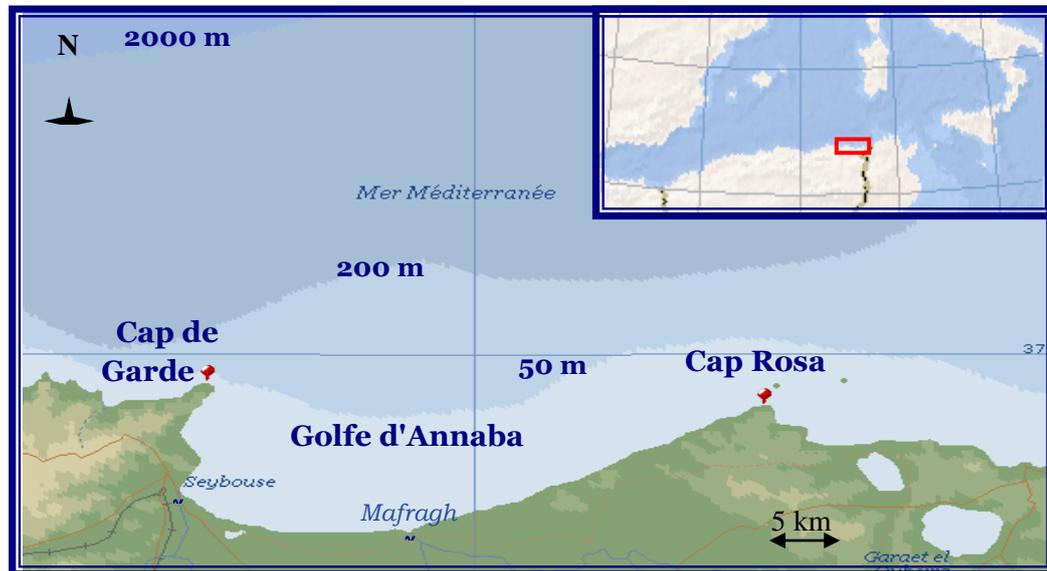


Figure 3 : Situation géographique de la zone d'échantillonnage dans la baie d'Annaba ($36^{\circ}52'$ et $37^{\circ}16'$) γ : embouchure de l'oued. (Embouchure de l'oued Seybouse, 1; embouchure de l'oued Mafragh, 2) (Ancarta, 2004).

2.3. ANATOMIE DE LA CREVETTE :

Les crustacés possèdent un exosquelette, formé d'une cuticule assez épaisse. Le corps est composé de segments portant chacun une paire d'appendices. Ces appendices se sont spécialisés dans plusieurs fonctions comme la respiration la reproduction, la locomotion et la nutrition. La tête est formée par le céphalothorax, qui donne suite à l'abdomen. La tête porte deux paires d'organes sensoriels ; les antennes et les mandibules. Les maxilles se trouvent derrière ces dernières. Elle porte aussi une paire d'yeux composés.

Le céphalothorax porte des appendices qui servent à la locomotion et à la respiration (branchies) ; au niveau de la bouche, il y'a des pinces qui servent à mobiliser la proie. Les appendices se trouvant sur l'abdomen sont de plus petite taille et servent à la locomotion. Le corps est terminé par le telson qui sert parfois à la nage (Fig. 4).

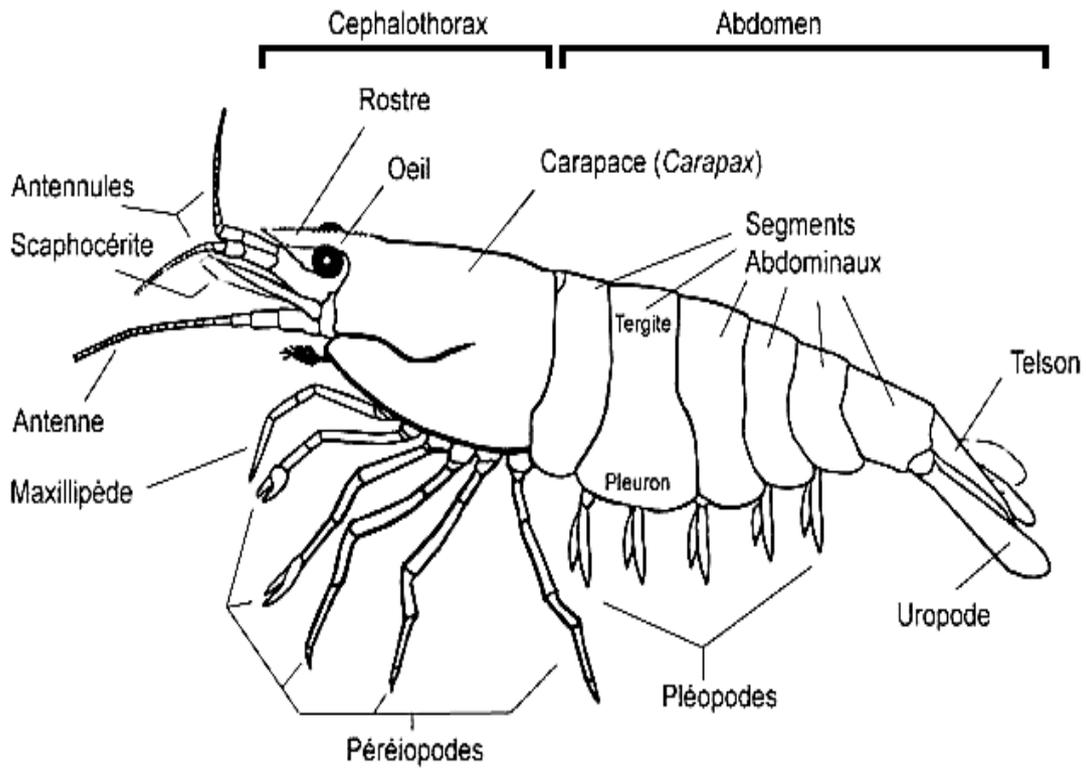


Figure 4. Anatomie externe d'une crevette. (Anatomie d'une crevette: Crusta-Fauna.htm).

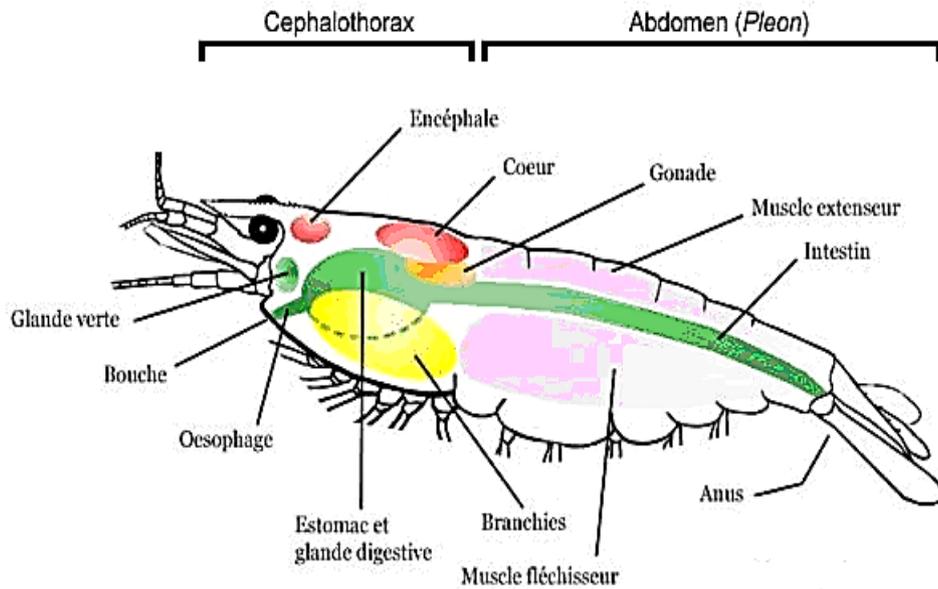


Figure 5. Anatomie interne d'une crevette. (Anatomie d'une crevette: Crusta-Fauna.htm).

La figure 5 montre la mise en place des différents organes internes de la crevette. On voit que le système circulatoire est présent dans tout le corps où l'hémolymphe y circule et est pompée par le cœur dorsal. L'estomac ; comparable à un gésier ; se trouve juste après l'œsophage court, et se termine par l'intestin qui est un tube droit allant jusqu'à la partie caudale, des reins qui sont situés près des antennes. Le système nerveux est une succession de ganglions cérébraux se trouvant près des organes des sens. La chaîne ganglionnaire et les nerfs se trouvent dans la partie ventrale sous l'intestin.

2.4. TECHNIQUE D'ELEVAGE:

De petites embarcations pêchent les espèces étudiées au large du golfe d'Annaba. Les individus sont placés immédiatement après la pêche dans des jerricans en plastique remplis d'eau de mer qui est le milieu d'élevage. Le fond de ces bidons a une épaisseur de quelques centimètres de sable fin. Un brassage est nécessaire jusqu'à l'arrivée de l'échantillonnage au laboratoire, ces crevettes sont transférées dans des aquariums équipés. La dimension de ces derniers est de 1m x 0,65m, le fond est constitué d'une couche de sable assez épaisse pour qu'elles s'enfouissent. L'éclairage se fait à la lumière naturelle, la salinité est d'environ 37 ‰. L'eau est filtrée par des filtres EHEIE, 200702, munis de biofiltre ayant un débit de 180l/h. L'eau est oxygénée par des pompes à air (Rena 101). La température de l'eau est maintenue par des chauffe-eau automatique (Rena), elle est comprise entre 24 et 27°C selon les saisons.

En captivité dans leur nouveau milieu, les crevettes ne s'alimentent pas pendant 2 à 3 jours. A partir du 3^{ème} jour elles acceptent la nourriture de la chair de moules et d'haricots de mer, distribuée en fin de journée.

Les aquariums doivent être nettoyés chaque matin, en enlevant la nourriture en excès et toute sorte de déchets. L'élevage des crevettes est suivi pendant toute la durée du cycle de mue (jusqu'à l'exuviation). La durée moyenne du cycle de mue est en moyenne de $26,5 \pm 4,5$ jours (Derbal & Soltani, 2008), en milieu contrôlé (photopériode : 12h lumière-12h obscurité, salinité de l'eau mer 37 ‰, température : 22-25°C).

2.5. DATATION DES CREVETTES :

Les crevettes d'une façon générale et *Penaeus kerathurus* en particulier ont une carapace extérieure solide dont elles doivent se débarrasser pour croître, ce phénomène est appelé : la mue. L'hormone responsable de cette mue est l'ecdysone, elle est sécrétée par l'organe Y. La mue a été définie chez les Décapodes par Drach, 1939 ; 1944, Drach & Tchernigovtzeff, 1967, Robertson & al., 1987 et enfin O'hallorren & O'dor, 1988. Ce phénomène se distingue par un gonflement du corps de l'animal afin de créer sa nouvelle carapace. Il se débarrasse de l'ancienne, pour laisser la nouvelle cuticule se mettre en place. Ainsi à chaque mue l'animal

pourra régénérer toutes les parties qui ont disparues. Après la mue, la crevette reste fragile jusqu'à ce que sa cuticule commence à se développer et durcit. En fait la mise en place de la nouvelle cuticule a lieu bien avant l'exuviation et continue au-delà.

Il a été possible de diviser le cycle de mue chez les Décapodes grâce à la méthode de Robertson & al., 1987. Cette datation est simple et rapide, elle consiste à prendre l'extrémité de l'uropode et observé au microscope entre lame et lamelle avec une goutte d'eau de mer. Elle permet de distinguer quatre stades essentiels : deux périodes en post-mue surnommées A et B, une intermue en C et une période D, qui est subdivisée en plusieurs stades, stade D₀-D₁- D₂ et D₃. Le stade E correspond à l'exuviation proprement dite, l'animal rejette l'ancienne cuticule. Cette étape se produit la nuit (Fig. 6).

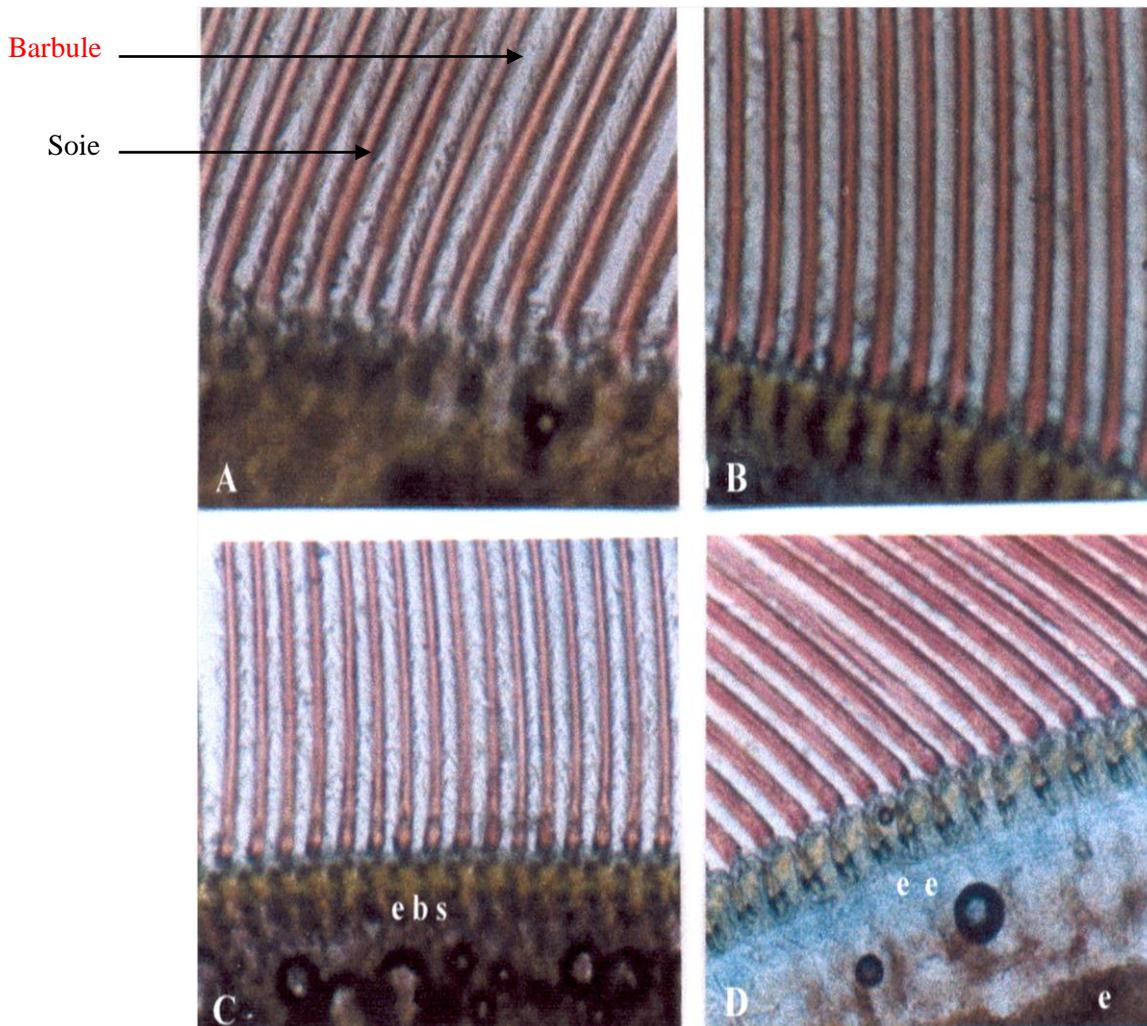


Figure 6. Observation au microscope photonique d'un fragment d'uropode de *Penaeus kerathurus* montrant les caractéristiques des différents stades de mue. A: Stade A (Gr \times 136), B: Stade B (Gr \times 227), C: Stade C (Gr \times 136), D: Stade D (Gr \times 182). (**Ebs**: étirement de la base des soies; **ee**: espace exuvial; **e**: épiderme).

La méthode de datation utilisée dans notre travail a été empruntée à Robertson & al., 1987. Cette datation simple, rapide et efficace est basée sur la morphogénèse des soies au niveau des appendices fins. L'organe de référence prélevé est l'extrémité de l'uropode qui a été observé sous microscope entre lame et lamelle, dans de l'eau de mer. Le tableau 1 présente les différents stades de mue et leurs caractéristiques:

Tableau 1 : Les différents stades de mue et leurs caractéristiques (Robertson & al. 1987).

Stades de mue		Durée	Caractéristiques
Postmue	A	2 jours	L'animal est mou, les soies sont sans rigidité et la matrice cellulaire est remplie de granules. Les barbules portées par les soies adhèrent entre-elles (elles sont entremêlées).
	B		Le corps commence à se consolider, la pigmentation s'accroît d'avantage. Le matériel cellulaire commence à se rétracter des soies.
Intermue	C	5 jours	L'exosquelette est formé et acquiert sa consistance, pigmentation achevée, les soies sont transparentes sauf à la base où subsistent encore quelques cellules.
Prémue	D	7 jours	Elle comporte 3 sous stades: -stade D0-D1: début de la phase active du processus de mue. Décollement de l'épiderme de l'ancienne cuticule, délimitant un espace exuvial, ainsi on observe un début de formation des nouvelles soies. -stade D2: la nouvelle cuticule est visible et les soies sont entièrement formées; absence des barbules. -stade D3: les nouvelles barbules et les nouvelles soies sont formées et bien organisées, laissant apparaître leur apex ce qui donne l'impression d'un « peigne », terme que cite Cognie (1970).
Exuviation	E	10 secondes	Se produit la nuit, l'animal se dépouille de son ancienne cuticule.

2.6. INSECTICIDE ET TRAITEMENT :

Le diflubenzuron (D.F.B) est le nom commun du 1-(4-chlorophenyl) -3-(2,6-difluorobenzoyl)- urée, commercialisé sous l'appellation de Dimilin 25% P.M (poudre mouillable) (Van Daalen & *al.*, 1972 ; Grosscurt , 1978).

Sa formule chimique est la suivante (figure 7).

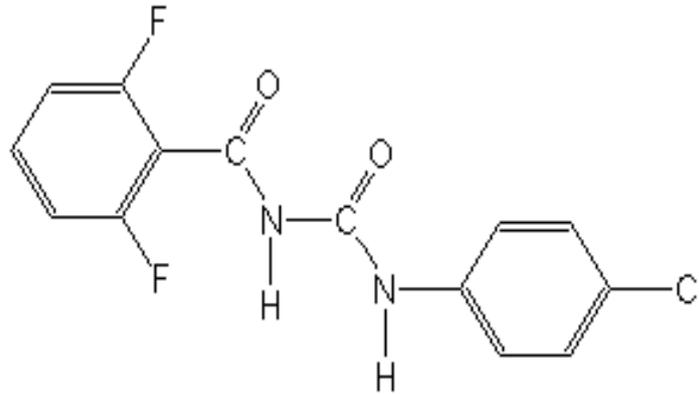


Figure 7 : Formule chimique du diflubenzuron. (Morsli & Soltani., 1994).

C'est une substance blanche sous forme de cristaux dont le poids moléculaire est de 310,7g sa solubilité à 20°C est de 0,2mg/l dans l'eau, il est soluble aussi dans les solvants organiques comme dans l'acétone 6500mg/l et dans la diméthylformamide 104g/l. Il est utilisé principalement par injection ou ingestion et parfois par contact dans notre cas chez les crustacés c'est ce qui élargit son spectre d'activité.

Le diflubenzuron est additionné à l'eau de mer d'élevage dans des aquariums (37‰). Des crevettes adultes sont traitées juste après l'exuviation (stade A). Les doses utilisées sont 1 µg/l et 10 µg/l. Ces concentrations ont été choisies d'après des études toxicologiques réalisées sur d'autres espèces de crustacés tel que le Crabe *Bernacle* (Gulka & *al.*, 1980 ;1982), le Crabe *Carcinus mediterraneus* (Cardinal & *al.*,1979) et le Crabe *Fiddler, Uca pugilator* (Weis & *al.*, 1987).

L'étude physiologique à été faite sur des lots de crevettes témoins et traités au dimilin juste après l'exuviation. Ces crevettes nouvellement exuviées sont exposées à l'insecticide, soit pendant 24 heures, soit pendant toute la durée du cycle de mue. Les crevettes témoins sont élevées dans des aquariums remplis d'eau de mer seule.

2.7. DETERMINATION DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE LA CUTICULE :

Le squelette de la crevette est formé de plusieurs segments articulés recouverts d'une cuticule rigide. Elle est composée de chitine, protéines et de sels calciques (Dall, 1965 a, b, c ; Vight. 1982). On prélève pour cette étude, le céphalothorax. La technique utilisée pour la détermination de la composition de cuticule est celle de (Wilinder ,1974).

Une moitié du céphalothorax est rincée à l'eau distillé séchée à 60 °C et pesée (p0), décalcifié par l'acide trichloracétique (T;C;A 10%). le résidu est rincé par l'eau distillée, séchée à 60 °C et pesée (p1). La différence entre (P0) et (P1) nous donne le poids des sels calciques.

La composition en protéine est déterminée après traitement de la cuticule décalcifiée par la soude NaOH2N à 110°C pendant 3 à 4h. On obtient un résidu décoloré qui correspond à la chitine qu'on va rincer abondamment à l'eau distillée puis séché à 60° C et pesé (P2). La différence P1 et P2 est le poids des protéines.

Le poids des différents composants est exprimé en mg, qu'on va représenter en %, en suivant les méthodes suivantes :

- Contenu en sels calciques (degré de calcification) :

$$\% \text{ sels calciques} = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100$$

- Contenu en protéines :

$$\% \text{ protéines} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

- Contenu en chitine :

$$\% \text{ chitine} = \frac{P_2}{P_1} \times 100$$

{ P0: poids du départ
 P1: poids décalcifié
 P2: poids de la chitine

2.8. TECHNIQUE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION :

L'épaisseur de la cuticule a été déterminée sur des coupes semi-fines, selon la méthode de (Karnovsky ,1965) puis modifiée par (Friend & Farquhar, 1967). Le fixateur utilisé est spécifique aux Peneidae. Cette méthode consiste à prendre un fragment d'uropode chez les individus témoins et traités au dimilin. Ces échantillons doivent passer par plusieurs étapes comme la fixation, le rinçage, la post-fixation, la déshydratation et enfin l'imprégnation et l'inclusion.

La fixation : Elle consiste à prendre un fragment d'uropode chez les individus témoins et traités que l'on fixe dans une solution contenant du Glutaraldehyde à 25 % du tampon cacodylate 0,2 M à un PH= 7,2 et de l'eau bi distillée bouillie. La fixation rend les pièces perméables au colorant et permet de préserver leurs structures macromoléculaires. Cette étape dure 1 heure de temps à une température de 4°C. Le fixateur chimique rend les pièces perméables aux colorants et préserve leur structure macromoléculaire. Ce fixateur a pour rôle de former des liaisons covalentes avec des groupements aminés libres des protéines et il relie des molécules adjacentes (Bruce & al., 1987).

D'une manière générale, cette étape consiste en une fixation et une stabilisation des structures cellulaires et établissement des ponts disulfures entre molécules lipidiques et protéiques. Elle conserve ainsi les squelettes macromoléculaires de la cellule. Ce temps peut être allongé jusqu'à plusieurs jours sans inconvénients à une température indifférente.

Après fixation, les pièces sont rincées dans du tampon cacodylate à ½ donc à 0,1M (10ml).

Le rinçage : Il se fait à raison de 3 min, le tout s'étalant sur environ 12 heures.

Le rinçage se fait en trois bains, le 3^{ème} bain reste jusqu'au lendemain.

La post-fixation : Elle se fait dans un mélange de peroxyde d'osmium (OSO₄) à 2 % et du tampon cacodylate à 0,2 M (solution cacodylate/saccharose) osmium à 1 % dans du cacodylate à 0,1 M, sa durée est d'une heure de temps.

La déshydratation : Elle prépare l'inclusion à la résine, celle-ci étant insoluble dans l'eau. Les pièces sont alors dégagées de leur eau par de l'alcool éthylique à degré croissant, 30°, 50°, 70°, 95° et enfin 100°C. Chaque bain consiste à immerger les échantillons deux fois et pendant 15 minutes.

La déshydratation sera complétée par un bain d'oxyde propylène deux fois 30 minutes qui permet l'éclaircissement des pièces.

Les pièces ainsi fixées et déshydratées restent encore mûles pour être couper, il faut donc les imprégnées dans une matière plastique rigide : la résine et qui servira de support pour la coupe.

L'imprégnation : Elle consiste à faire passer les pièces dans plusieurs bains de résine, dont la composition est la suivante : 60 ml de D.D.S.A (2 Dodecen -1- Ylsucanic – anhydrite) 20 ml d'Araldite, 25 ml d'epikote et 15 ml de résine /0,6 ml de D.MP 30 à 4%, ce qui permet de polymérisé le mélange à la chaleur.

Le premier bain se fera dans un mélange de résine + oxyde de propylène (50/50). Le second bain se fera dans un mélange en parties égales de résine + accélérateur à 4 % jusqu'au lendemain.

Le lendemain on effectue un troisième bain de résine + l'accélérateur à 4 % pendant une heure.

L'inclusion : Elle est réalisée dans des moules appropriés. Ces derniers sont remplis avec un mélange de résine + accélérateur à 4 %. On place dans chaque moule une référence de l'échantillon, la pièce est placée au sommet du moule en forme de pyramide, le tout est mis dans une étuve à 37° C pendant 12 heures. Les pièces sont ensuite orientées puis remises dans une étuve à 60°C pendant 3 jours.

Au moment de l'emploi, le bloc devra être taillé, collé au porte objet puis débiter en coupe à l'aide d'un ultra-microtome LBK 2128, qui utilise des couteaux de verre. Le couteau est une arrête de verre préparée en cassant avec soin une barre de verre à l'aide d'un « Knife- maker » L.K.B 7800. Les observations se feront sur des coupes de 0,3 à 1 µm d'épaisseur qui seront observées au microscope électrique qui permettront une meilleure mensuration de l'épaisseur de la cuticule au cours d'un cycle de mue chez les témoins et traitées au Dimilin.

La coupe : Les coupes semi-fines sont prises sur une lame de verre et colorées avec du bleu de toluidine pendant 5 minutes. Tandis que les coupes fines sont prises sur des grilles pendant 8 minutes selon (Reynolds, 1963). Les coupes fines observées au microscope électronique Hitachi 600 au centre de microscopie de Dijon (France).

2.9. Extraction et dosage des constituants biochimiques corporels:

Les dosages biochimiques ont été réalisés individuellement sur des fragments de chair de poids 50mg, puis additionnés à 1ml de T.C.A à 20% et froid et les prélèvements d'hémolymphe de 5µl sont additionnés à 500µl d'eau distillée+1µl de PMSF.

L'extraction des différents métabolites comme les protéines, les glucides et les lipides dans la chair et l'hémolymphe a été réalisée selon le procédé de (Shibko & al., 1966).

L'extraction dans la chair : les échantillons de chair sont broyés par un homogénéiseur à ultra-sons puis on procède à une première centrifugation à 5000 trs/min, 4°C, pendant 10min. Le surnageant 1 obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux. Au culot1, on ajoute 1ml Ether/chloroforme (1/1). Une deuxième centrifugation a lieu (5000trs/min, 4°C, 10min), on obtient le surnagent2 et le culot 2.

Le surnagent 2 sert pour le dosage des lipides et le culot 2 pour le dosage des protéines.

L'extraction dans l'hémolymphe : chaque tube eppendorf contient 5µl d'hémolymphe additionné de 500µl d'eau distillée puis 1µl de PMSF.

Le dosage des glucides : il est fait selon la méthode de (Mokrash, 1954) modifiée par (Duchateau & Florkin, 1959).

Pour l'hémolymphe 100µl de chaque échantillon sont prélevés et additionnés de 1ml d'Anthrone, le tout est chauffé a 80°C pendant 10min puis on procède à la lecture des absorbances à une longueur d'ondes de 620nm. On utilise comme standard le tréhalose.

Pour la chair un aliquote de 100µl est prélevé du surnageant1 est additionné à 1ml d'Anthrone, le tout est chauffé à 90°C pendant 10min puis on procède à la lecture des absorbances à une longueur d'ondes de 620nm (figure 8)

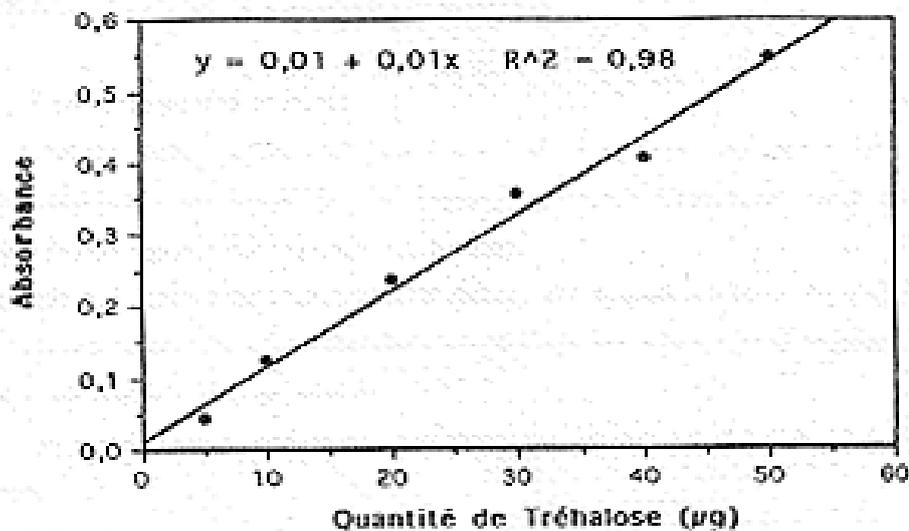


Figure 8 : Dosage des glucides : courbe de référence.

Le dosage des lipides : Il a été réalisé selon la méthode de (Goldsworthy & al., 1972)

Dans l'hémolymphe : Cette méthode consiste à additionner à 100µl de chaque échantillon, 1ml d'acide sulfurique concentré, le tout est chauffé dans un bain de sable à 100°C pendant 10min. Après refroidissement on prélève un aliquote de 100µL auquel on ajoute 2ml de vanilline. Après 30min à l'obscurité, on procède à la lecture des absorbances à une longueur d'onde de 530nm. La gamme d'étalonnage a été réalisé à l'aide d'un sérum lyophilisé Lyotrol « p » (biomerieuxfrance) titrant 4.29 g/l de lipides totaux.

Dans la chair : on prélève une fraction aliquote de 100 µl du surnageant 2 et le dosage consiste à additionner à l'échantillon 1ml d'acide sulfurique concentré. Le tout est chauffé dans un bain-marie a 100°C pendant 10 min. Après refroidissement, on prélève un aliquote de 100µl auquel est ajouté 2 ml de vaniline (0.38 g de vaniline, 55ml d'eau distillée, 195ml d'acide

orthophosphorique à 85%) Après 30min à l'obscurité on procède à la lecture des absorbances à une longueur d'onde de 530 nm (Fig.9).

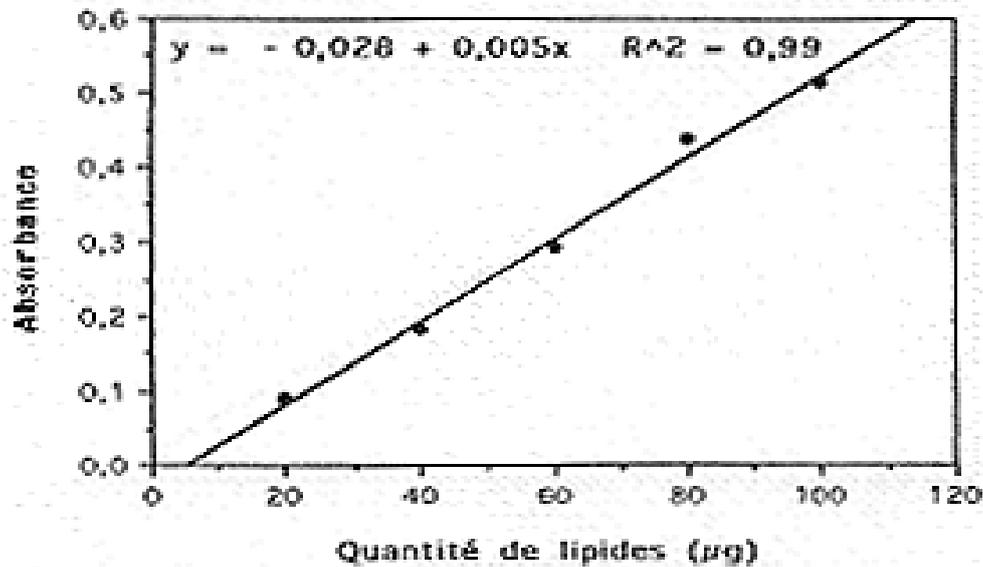


Figure 9 : Dosage des lipides : courbe de référence.

Le dosage des protéines : Elles sont dosées par la méthode de (Bradford, 1976)

Dans l'hémolymphe : 4ml de réactif le bleu brillant de coomassie sont additionnés à 100µl de chaque échantillon, la lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595nm en utilisant comme protéine standard l'albumine de sérum de bovin (Sigma).

Dans la chair : 1ml d'eau distillée est additionné au culot 2. Les protéines sont dosées dans une fraction aliquote de 100 µl en employant le bleu brillant de coomassie G250 (50 mg de BBC, 50ml d'acide orthophosphorique à 85 % (25 ml d'alcool 95% et 425 ml d'eau distillée). La lecture des absorbance s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm (fig.10)

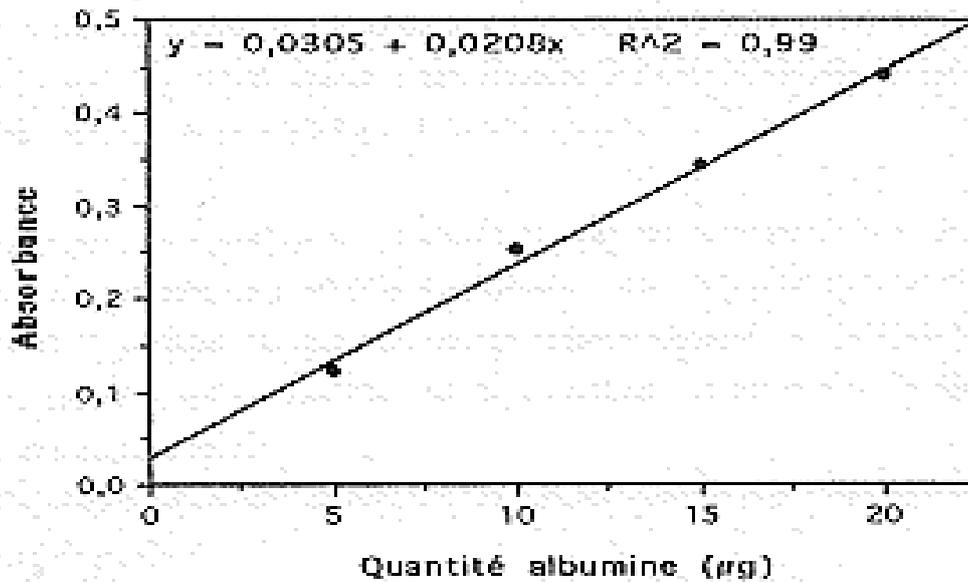


Figure 10 : Dosage des protéines : courbe de référence.

2.10. EXTRACTION ET ANALYSE DES RESIDUS PAR CLHP:

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) permet de séparer des constituants d'un mélange fondé sur leur adsorption sélective par des solides pulvérulents. Elle permet d'identifier et de quantifier des composés inconnus dans un mélange donné.

Le dimilin a été dilué dans l'eau de mer à une concentration de 10 µg/l de matière active et administré aux crevettes dès leur exuviation pendant 24 heures ou pendant toute la durée du cycle de mue. Les témoins sont élevés dans l'eau de mer seule.

Les résidus sont extraits de l'eau de mer à différents temps après traitement (une à deux semaines) dans des fractions aliquotes de 3 ml et dosés par HPLC selon (Soltani & *al.*, 1983).

Chaque échantillon est centrifugé (5000 trs, 10 min) et le surnageant est évaporé dans un bain marie à sec sous hotte aspirante et l'extrait sec est dissout dans 500 µl du mélange acétonitrile-eau (50/50). Des volumes de 20 µl de chaque échantillon sont injectés.

L'analyse est réalisée dans un chromatographe Beckman équipé de deux pompes Beckman, 114 solvants Delivery module, d'un injecteur normal Beckman 340 Organizer, d'un détecteur Beckman 160 à une longueur d'onde 254 nm, relié à une colonne Spherisorb ayant les caractéristiques suivantes ; longueur 15 cm, diamètre 4,6 mm et taille des particules 5 µm, qui a été utilisée avec un débit de 1 ml/min d'acétonitrile-eau (50/50) ; la pression est de 1.3 Kpsi. Il est également muni d'un Beckman 421 Controller relié à une imprimante KIPP et ZONEN-BD41. Les solvants utilisés sont l'acétonitrile pure pour purger l'appareil et l'acétonitrile-eau (50-50) comme éluant. Le standard utilisé est le diflubenzuron qui est la matière active (m.a)

pure de cette formulation commerciale. Différentes fractions aliquotes du standard (4-25µl) ont été injectées pour tester la linéarité de la réponse du détecteur et chaque extrait est analysé en double pour vérifier la reproductibilité.

2.11. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES :

Les données sont représentées par la moyenne \pm écart type (SD) établie sur un effectif ou un nombre de répétition précisée dans des tableaux. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel Minitab version 16 disponible au laboratoire de Biologie Animale Appliquée. Différents test ont été utilisés :

-Les moyennes des séries témoins et traités de *P. kerathurus* pour la composition biochimique ont été comparées deux à deux en utilisant le test « t » de Student avec un seuil de signification $p=0.05$.

-La composition de la cuticule au niveau des stades A, B, C et D des individus témoins et traités au dimilin a fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification suivie du test de Tukey.

-Et enfin, la détermination, de la droite de régression pour l'étude de la biochimie de la cuticule (protéine, lipide et glucide), en réalisant l'équation de la droite de régression, exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine, de tréhalose et de lyotrol standards.

RESULTATS

3. RESULTATS

3.1. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE LA CUTICULE :

La composition biochimique des différents constituants a été déterminée au niveau de la cuticule des crevettes. Ces taux en pourcentage ont été rassemblés au niveau du céphalothorax chez les individus témoins et traités. Cette méthode a été réalisée selon (Willender., 1974). Les résultats obtenus ont été effectués tout le long du cycle de mue pour les séries témoins ; alors que pour les traités le traitement a été effectué au début du cycle (stade A) et va durer 10 jours (jusqu'au stade C).

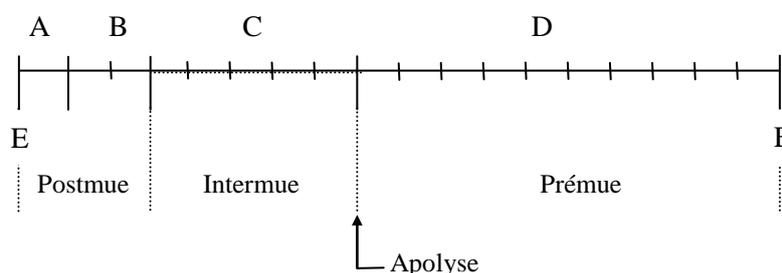


Figure 11 : Durée relative (en jours) des différents stades du cycle de mue de *P. kerathurus* (|—| = un jour). In Lechekhab., 2009.

3.1.1. EFFET SUR LE TAUX DE CHITINE CUTICULAIRE

Le tableau 2 résume les résultats de l'évolution du taux de chitine cuticulaire au cours d'un cycle de mue chez les animaux témoins. Ces résultats sont représentés graphiquement dans la figure 12.

Tableau 2. Taux (%) de chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez *P. kerathurus* témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).

Stades	A	B	C	D
Chitine (%)	27,56 ± 3,43	51,60 ± 13,16	52,42 ± 3,40	69,99 ± 12,28

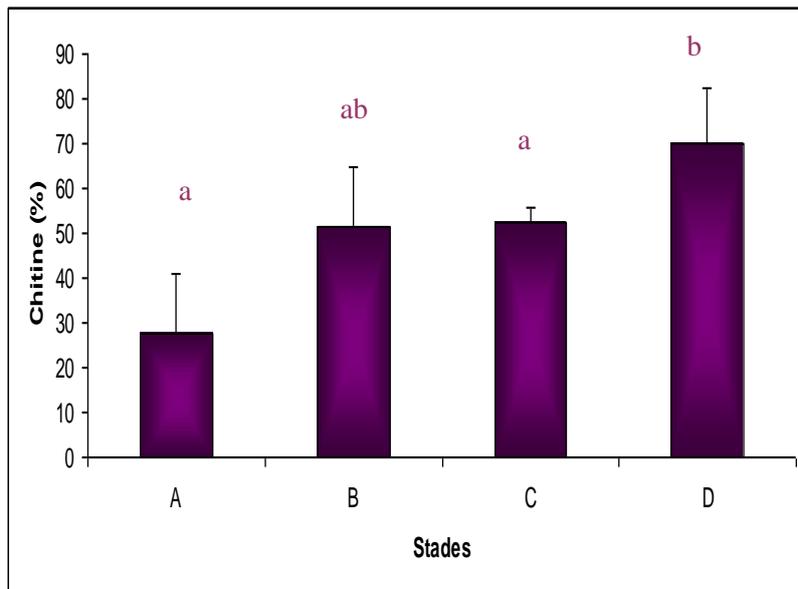


Figure 12 : Taux (%) de la chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez *P. kerathurus* témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$)

On constate que le taux de chitine augmente au cours de la période allant du stade A ($27,56 \pm 13,43 \%$) jusqu'au stade C pour atteindre une valeur de ($52,42 \pm 3,40 \%$).

A la veille de l'exuviation, c'est à dire au stade D, on observe par contre une augmentation du taux de la chitine ($69,99 \pm 12,28 \%$). L'analyse de la variance à un critère de classification sur les données de la chitine cuticulaire chez les crevettes témoins révèle qu'il y a une différence hautement significative ($P \leq 0,001$) entre les quatre stades du cycle de mue (Tableau 3).

Le test de Turkey indique qu'il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre le stade A et le stade B ; le stade A et le stade C, il y a une différence significative ($P < 0,05$) entre le stade A et le stade D et entre le stade B et le stade C, il n'y a pas de différence entre le stade B et le stade D et enfin il y a une différence significative entre le stade C et le stade D, représenté dans le tableau 4.

Tableau 3 : Taux (%) de la chitine dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoins. Analyse de la variance à un critère de classification.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F.obs	P
Stades	3	3586	1195	8,72	0,001***
Erreur résiduelle	15	2057	137		
Totale	18	5643			

(DDL: degré de liberté ; SCE: somme des carrés des écarts ; CM: carré moyen ; Fobs: F observé ; P: seuil de signification).

Tableau 4 : Taux (%) de chitine dans la cuticule des différents stades de mue chez *P. kerathurus* témoins. Test de Tukey: les moyennes suivies d'une même Lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Stades	Chitine (%)
A	27,56 ± 13,43 a
B	51,60 ± 13,16 ab
C	52,42 ± 3,40 a
D	69,99 ± 12,28 b

Tableau 5 : Effet du Dimilin sur le taux (%) de chitine dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez *P. kerathurus* témoins et traitées (m ± s, n = 3-4). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (P> 0,05).

Séries	Témoins	Traitées	P
Chitine (%)	52,42 ± 3,40 a	17,14 ± 4,11 b	0,000 ***

*** différence hautement significative.

Le taux de chitine cuticulaire déterminé au stade C chez les séries traitées au dimilin (25%PM) à une dose de 1µg/l a diminué de 17.14 ± 4.11% comparativement au taux de chitine des séries témoins qui est de 52,42 ± 3.40 % comme le montre le tableau 5. Le stade C, correspond à l'achèvement de la minéralisation et le dépôt des couches cuticulaires.

La comparaison des moyennes deux à deux concernant le taux de chitine avec le test « t » de Student, indique une réduction hautement significative (P=0.000) (Figure 13).

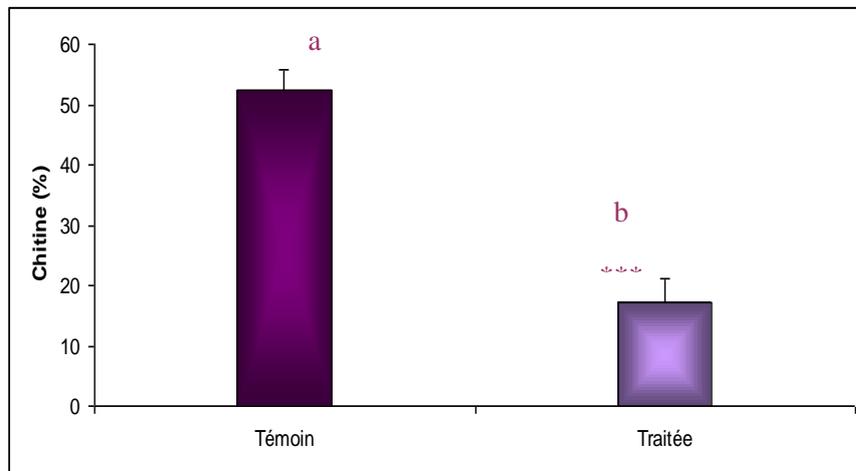


Figure 13. Effet du dimilin sur le taux (%) de chitine dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez *P. kerathurus* témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$).

3.1.2. EFFET SUR LE TAUX DE PROTEINES CUTICULAIRES

L'évolution du taux des protéines cuticulaires au cours d'un cycle de mue est mentionnée dans le tableau 6 et la figure 14.

Tableau 6 : Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoin ($m \pm s$, $n = 3-4$).

Stades	A	B	C	D
Protéines (%)	72,45 ± 13,43	48,40 ± 13,16	47,58 ± 3,41	29,13 ± 11,33

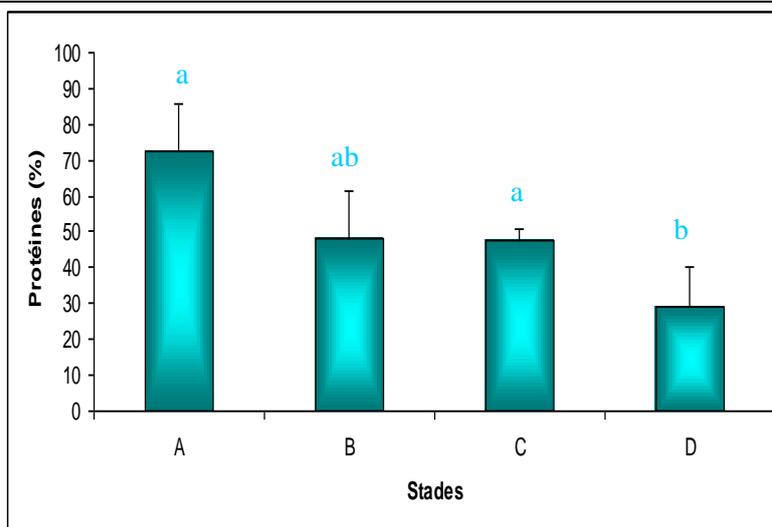


Figure 14. Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoin ($m \pm s$, $n = 3-4$).

On remarque que les taux les plus élevés sont enregistrés au cours des stades A (72,45 \pm 13,43%) et B (48,40 \pm 13,16%) c'est à dire au cours de la post- mue. Puis les taux diminuent au stade C (47,58 \pm 3,41%) c'est à dire à l'intermue, pour atteindre au stade D (29,13 \pm 11,33%) c'est à dire en prémue. L'analyse de la variance à un critère de classification montre qu'il y a une différence significative ($P \leq 0.001$) entre les différents stades A, B, C, D des séries témoins comme le montre le tableau 6.

Tableau 7. Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoin. Analyse de la variance à un critère de classification.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Stades	3	3787	1262	10,32	0,001***
Erreur résiduelle	15	1834	122		
Totale	18	5621			

Par contre le test de TUKEY révèle qu'il n'y a pas de différences significatives ($P \geq 0,05$) entre le stade A et le stade B, le stade A et le stade C, il y a une différence significative ($P < 0,05$) entre le stade A et le stade D et entre le stade B et le stade C, il n'y a pas de différence entre le stade B et le stade D et enfin il y a une différence significative entre le stade C et le stade D comme le montre le tableau 8.

Tableau 8 : Taux (%) de protéines dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoins. Test de Turkey: les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Stades	Protéines (%)
A	72,45 ± 13,43 a
B	48,40 ± 13,16 ab
C	47,58 ± 3,41 a
D	29,13 ± 11,33 b

En ce qui concerne les séries traitées on observe une nette augmentation du taux des protéines (82,87±4,11%) comparativement aux séries témoins (47,58±3,41%) comme le montre le tableau 9.

Tableau 9 : Effet du dimilin sur le taux (%) de protéines dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez *P. kerathurus* témoins et traitées (m ± s, n = 3-4). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (P> 0,05)

Séries	Témoins	Traitées	P
Protéines (%)	47,58 ± 3,41 a	82,87 ± 4,11 b	0,000 ***

Le test *t* de Student indique que le dimilin provoque une augmentation hautement significative (p=0,000) de ce taux (figure 15).

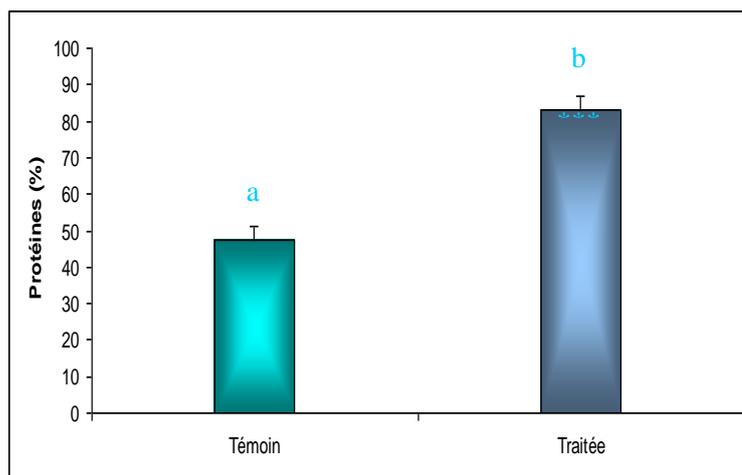


Figure 15. Effet du dimilin sur le taux (%) de protéines dans la cuticule à l'intermue (stade C) chez *P. kerathurus* témoins et traitées (m ± s, n = 3-4). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (P> 0,05).

3.1.3. SUR EFFET SUR LE TAUX DES SELS CALCIQUES :

Le tableau 10 et la figure 16 montrent les résultats de l'évolution du taux des sels calciques cuticulaires au cours d'un cycle de mue chez les animaux témoins.

Tableau 10 : Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades de mue chez *P. kerathurus* témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).

Stades	A	B	C	D
Sels calciques (%)	47,16 ± 2,35	65,87 ± 7,61	61,13 ± 2,69	62,86 ± 5,43

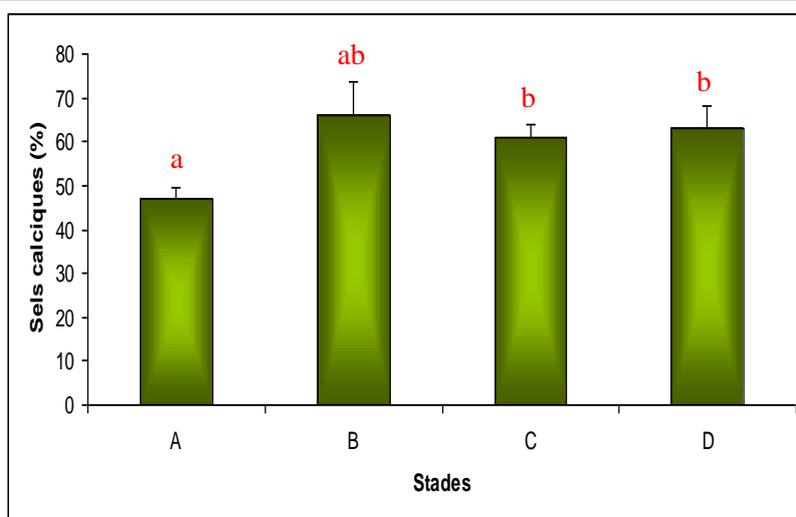


Figure 16 : Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoins ($m \pm s$, $n = 3-4$).

Le taux des sels calciques, au stade A qui est de $47,16 \pm 2,3\%$ est le plus faible. Il atteint au stade B $65,87 \pm 7,61\%$ et il diminue au stade C pour atteindre une valeur de $61,13 \pm 2,69\%$. On a remarqué qu'au stade D une légère augmentation qui est de $62,86 \pm 5,43\%$.

L'analyse de la variance à un critère de classification au niveau des différentes valeurs obtenues au cours du cycle de mue chez les séries témoins indique une différence significative ($P = 0,008$). Le test de Turkey indique qu'il n'y a pas de différence ($P > 0,05$) significative entre le stade A et le stade B, il y a une différence significative ($P < 0,05$) entre le stade A et le stade C et le stade A et le stade D, pas de différence significative entre le stade B et le stade C, le stade B et le stade D et entre le stade C et le stade D respectivement comme le montre le tableau 11.

Le taux de sels calciques chez les séries traitées ne varie pas significativement ($64,09 \pm 6,83\%$ par rapport aux taux des séries témoins ($61,13 \pm 2,69\%$) tableau 10.

Tableau 11. Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoins. Analyse de la variance à un critère de classification

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Stades	3	489,0	163,0	5,68	0,008 **
Erreur résiduelle	15	430,6	28,7		
Totale	18	919,6			

Tableau 12. Taux (%) des sels calciques dans la cuticule des différents stades d'un cycle de mue chez *P. kerathurus* témoins. Test de Turkey: les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5

Stades	Sels calciques (%)
A	47,16 ± 2,35 a
B	65,87 ± 7,61 ab
C	61,13 ± 2,69 b
D	62,86 ± 5,43 b

Tableau 13. Effet du dimilin sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule à l'intermue chez *P. kerathurus* témoins et traitées (m ± s, n = 3-4). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différents (P> 0,05).

Séries	Témoins	Traitées	P
Sels calciques (%)	61,13 ± 2,69 a	64,09 ± 6,83 a	0,474

La comparaison des valeurs moyennes obtenues chez les séries témoins et traitées montre que l'insecticide n'a aucun effet significatif (P>0,05) sur le taux des sels calciques par rapport aux témoins (*figure17*)

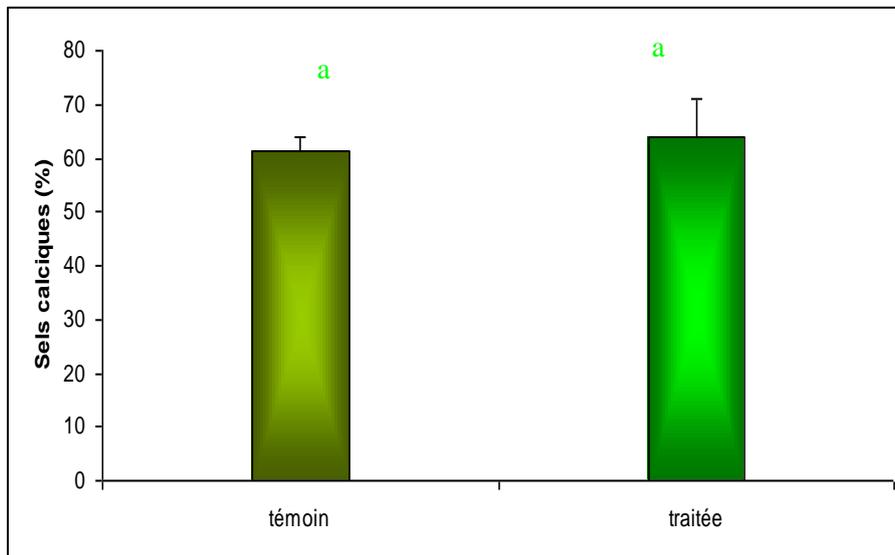


Figure 17. Effet du dimilin sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule à l'intermue chez *P. kerathurus* témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

3.2. EPAISSEUR ET STRUCTURE FINE DE LA CUTICULE :

3.2.1. ETUDE DU TEGUMENT EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE :

L'azan est un colorant topographique qui permet une coloration différentielle des différentes couches cuticulaires. Les coupes histologiques de la cuticule au stade B apparaissent constituées de deux parties la cuticule pré- exuviale formée elle même de l'épicuticule, qui est une mince couche colorée en rouge et la couche pigmentaire en gris clair, par contre la couche post- exuviale est composée de la couche principale en gris-bleu, au même titre que la couche membranaire.

La figure 18.B représente une coupe histologique du tégument au stade D chez les individus témoins. Elle est composée de 4 couches qui sont comme suit, l'épi cuticule, la couche pigmentaire, la couche principale et enfin la couche membraneuse.

En condition normale l'épaisseur totale de la cuticule de *P. kerathurus* augmente progressivement au cours du cycle de mue (Tableau 14).

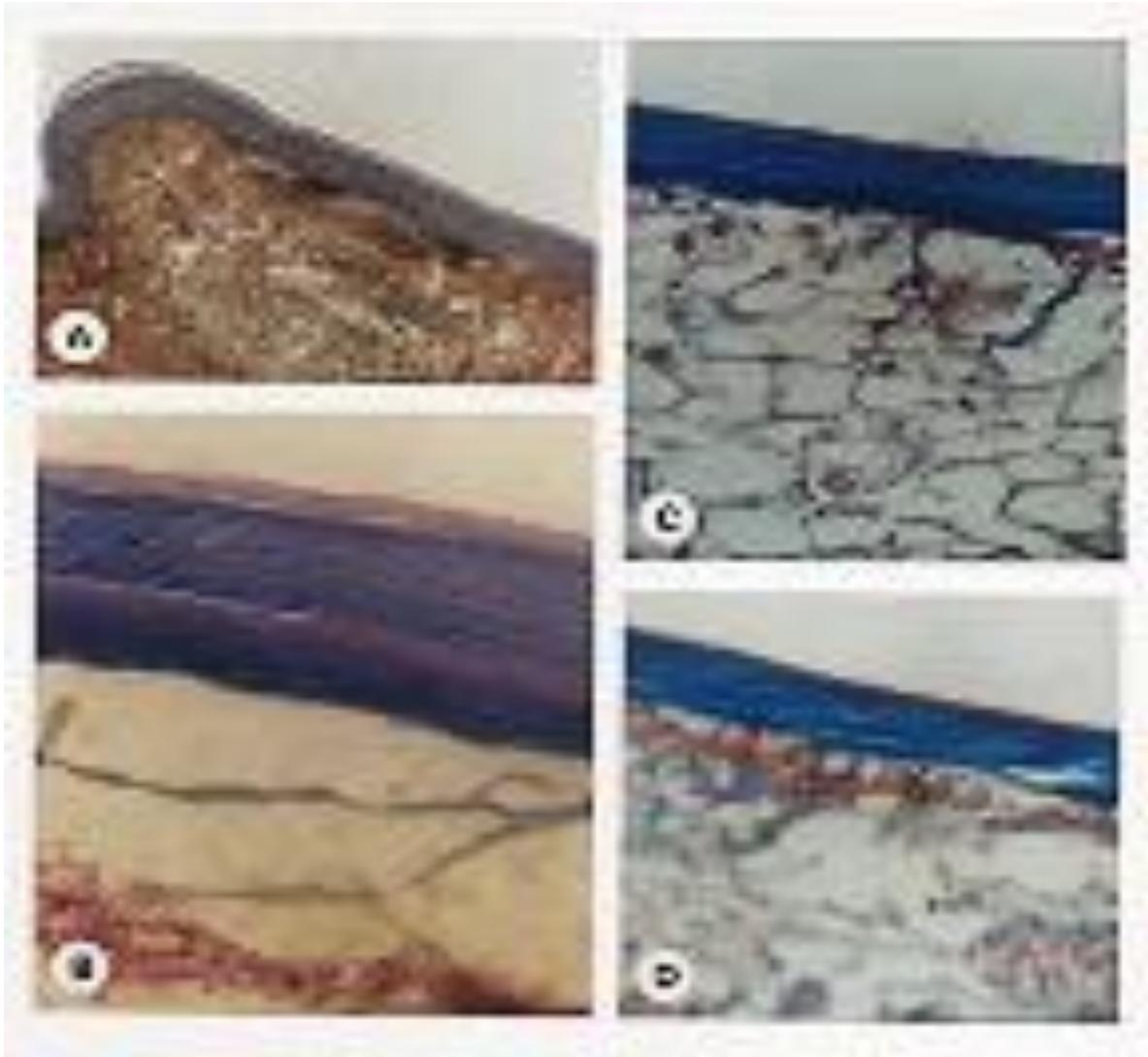


Figure 18. Coupes histologiques observées au microscopie photonique chez *Penaeus kerathurus* témoins et traités au dimilin. (**Fig A** : Vue générale du tégument au stade B, montrant de l'extérieur vers l'intérieur l'epicuticule, la couche pigmentaire et la couche principale « x253 » ; **Fig B** : Vue générale du tégument au stade D, montrant l'ancienne cuticule avec les différentes couches apolysées au dessus de l'épiderme « x420 » ; **Fig C** : Vue générale du tégument en fin du stade B, après traitement continu avec une dose de 1µg/l de Dimilin. On observe la couche pigmentaire et la couche principale (x372) ; **Fig D** : Vue générale du tégument en fin du stade B traité au dimilin pendant 24h avec une dose de 10µg/l . La couche secrétée comporte la couche pigmentaire et la couche principale « x328 »).

Après traitement au dimilin, on observe au niveau de la cuticule au stade B (post-exuviale), une structure certes homogène mais la lamellation est irrégulière et lâche, comparativement au témoin du même stade. La cuticule sécrétée comprend une épicuticule, une couche pigmentaire et enfin une couche principale très mince, et enfin une couche membraneuse (Figure 18 C et D).

Les résultats montrent que l'insecticide n'affecte pas significativement ($p > 0.27$) l'épaisseur de la couche pigmentaire. Par contre, il réduit significativement l'épaisseur de la couche principale ($p = 0.0082$) seulement dans le cas d'un traitement continu ($1 \mu\text{g/l}$) et l'épaisseur de la couche membraneuse avec les deux types de traitement ($p = 0.0017$ pour le traitement pendant 24h ; $p = 0.0082$ pour le traitement continu) comparativement aux témoins. La réduction de l'épaisseur est plus intense dans le cas du traitement continu (Tableau 14).

Tableau 14 : Epaisseur (μm) des différentes couches cuticulaires mesurés à la fin de la post-mue chez *Penaeus kerathurus* témoins et traités au diflubenzuron ($m \pm s$, $n = 3-4$). Les valeurs d'une même couche affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$).

Couches	Témoins	Dimilin ($1 \mu\text{g/l}$, 24h)	Dimilin ($1 \mu\text{g/l}$, continu)
Pigmentaire	8.0 ± 0.6 a	7.8 ± 0.8 a	7.6 ± 0.9 a
Principale	14.8 ± 0.8 a	13.8 ± 0.6 a.b	11.3 ± 1.2 b
Membraneuse	24.6 ± 2.1 a	16.9 ± 2.4 b	7.5 ± 1.5 c
Totale	47.4 ± 1.2 a	38.5 ± 1.3 b	26.4 ± 1.6 c

3.2.2. ETUDE DE LA STRUCTURE FINE DE LA CUTICULE

L'observation au microscope électronique à transmission de la cuticule de *P. kerathurus* au stade fin B, montre une épicuticule, couche superficielle et mince, une procuticule chitino-proteique, plus épaisse formée de trois couches qui sont la couche pigmentaire, la couche principale et quelques lamelles de la couche membraneuse en lames de sécrétion. En ce qui concerne les deux couches les plus profondes (la couche principale et la couche membraneuse), elles sont formées de lamelles. L'épaisseur des lamelles croît de l'extérieur vers l'intérieur au niveau de la couche principale. Ces lamelles sont dans l'ensemble plus épaisses et moins membraneuses que celles de la couche membraneuse (Figure 19.A).

Les mensurations des épaisseurs des différentes couches cuticulaires chez les individus témoins sont résumées dans le tableau 14.

La couche pigmentaire paraît non lamellée. Le nombre de lamelles de la couche principale varie de 5 à 7 avec chacune une épaisseur de 2 à $6 \mu\text{m}$. La couche membraneuse est formée

d'environ 48 lamelles, dont la plus épaisse mesure $2\mu\text{m}$, avec une architecture du type hélicoïdale.

La figure 19, C nous montre le tégument au stade D, avec la présence de toutes les couches cuticulaires. L'épaisseur de la cuticule témoin est d'environ $43.75\mu\text{m}$. On observe un début d'Apolyse. L'ancienne cuticule se détache de l'épiderme. L'espace exuvial commence à se former.

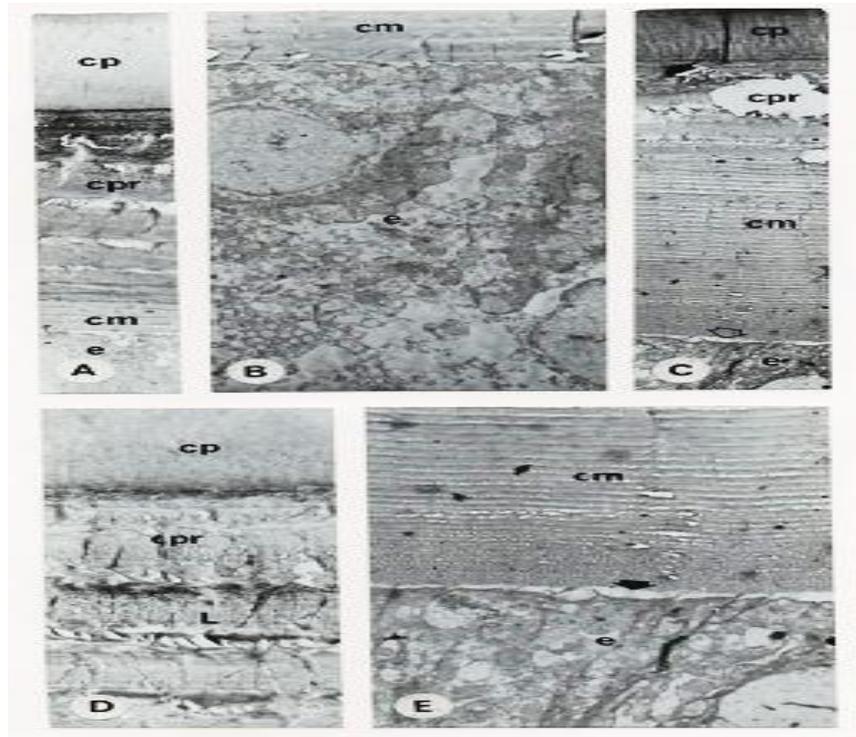


Figure 19 : Observation en microscopie électronique à transmission de la cuticule de *Penaeus kerathurus* témoin. (**Fig.A :** vue générale du tegument au stade B avancé La cuticule secrétée par l'épiderme (e) est composée de couche pigmentaire (c,p), de la couche principale(c,pr) et quelques lamelles de la couche membraneuse (c,m) (x 4000). **Fig. B :** vue agrandie du tégument au stade B avancé montrant une partie de la couche cuticulaire profonde (C.m) et l'épiderme adjacent (e) (x5600). **Fig. C :** vue d'ensemble du tégument au stade D. Les différentes couches cuticulaires sont complètement mise en place (C.P : couche pigmentaire, C.Pr : couche principale, C.m : couche membraneuse). On observe un début d'apolyse (flèche) et la cuticule est légèrement décollée de l'épiderme(e) (x2400).**Fig. D :** Vue agrandie du tégument au stade D montrant une partie de la couche pigmentaire(C.P) et quelques lamelles(L) de la couche principale(C.Pr) (5600). **Fig.E :** vue agrandie du tégument au stade D montrant les couches profondes de la couche membraneuse(C.m) décollée (flèche) de l'épiderme (e) (x5600).

Au niveau architectural, on a une distribution des fibrilles assez homogène de la couche principale ; La cuticule présente une orientation hélicoïdale (Figure 19, D). Au stade D on assiste à un début de dégradation des lamelles les plus profondes de la couche membraneuse. On voit bien le début de l'apolyse avec le décollement de l'épiderme des couches cuticulaires profondes (Figure 20, E et F).

Au niveau de la figure 19,C on retiendra le décollement de l'ancienne cuticule de l'épiderme ménageant ainsi un espace exuvial important où s'édifiera la nouvelle cuticule avec deux couches, une sombre qui est l'epicuticule et une claire, plus épaisse qui est la couche pigmentaire, reposant sur l'épiderme (Figure 20,G).

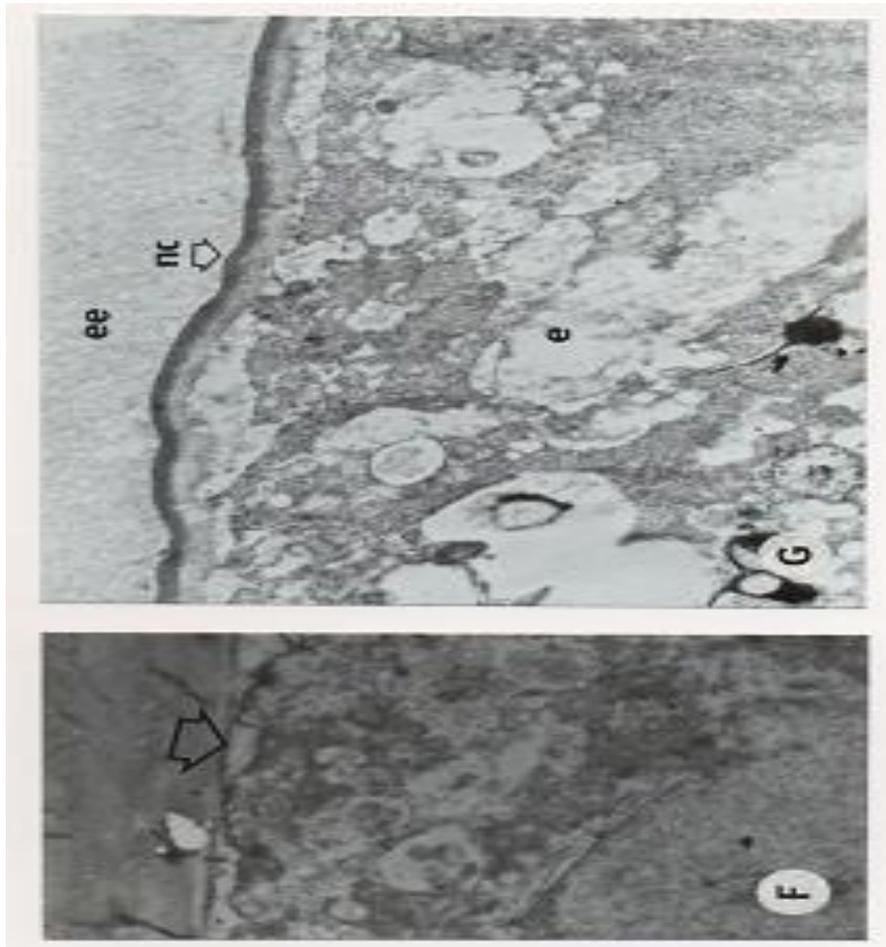


Figure20 : Observation en microscopie électronique à transmission de la cuticule de *Penaeus Kerathurus* témoin. **Fig.F** : Détail du tégument au stade D, montre le début d'apolyse (flèche) (x12800). **Fig.G** : Tégument au stade D, on observe sous l'espace exuvial (e-e) la nouvelle cuticule (n.c) sécrétée par l'épiderme(e) (x12800).

Les crevettes sont traitées dès l'exuviation au dimilin avec deux doses différentes 1µg et 10µg. Le traitement se fait soit durant 24heures, soit pendant toute la durée du cycle de mue. Au moment du traitement la cuticule pré-exuviale est déjà en place.

Le tégument, au stade B avancé après traitement au dimilin avec une dose de 1µg/l pendant 24heures, montre une diminution de l'épaisseur de la cuticule en comparaison avec celle des témoins. L'épaisseur totale de la cuticule est de l'ordre de 38.12µm. L'aspect structural n'a pas changé du point de vu du nombre de lamelles sauf pour la couche membraneuse qui compte entre 16 et 18 lamelles. Son épaisseur est de 27µm, comparativement à celle des témoins qu'est de 40µm avec un nombre de lamelles qui varie entre 46 et 48 lamelles (Figure 21.A). L'aspect architectural de la cuticule traitée avec une dose de 1µg/l paraît normal. Le traitement du tégument au dimlin pendant 24heures avec une dose de 10µg/l montre une diminution au niveau de la couche membraneuse (Figure 21.B et C).L'architecture des couches principale et membraneuse paraît perturbée, en effet les fibrilles sont peu visibles (Figure21, D).

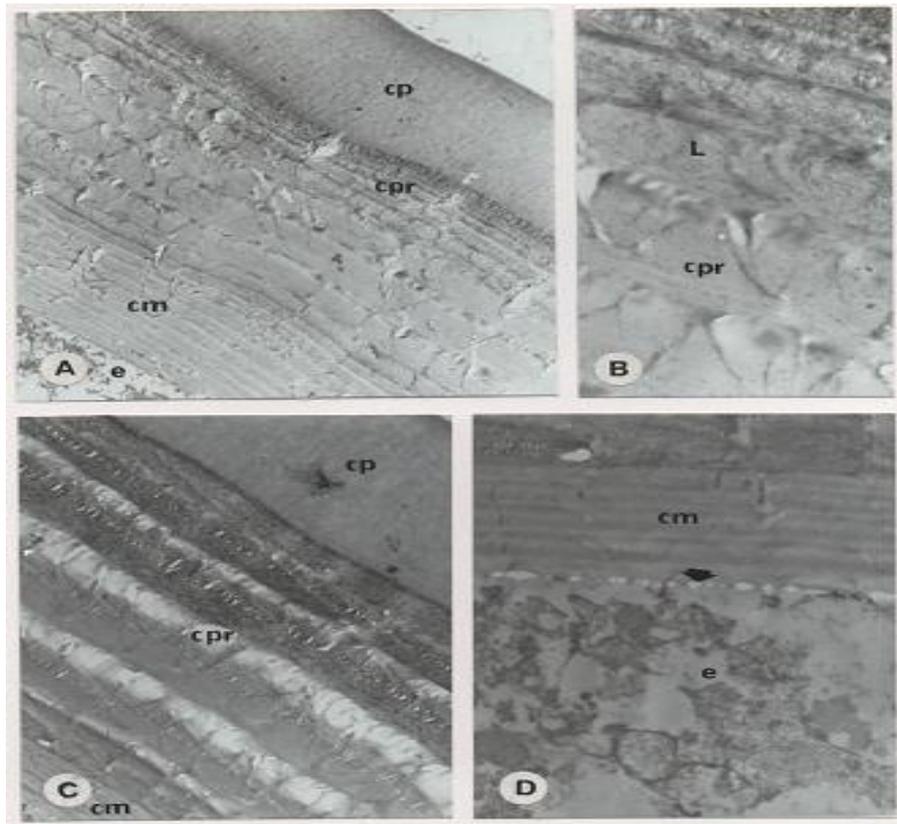


Figure 21, A, B, C, D : Observation en microscopie électronique à transmission chez *Penaeus kerathurus* traité au dimilin pendant 24 heures. **Fig.A :** Vue d'ensemble du tégument au stade B après traitement au dimilin (1 µg m.a /l pendant 24 heures). La cuticule membraneuse (C.m) a moins de lamelles que les témoins (e : épiderme, C.P : couche pigmentaire, C.Pr : couche principale, C.m : couche membraneuse) (x2400). **Fig.B :** Vue agrandie du tégument au stade B après traitement au dimilin (1 µg/l de m.a pendant 24 heures) montrant les couches profondes de la cuticule (C.m) et l' épiderme (e) (x5600). **Fig.C :** Une partie de la cuticule (C.P : couche pigmentaire, C.Pr : couche principale) d'un tégument au stade B après traitement pendant 24 heures avec une dose de 10 µg m.a/l de dimilin (x5600). **Fig.D :** Cuticule Agrandie d'un tégument au stade B après traitement avec 10 µg/l pendant 24 heures. L'architecture des lamelles (L) de la couche principale paraît perturbée (x5600).

Traitement continu :

Le tégument après traitement continu au dimilin avec une dose de $1\mu\text{g/l}$ montre au stade B avancé, une cuticule avec ces quatre couches. La couche membraneuse compte environ 14 lamelles. L'épaisseur totale de la cuticule traitée est de $25.62\mu\text{m}$. Elle est beaucoup moins épaisse en comparaison avec la cuticule témoins dont l'épaisseur est d'environ $43.75\mu\text{m}$ (Tableau 14 et Figure 22.A).

Les lamelles de la couche principale paraissent perturbées avec des parties claires et d'autres sombres. L'étude ultra-structurale révèle que l'architecture des lamelles est modifiée ; La lamellation n'est pas assez nette et les fibrilles sont désorientées (Figure 22.B et C).

La figure 22.D, montre le détail d'un tégument au stade D, après traitement continu avec une dose de $1\mu\text{g/l}$. La couche membraneuse est réduite et les fibrilles sont peu visibles. On observe à la base de cette cuticule un matériel clair aux électrons. Cette couche n'a pas subi de dégradation car l'apolyse n'a pas eu lieu. Dans notre cas l'épaisseur des différentes couches cuticulaires est réduite en comparaison avec celle de la cuticule témoin comme le montre la figure 21.A et le tableau 14.

En ce qui concerne la cuticule après traitement continu au dimilin avec une dose de $10\mu\text{g/l}$, montre que les individus meurent justes après l'exuviation.

En résumé, on peut constater que chez les crevettes traitées ($1\mu\text{g/l}$) pendant 24heures, le tégument au stade B avancé montre une diminution de l'épaisseur de la cuticule par rapport aux témoins et au niveau structural, les couches principale et membraneuse présentent un nombre réduit de lamelles avec une épaisseur plus faible comparativement aux témoins (Figure 22.A). Le traitement pendant 24h à la dose de $1\mu\text{g/l}$, induit une diminution des couches cuticulaires, particulièrement de la couche membraneuse, et les fibrilles sont peu visibles (Figure 22.B). Chez les individus traités de manière continue à la dose de $1\mu\text{g/l}$ on observe une réduction de l'épaisseur de la cuticule et une modification de l'architecture des couches les plus profondes (Figure 22.C)

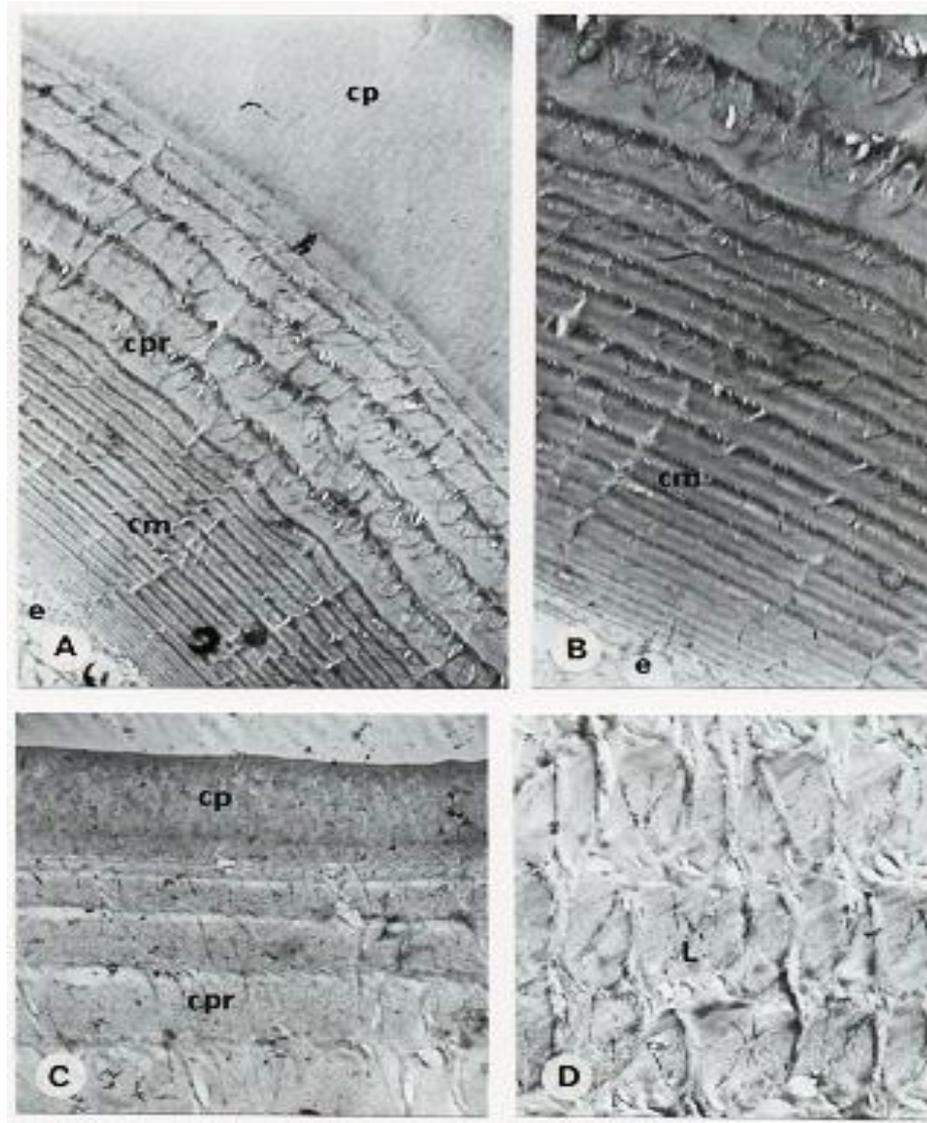


Figure 22, A, B, C, D : Observation en microscopie électronique à transmission chez *Penaeus kerathurus* après traitement continu au dimilin avec une dose de $1\mu\text{g/l}$. **Fig.A :** Vue d'ensemble du tégument au stade B.L'épaisseur de la cuticule membraneuse (C.m) est réduite (C.P : couche pigmentaire, C.Pr : couche principale, e : épiderme) (x4000). **Fig.B :** La couche principale agrandie (C.Pr) au stade B montrant des lamelles (L) avec architecture apparemment normale(x12800). **Fig.C :** Cuticule au stade D. La couche membraneuse (C.m) est peu épaisse (C.P : couche pigmentaire, C.Pr : couche principale) (x5760). **Fig.D :** Détail du tégument au stade D, montrant la couche membraneuse réduite (C.m) et non apolysée. Un matériel clair aux électrons (flèche) est sécrété à l'apex de l'épiderme (e : épiderme) (x12800).

3.3. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE L'HEMOLYMPHE ET DE LA CHAIR :

3.3.1. EFFET DU TRAITEMENT SUR LES PROTEINES HEMOLYMPHATIQUES :

Les résultats concernant l'évolution des concentrations des protéines dans l'hémolymphe, au cours d'un cycle de mue chez *Penaeus kerathurus* sont mentionnés dans le tableau 15.

Chez les séries témoins, la concentration des protéines hémolympatiques a augmenté au cours d'un cycle de mue, du stade A au stade D, avec des valeurs allant respectivement de $24,41 \pm 2,07$ à $85,22 \pm 3,15$ mg/ml. On constate que cette augmentation est significative entre les stades C ($P=0,0853$) et D ($P=0,0265$).

Par contre les séries traitées présentent un profil similaire que celui des témoins durant le cycle de mue avec néanmoins une hausse marquée aux stades C et D comparativement à la série témoin.

Tableau 15 : Evolution des concentrations des protéines totales hémolympatiques chez *P.kerathurus* témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm SD$, $n=3-4$) ; les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P > \text{ou} < 0,05$).

Stades	Témoins	Dimilin (1 μ g/l)	P
A	$24,41 \pm 2,07$ a	$18,14 \pm 5,09$ a	0,1187
B	$27,48 \pm 2,91$ a	$31,20 \pm 8,01$ a	0,4953
C	$56,90 \pm 2,12$ a	$62,64 \pm 5,20$ a	0,0853
D	$85,22 \pm 3,15$ a	$95,07 \pm 6,00$ b	0,0265

On constate qu'il y'a une différence significative au stade D ($p= 0,0265$) respectivement entre les témoins et les traités ($95 \pm 6,00$ mg/ml, $85 \pm 22 \pm 3,15$ mg/ml).

3.3.2 EFFET DU TRAITEMENT SUR LES GLUCIDES ET HEMOLYMPHATIQUES :

- Lors du dosage des glucides dans l'hémolymphe chez les témoins de *P.kerathurus*, on a pu constater une augmentation progressive allant du stade A pour atteindre un maximum au stade C avec une valeur de $9,46 \pm 1,84$ mg/ml, ensuite on remarque une légère baisse au stade D avec une valeur de $8,78 \pm 2,90$ mg/ml.

Chez les séries traitées, on remarque un pic des concentrations glucidiques hémolympatiques au stade C avec une valeur de $12,37 \pm 0,96$ mg/ml. En outre, les valeurs enregistrées lors du stade C ($p = 0,032$) et le stade D ($p = 0,0274$) sont significativement plus élevés dans les séries traitées par rapport aux séries témoins.

Tableau 16 : Evolution des concentrations des glucides totaux hémolympatiques chez *P.kerathurus* témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm SD$, $n = 3 - 10$; les moyennes affectées de lettres différentes d'un même lettre ne sont pas significativement différentes $P > 0,05$).

Stades	Témoins	Dimilin (1 μ g/l)	P
A	7,27 \pm 1,42 a	5,36 \pm 0,19 a	0,2309
B	8,45 \pm 0,33 a	8,47 \pm 4,73 a	0,8400
C	9,46 \pm 1,84 a	12,37 \pm 0,96 b	0,0032
D	8,78 \pm 1,90 a	11,37 \pm 2,00b	0,0274

3.3.3. EFFET DU TRAITEMENT SUR LES LIPIDES HEMOLYMPHATIQUES :

- Les concentrations des lipides hémolympatiques chez les séries témoins au cours d'un cycle de mue présentent un pic au stade C (10,99 \pm 0,74 mg/ml) (tableau 17).

Par contre chez les traitées, ces concentrations lipidiques montrent une augmentation progressive durant le cycle de mue qui présente un pic maximale de 14,68 \pm 1,27 mg/ml au stade D. On enregistre une différence significative au stade B ($p = 0,0038$) et D ($p = 0,0001$) entre les témoins et les traités.

Tableau17 : Evolution des concentrations des lipides totaux hémolympatiques (mg/ml) chez *P.kerathurus* témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm SD$, $n = 3 - 9$) ; les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P >$ ou $<$ 0,05).

Stades	Témoins	Dimilin (1 μ g/l)	P
A	8,42 \pm 0,92 a	10,71 \pm 3,13 a	0,2911
B	9,55 \pm 0,57 a	12,62 \pm 1,17 b	0,0038
C	10,99 \pm 0,74 a	12,79 \pm 2,23 a	0,1650
D	9,19 \pm 1,49 a	14,68 \pm 1,27 b	0,0001

3.3.4 EFFET DU TRAITEMENT SUR LES PROTEINES DANS LA CHAIR :

Le taux de protéines au niveau de la chair chez les témoins varie au cours du cycle de mue. Ce taux augmente du stade A (29,20 mg/g) jusqu'au stade C (76,80mg/g), pour diminuer au stade D (66,80 mg/g) (tableau 27). L'évolution du taux de protéines chez les séries traitées présente également une augmentation jusqu'au stade C (75,35 mg/g) et une légère diminution au stade D (72,80 mg/g). Cependant, il n'y'a pas de différence significative ($p > 0,05$) au niveau de tout les stades du cycle de mue chez les séries témoins et traitées. (tableau 18).

Tableau 18 : Evolution des protéines totales (mg/g) dans la chair chez *P.kerathurus* témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm SD$, $n = 3 - 7$) ; les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > \text{ou} < 0,05$).

Stades	Témoins	Dimilin (1 μ g/l)	P
A	29,20 \pm 8,60 a	29,45 \pm 4,90 a	0,0810
B	45,75 \pm 9,45 a	40,85 \pm 4,22a	0,3829
C	76,80 \pm 9,20 a	75,35 \pm 6,25 a	0,2231
D	66,80 \pm 6,30 a	72,80 \pm 5,30a	0,0752

3.3.5 EFFET DU TRAITEMENT SUR LES GLUCIDES DANS LA CHAIR :

- Le taux des glucides dans la chair chez les témoins au cours du cycle de mue ne varie pas significativement au cours du temps. Les valeurs varient entre un minimum de 7,72 mg/g au stade A et un maximum de 8,69 mg/g au stade C. après traitement ces taux augmentent légèrement, notamment aux stades B et C. Il y'a une différence significative ($p = 0,0139$) entre les séries témoins et traitées avec une valeur maximale enregistrée au stade C (tableau 19).

Tableau 19 : Evolution des taux des glucides totaux (mg/g) dans la chair chez *P.kerathurus* témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm SD$, $n = 3 - 6$) ; les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > \text{ou} < 0,05$).

Stades	Témoins	Dimilin (1 μ g/l)	P
A	7,72 \pm 1,00 a	7,85 \pm 0,85 a	0,3155
B	8,32 \pm 1,80 a	10,05 \pm 1,25 a	0,1638
C	8,69 \pm 0,74 a	10,67 \pm 1,48 b	0,0169
D	7,83 \pm 1,18 a	6,30 \pm 0,59 b	0,0169

3.3.6 EFFET DU TRAITEMENT SUR LIPIDES DANS LA CHAIR :

- Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 20, montrant que le taux des lipides au niveau de la chair de *P.kerathurus* témoins présente un pic au stade C (11,04 mg/g). Ce taux diminue à la veille de l'exuviation (stade D = 10,88 mg/g). Chez les individus traités, ce pic est avancé au stade (B = 15,91 mg/g). ce traitement provoque une élévation des taux de lipides au cours du cycle de mue en comparaison avec les séries témoins. Cependant cette augmentation est significative ($p < 0,05$) seulement au stade C.

Tableau 20 : Evolution des taux de lipides (mg/g) dans la chair chez *P.kerathurus* témoins et traités au cours d'un cycle de mue ($m \pm SD$, $n = 3 - 6$) ; les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > \text{ou} < 0,05$).

Stades	Témoins	Dimilin (1 μ g/l)	P
A	8,84 \pm 2,00 a	9,08 \pm 2,00 a	0,1400
B	10,27 \pm 1,38 a	15,91 \pm 1,07 a	0,0011
C	11,04 \pm 2,99 a	15,01 \pm 1,07 b	0,0428
D	10,88 \pm 3,14 a	13,02 \pm 2,13 a	0,1548

3.4. ANALYSE DES RESIDUS DU DIMILIN PAR H.P.L.C :

3.4.1. SPECTRE D'ABSORPTION DU STANDARD :

En vue de préciser la longueur d'onde d'absorption de la molécule à analyser par HPLC, un spectre d'absorption en lumière ultraviolette a été réalisé (Tableau 21 et Figure 23). Le spectre donne deux longueurs d'onde maximale qui sont 210.5 et 259.5nm.

Tableau 21 : Spectre d'absorption du diflubenzuron : Absorbance en fonction de la longueur d'onde

Pic	Absorbance	Longueur d'onde (nm)
1	2.571	210.5
2	2.360	259.5

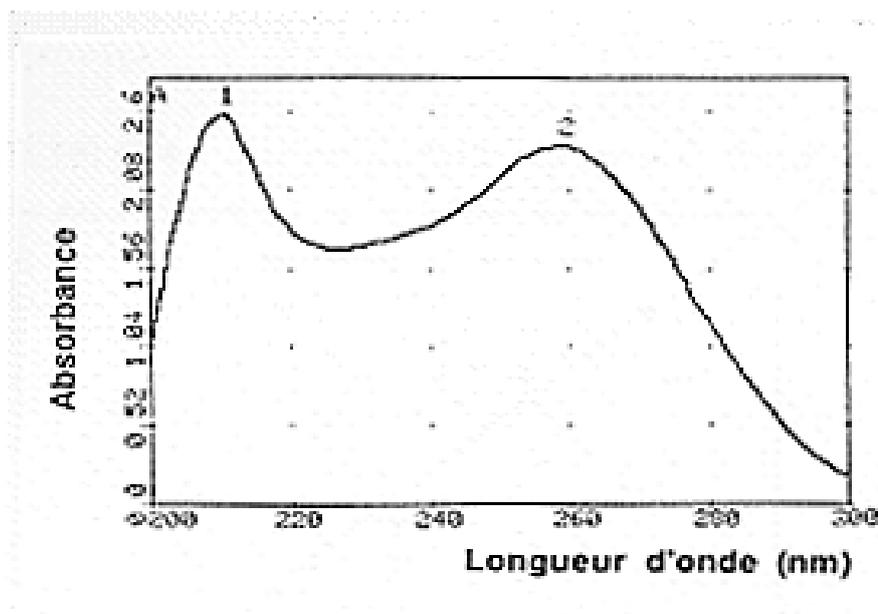


Figure 23 : Spectre d'absorption du diflubenzuron : absorbance en fonction de la longueur d'onde.

3.4.2. LINEARITE DE LA REPONSE DU DETECTEUR U.V :

La réponse du détecteur U.V de l'appareillage HPLC a été testée. Les résultats exprimant la quantité du standard en fonction de l'aire du pic en unité arbitraire (U.A) de l'intégrateur montrent que le détecteur présente une réponse linéaire au DFB dans l'intervalle 20 µg jusqu'à 250 µg (Tableau 22 et Fig. 24).

Tableau 22 : Réponse du détecteur U.V de l'HPLC : quantité (µg) du standard (diflubenzuron en fonction de l'aire du pic (UA= unité arbitraire).

Quantité du standard (µg)	Aire du pic (U.A)
20	30000
50	72000
100	214602
150	330981
200	556518
250	651884

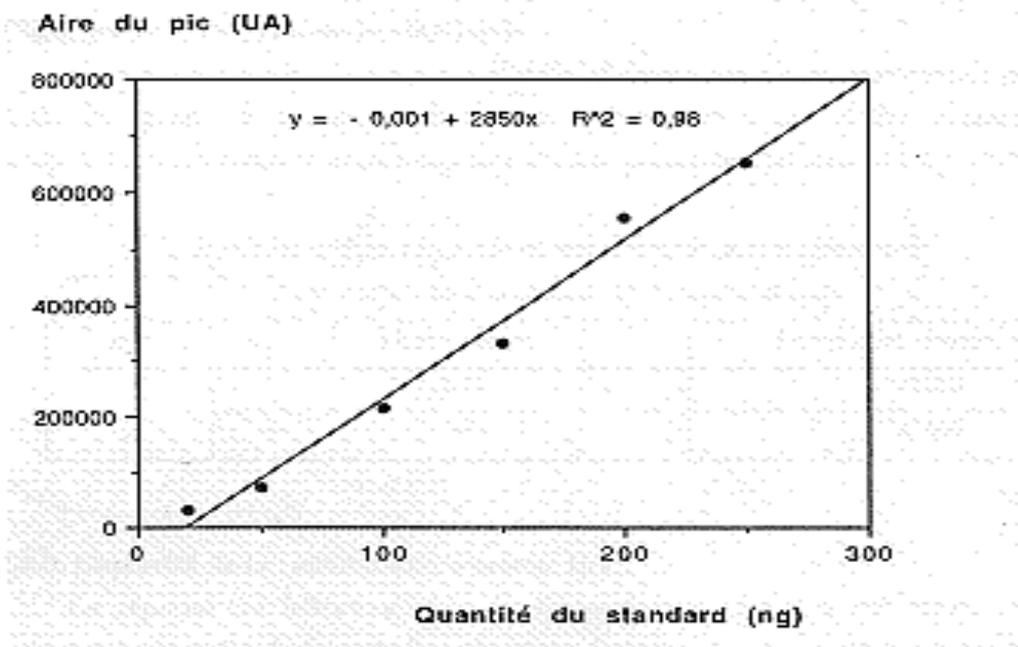


Figure 24 : Réponse du détecteur UV de l'HPLC au diflubenzuron : quantité du standard (ng) en fonction de l'aire du pic.

3.4.3. ANALYSE DES RESIDUS DANS L'EAU DE MER :

Les résultats du dosage des résidus extraits dans l'eau de mer témoin et traitée avec le dimilin (10 µg m.a./l) sont mentionnés dans la figure 25. Ils montrent, d'une part, que le standard migre approximativement à 8.40 min (Fig. 25 A), et d'autre part, l'absence d'une interférence d'un quelconque pic à ce temps de rétention dans les extraits d'eau de mer témoin (Fig. 25 B) et la présence du composé dans l'eau de mer traitée (Fig. 25 C). La quantification des pics des extraits d'eau de mer traitée indique que les taux de résidus diminuent au cours du temps passant de 10 µg/l au moment du traitement à environ 6 µg/l au bout de 2 semaines de traitement (Tableau 23 et Fig. 26).

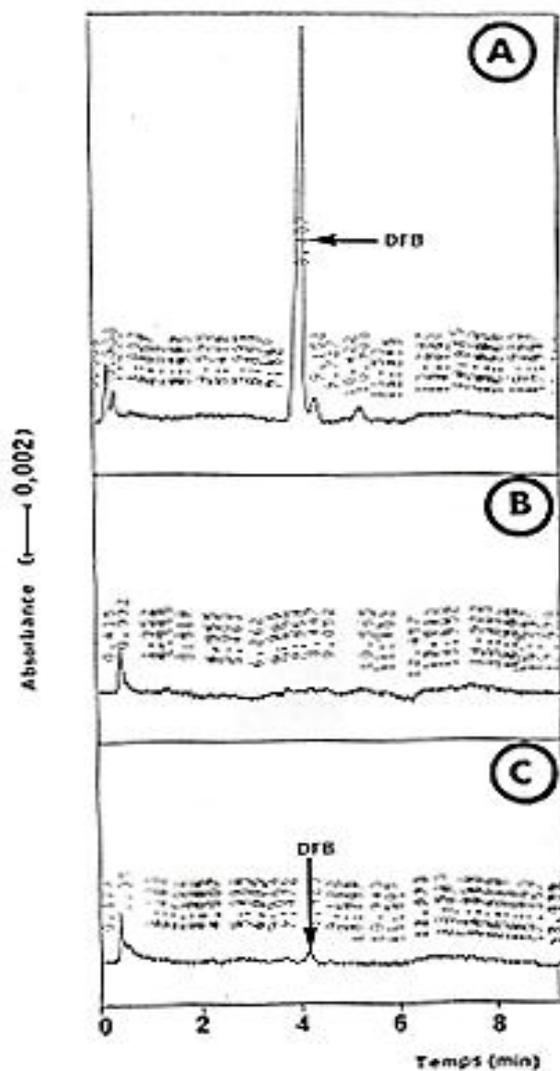


Figure 25 : Dosage des résidus de dimilin dans l'eau de mer du golfe d' Annaba : chromatogrammes HPLC de 250 ng de standard, le diflubenzuron (A) , d'un extrait (25 μ l) d'eau de mer du golfe d' Annaba montrant l'absence de pic à 8.40 min (B) et d'un extrait (25 μ l) d'eau de mer contaminées avec l'insecticide à la concentration de 10 ng/ml après deux semaines de traitement montrant la présence du composé (C).

Tableau 23 : Evolution du taux de résidus de dimilin dans une eau de mer comprenant une concentration de départ de 10 µg/l (m±SD, n = 3).

Temps après traitement (jours)	Taux de résidus (µg/l)
0	10
7	8 ± 3
14	6 ± 2

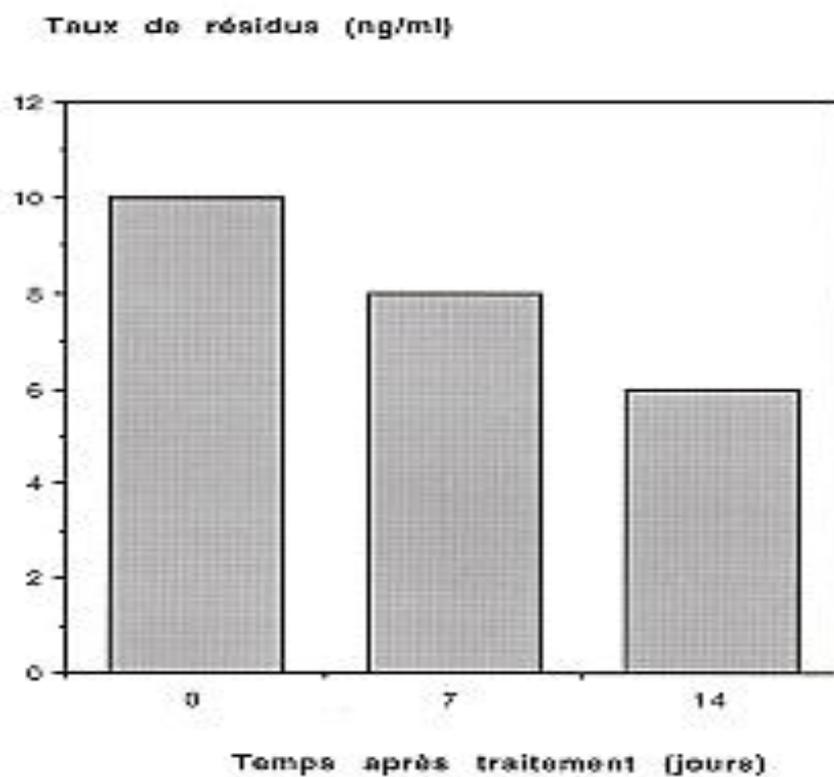


Figure 26 : Evolution du taux de résidus de dimilin dans une eau de mer comprenant une concentration de départ de 10 ng/ml (m±S, n= 3).

DISCUSSION

4. DISCUSSION:

Les organismes marins mettent en place différents moyens de lutte face aux polluants notamment les crustacés. Il semblerait que tous ces moyens coûtent à l'organisme ses réserves métaboliques spécialement en énergie (Van, 2002, Sepulveda & al., 2003).

Nous nous sommes intéressés à l'étude des crustacés qui occupent une place originale au sein de l'embranchement des Arthropodes et il convient de faire le point sur les problèmes de morphogénèse cuticulaire.

Les composés biochimiques tels que les insecticides sont utilisés en agriculture, pour lutter contre les insectes nuisibles. Au moment des lessivages, ces insecticides se retrouvent dans le milieu aquatique plus exactement aux embouchures des oueds et de la mer où vivent de nombreux crustacés juvéniles, avant de passer dans les eaux marines où les courants d'eau sont très importants.

La contamination de ces eaux est un problème majeur de la dégradation de ces eaux superficielles et souterraines, milieu de vie de ces crustacés (Humenik & al., 1987 ; Ifen, 2004). C'est pour cela que les chercheurs ont mis en place de nouvelles molécules plus sélectives, comme les régulateurs de croissance des insectes (IGRs) (Staal, 1982).

Les effets de ces régulateurs de croissance, ont fait l'objet de plusieurs travaux dans le monde notamment Weis & al., 1987 ; cardinal & al., 1979 ; Costlow , 1979 ; Gulka & al., 1980 Ali & al., 1988 et Bouliguand , 1988. Il y'a aussi d'autres travaux réalisés dans notre laboratoire comme sur les insectes entre autres *Tenebrio molitor* traité par les mimétiques de l'hormone juvénile (Aribi & al., 2006), par les agonistes et inhibiteurs de l'hormone de mue (Aribi & al., 2001 ; soltani & al., 2002, Taibi & al., 2003 ; Amrani & al., 2004 ;Chebira & al., 2006).Et enfin par les inhibiteurs de la synthèse de la chitine(Hami & al., 2004 ;Chebira & al., 2006),*Ephestia kueniella* (Bendjedou & al., 1998), *Blattella germanica* traité par des agonistes de l'hormone de mue (Maiza al., 2004 ; Kilani-Marakchi, 2006) et les moustiques, *Culex pipiens*L. exposés aux inhibiteurs de la synthèse de la chitine (Rehimi & al., 1999), les agonistes et inhibiteurs de l'hormone de mue (Boudjelida & al., 2005) sans oublier *Gambousia affinis* traité aussi par des inhibiteurs de la synthèse de la chitine (Drardja-Beldi & al., 2003 ;Zaidi , 2005 et Chouahda & al., 2005). Et enfin les crustacés notamment *Peneaus kerathurus* qui ont fait l'objet de plusieurs travaux comme Derbal & Soltani, 1991 sur le cycle

de mue *P. kerathurus*, l'effet d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine (Morsli & Soltani, 2003), sur les ecdysteroides (Bezzazel & Soltani, 2001), les agonistes et inhibiteurs de l'hormone de mue (Gheid & al., 2005 et Sonsri & al., 2008) et enfin Lechkhab & al., 2009, sur l'effet secondaire d'un insecticide sélectif le dimilin sur la cuticule de *P.kerathurus* et mesure de deux biomarqueurs.

Il convient de tester dans notre étude les effets secondaires du dimilin qui est l'inhibiteur de la synthèse de la chitine (Cohen, 1987 ; Ishaaya, 1990 ; Soltani & al., 1993 , Oberlander & Silhacek , 1998) sur la composition biochimique de la crevette, un organisme non visé, *P.kerathurus* , qui sert de barrière sélective entre le milieu intérieur et l'environnement (milieu d'élevage) . La rigidité de l'exosquelette sert à protéger l'animal des attaques et contre la deshydratation. Cette cuticule souple est rejetée périodiquement et est remplacée par une nouvelle cuticule, au cours d'un cycle de mue ; on traite aussi l'étude histologique et ultrastructurale de cet exosquelette afin de déceler d'éventuelles perturbations chez les individus témoins et traités au dimilin, sans oublier l'évolution des constituants biochimiques dans l'hémolymphe et la chair , pour voir l'interaction entre les anomalies cuticulaires et les perturbations métaboliques de l'animal après traitement . Et pour terminer on a analysé l'eau de mer utilisée dans l'élevage des crevettes, par chromatographie liquide à haute performance, afin de confirmer le mode d'action primaire du dimilin sur la synthèse de la cuticule.

Le dimilin perturbe le processus de mue en inhibant la synthèse de la cuticule des nouvelles couches cuticulaires notamment l'endocuticule (Mudler et Gijswijt, 1973 ; Cohen, 1973 ; Soltani & al., 1993). La chitine qui est le principal constituant de la cuticule est la cible du D.F.B, il modifie le métabolisme des hormones de mue (Yu et Terrière 1977 & al. 1984).

Chez les individus traités la cuticule nouvellement formée est fragile et incapable de résister aux remaniements de la mue, c'est ce qui entraîne la mort des petites crevettes.

4.1. Effet sur la composition biochimique de la cuticule:

La cuticule des crustacés est formée de fibres cristallines de chitine qui donnent une certaine rigidité et une résistance aux organismes qui en contiennent .La chitine est un polysaccharide (polymères de N-acetylglucosamine reliés par une liaison du type B-1.4) qui s'associent aux protéines. Ces fibres sont entourées par une matrice protéique. (Neville, 1975 ; Hepburn, 1976, 1985) et imprégnées de calcaire (Dennell, 1947).

Ces crustacés sont caractérisés par un exosquelette qui est la cuticule formée de chitine et de protéines. Chez *P. kerathurus* le taux de chitine cuticulaire au cours du cycle de mue chez les témoins augmente environ du stade A (27,56%) jusqu'au stade D (69.99%) pour chuter à la veille de l'exuviation. Des résultats similaires ont été démontrés par (Wilinder, 1974) après déminéralisation de la cuticule des crevettes *Pandalus borealis* et qui montrent un pourcentage de chitine qui varie entre 66 et 72%.

L'augmentation du taux de chitine observée dans notre étude est due à la mise en place des couches cuticulaires. La valeur maximale est enregistrée en intermue (stade C) où nous avons constaté que la formation des différentes couches cuticulaires est terminée entre autre la couche pigmentaire, la couche principale et la couche membraneuse. Svend Olav, 1991 confirme la teneur des cuticules en chitine qui varie entre 66% et 72% du poids sec des cuticules chez *Pandalus borealis*. Et les résultats apportés par (Wilinder, 1974) sur d'autres crustacés correspondent à ceux de l'espèce étudiée. Lafon, 1941 ; 1948 a montre que la cuticule chez certains crabes comme *Cancer pagurus* contient 71,4% de chitine, 62.5% chez *Carcinus maenas* et 77% chez *Nephrops norregicus*. Le taux de chitine aux différents stades du cycle de mue peut être déterminé aussi en suivant l'incorporation des précurseurs marqués de chitine chez les crustacés (Hu, 1958 ; Meenakshi & Scheer, 1961 ; Hohnkc, 1971 ; Hornung & Stevenson, 1971 ; lang, 1971 ; speck & al., 1972 ; Gwinn et Stevenson, 1973 a,b). Christiansen & al., 1984 ont mesuré la biosynthèse de la chitine par l'incorporation in vivo de deux précurseurs radios marqués le D – (3-3H(N))- glucose et N-acetyl-D-(1-3H)-glucosamine (NAGA) dans la cuticule des larves *Rhithropanopeus harrisi* (crustacés, Brachyura). Cette cuticule a été examinée aux différents stades de mue. Ces résultats montrent que l'incorporation des deux précurseurs était à son maximum à la post mue (stade A et B) et lors de sécrétion de l'endocuticule, elle diminue à l'intermue (stade C) où on a une sécrétion complète de la cuticule. Les taux les plus bas sont observés au stade D c'est-à-dire en pré-mue où la sécrétion de l'exocuticule est achevée. Les résultats d'incorporation de glucose chez les lavres *R. harrisi* témoins sont conformes aux résultats rapportés par Stevenson, 1972, il a remarqué que le taux le plus élevé de l'incorporation du glucose marqué dans la chitine chez les écrevisses est noté pendant la post mue.

Quand à l'effet du dimilin sur le taux de la chitine en intermue (stade C), on constate qu'il réduit le taux de la chitine chez les séries traités comparativement aux séries témoins. On peut dire que nos résultats obtenue sont en accord avec ceux rapportés et qui affirment que les

dérivés de la benzoylphenylurée interfèrent avec le processus de mue en perturbant la sécrétion cuticulaire, *via* la synthèse de la chitine (Retnakaran & Wright, 1987 ; Cohen, 1987 ; Ishaaya, 1990 ; Dhadialla & al., 2005).

Le DFB peut bloquer l'incorporation de la N-acetyl-D- glucosamine (Glc Nac) dans la cuticule des crustacés (Weiss & al., 1992). Quelques auteurs ont proposé différents modes d'action pour le dimilin chez, *Artemia salina*, chez le crabe bleu *C.sapudus* et chez le Crabe Fiddler *Uca pugilator* (Weiss & al., 1987, Christiansen & al., 1984).

Ces modes d'action peuvent être le blocage du transport de GlcNac, l'inhibiteur directe de la synthèse de la chitine, l'altération du taux des ecdystéroïdes, une variation directe des protéines kinase Camp- dépendante, mais le mécanisme précis qui pourrait encore affecter le métabolisme des crevettes penéïdes reste à clarifier (Oberlander, 1976 ; Leighton & al., 1981, Weis & al., 1987 ; Ishi & Matsumura, 1992).

Christiansen & al., 1984, note que chez des larves de *Crabes Rhithropanopeus harrisii* traitées par le diflubenzuron, le taux d'incorporation du précurseur radio marqué le D-(3-3H(N)) glucose dans la cuticule était bas pendant les stades A, B et C. A la fin du stade C ou début du stade D, le taux d'incorporation de glucose a augmenté chez les larves traitées pour diminuer au stade D. L'incorporation du précurseur, radio marqué le N-acetyl -D-(1-3H)-glucosamine (NAGA) aux stades A, B et C a diminué par rapport aux témoins. A la fin du stade C ou au début du stade D l'incorporation du NAGA a augmenté chez les larves traitées. Au stade D l'incorporation du NAGA a diminué chez les traitées. Concernant l'incorporation du NAGA dans la cuticule chez les larves traitées du Crabe elle a été également réduite aux stades A et B comparés aux témoins, Christiansen. & al., 1984.

Les crustacés, dont l'affiliation phylogénique avec les insectes est forte, montrent une grande sensibilité aux insecticides (Coppage & al., 1974, Bocquené & al, 1997 ; Bocquené & Galgani, 1998), c'est ce qui nous a permis de comparer nos résultats avec des travaux sur des insectes. Chez *Spodoptera frugiperda*, le traitement *in vitro* des disques alaires avec le diflubenzuron (DFB), le teflubenzuron (TFB) et le chloluazuron (CFA) inhibent complètement la synthèse de la chitine (Mikolajczyk & al., 1994) ; le C FA bloque *in vitro* la synthèse de la chitine dans les disques imaginaires chez *S.frugiperda* (Mikolajczyk & al., 1994 ; Zimowska & al., 1994). Ces observations sont en accord avec celles communément rapportées pour d'autres molécules benzoylurées (Degheele, 1990, Binnigton & Retnakaran 1991 ; Soltani & al., 1996). Des symptômes similaires sont observés avec la buprofazine, un autre inhibiteur de la synthèse de la chitine mais avec une structure différente de celle des BPU (De Cock &

Degheele, 1998 ; Ishaaya, 2001) Le flucycloxuron (FCX) et le triflumuron (TFM), autres dérivés de la benzoylurée, agissent également sur la sécrétion cuticulaire (Scheltes & al., 1988 ; Soltani & al., 1996 ; Rehimy & Soltani, 1999). La chitine chez les insectes représente avec les protéines le composé majeur de la cuticule. Sa biosynthèse a été mesurée par l'incorporation in vivo d'un précurseur radiomarqué, le N-(1-¹⁴C) acétylglucosamine (NAG) à différents moments durant le développement nympho-adulte (Soltani & al., 1993). Le traitement au FCX n'affecte pas le profil de l'incorporation du précurseur radioactif, mais réduit significativement les taux, chez les traités comparativement aux témoins. L'effet du FCX sur l'inhibition de la synthèse de la chitine semble relativement plus important au niveau de la cuticule préexuviale par rapport à la cuticule post-exuviale nymphale. De plus, le TFM paraît le plus efficace avec des taux d'inhibition variant de 30 à 90% selon la dose, il est suivi du FCX puis du dimilin (Soltani & al., 1993 ; Chebira & al., 2006) L'inhibition de l'incorporation du N-acétylglucosamine a déjà été signalée avec un traitement au DFB et au FCX (Grosscurt, 1987). Le flufenoxuron agit également de manière similaire à celle du dimilin et réduit l'incorporation de la chitine dans la cuticule de *Spodoptera littoralis* (Clarke & Jewess, 1990). L'inhibition de l'incorporation du N-acétyl-D-glucosamine est également rapportée avec un traitement au dimilin et au teflubenzuron chez *Plodia interpunctella* (Oberlander & al., 1991). La réduction du taux de chitine semble être le résultat d'une inhibition du processus biochimique qui mène à la synthèse de la chitine (Dhadialla & al., 2005). L'étude de l'incorporation de précurseurs marqués de la cuticule montre une inhibition de la synthèse de la chitine par le FCX (Soltani & al., 1993) ; confirmant les travaux de Grosscurt & al., 1988 sur *Spodoptera littoralis*. Des travaux sur l'effet du dimilin sur les Pupes stomoxys ont montré que le dimilin inhibe la synthèse du DNA au niveau des histoblastes imaginaux épidermiques. Celle-ci, joue un rôle dans l'inhibition de la synthèse de la chitine, puisqu'aucun épiderme cuticulaire n'a été formé (Meola & Mayer, 1980, De Loach & al., 1981). Des résultats contraires concernant l'effet in vivo et in vitro de quatre mimétiques de l'hormone de mue, le RH-5849, tebufénozide, halofénozide et le méthoxyfénozide, sur la composition biochimique des cuticules déposées, révèlent que le contenu en chitine a augmenté considérablement avec le halofénozide et le méthoxyfénozide administrés in vivo et in vitro (Berghiche & al., 2007).

Quant aux protéines, elles jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes (Mahler & Cordes, 1968). Les protéines peuvent assurer la catalyse biochimique (enzyme), la régulation hormonale et s'intégrer dans la cellule en tant que constituants structuraux (Jacob & Monod, 1961).

L'évolution du taux de protéines cuticulaires chez les animaux témoins de *P.kerathurus*, objet de notre étude, durant la période du cycle de mue, montre une diminution significative qui va du stade A (72,45%) jusqu'au stade D (29,13%). Wilinder, 1974 a constaté que la carapace d'*Astacus fluviatilis* est constituée de 30% de protéines cuticulaires et de 35.3% chez *Penaeus duorum*. Le taux de protéines cuticulaires est beaucoup plus important après une récente exuviation, qu'en période d'intermue. Ces travaux confirment les résultats obtenus chez d'autres crustacés (Stevenson, 1985).

Les résultats concernant l'effet du dimilin sur les protéines cuticulaires révèlent une augmentation hautement significative de ce taux chez les séries traitées comparativement aux séries témoins. Par contre, Berghiche & al., 2008, remarquent que le RH-5849, le tebufénozide, l'halofénozide et le méthoxyfénozide n'affectent pas les teneurs en protéines cuticulaires chez *T. molitor*. Soltani et al., 1993 notent que l'injection du TFM à des nymphes de *T.molitor* nouvellement exuviés est également sans effet sur le contenu et le taux en protéines cuticulaires. La synthèse des protéines dans la cuticule sternale abdominale a été mesurée par l'incorporation in vivo de la leucine tritiée chez *T.molitor*. Soltani et al., 1993 ont noté qu'à un jour après traitement au FCX, l'incorporation du précurseur radioactif est comparable dans les séries témoins et traitées. Le FCX n'a donc pas d'effet significatif sur la synthèse des protéines cuticulaires.

Par ailleurs, il est à noter qu'il existe peu de travaux sur l'analyse de la cuticule chez les Crustacés (Wilinder, 1974 ; Vight & Dendinger, 1982). La teneur en sels calciques de quelques espèces a été estimée par Drach & Lafon, 1942 et Lafon, 1943. Le contenu en sels calciques a été déterminé chez *Palaemonetes vulgaris* et *Uca pugilator* (Kleinholz, 1941), chez *Hemigrapsus nudas* (Kincaid & Sheer, 1952), chez *Procambarus clarkii* (Huner & Avault, 1976) chez *Palaemonetes pugio* (Brannon & Rao, 1979). Wilinder (1975a) a précisé la teneur des sels calciques au niveau de la cuticule post-exuviale d'*Astacus fluviatilis*.

Nos résultats indiquent que le taux le plus bas des sels calciques est enregistré au stade A, il est au maximum au stade B. Le taux des sels calciques chez *P.kérathurus* varie entre 47.15 et 65.87% du poids sec de la cuticule. Nos résultats sont comparables à ceux de Sevend Olav, 1991 qui rapporte que le taux des sels calciques varie entre 50 et 60% du poids sec des cuticules chez *P.borealis*. Ces valeurs correspondant à celles rapportées chez *Penaeus duorarum* 53.1% et *Leander adspersus* 55.8% (Wilinder, 1974). Cependant Lafon, 1943 note que le taux des sels calciques est de 87.2% chez *Cancer pagurus*, 72.2% chez *Nephrops norvegicus*. Pour Drach & Lafon, 1942, le taux des sels calciques est de 84.3% dans la cuticule

de *Carcinus maenas*. D'autres travaux indiquent que le taux des sels calciques le plus élevé est approximativement de 22% chez le Crabe bleu *Callinectes sapidus* (Vight & Dendinger, 1982). Ces valeurs sont en accord avec les résultats obtenues 18.8% chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* (Huner & Avault, 1976), mais ils sont plus élevés que les taux des sels chez *Penaeus californiensis* (12.6%) et chez *Uca pugilator* (9.5%) (Kleinholz, 1941).

Concernant l'effet du xénobiotique sur la teneur en sels calciques, on note que le dimilin n'a aucun effet sur le taux des sels calciques.

4.2. Histologie et ultrastructure de la cuticule de *Penaeus kerathurus* :

L'étude histologique du tégument des crustacés décapodes a permis de séparer la cuticule de *Penaeus kerathurus*, en deux parties d'épaisseur inégale, l'épicuticule mince couche superficielle, et la procuticule, plus épaisse, composée de trois couches qui sont, la couche pigmentaire, la couche principale et la couche membraneuse.

Certains auteurs se sont limités à une simple description de ces couches telles qu'elles apparaissent en inter mue (compère, 1988). Thoez & al., 1988 confirment ces résultats, et précisent que la procuticule est d'aspect lamellaire, par contre la couche membraneuse se différencie des autres couches par l'absence de minéralisation avec des microfibrilles chitino-protéiques. Drach et Tchernigovtzev, 1967 ont démontré dans leur nomenclature que c'est cette couche membraneuse qui est la dernière à être mise en place, en fin de période post-excuviale.

Il ne fait pas de doute que la présence de la cuticule affecte profondément la biologie des crustacés et même plus encore que celle des autres Arthropodes, et plus spécialement le développement et la croissance.

On s'accorde volontiers à souligner les caractères qui singularisent la cuticule des Arthropodes par rapport à celle des autres invertébrés, elle est d'une seule venue pénétrant même profondément au niveau des invaginations ectodermiques. Elle est de nature chitino-protéique, elle est peu extensible, ce qui impose de ce fait une croissance en palier grâce à un système de mue impliquant la synthèse d'une nouvelle cuticule à intervalle variable d'après Jeuniaux, 1963. Pour ce qui est de la nature chitino-protéique on sait qu'aujourd'hui que la synthèse de la chitine par l'ectoderme est une propriété largement distribuée dans le règne animal (Jeuniaux, 1982 & 1986), elle est toujours associée à des protéines pour former la trame des exosquelettes.

Le durcissement de la cuticule se fait par tannage des protéines ou dépôt des sels minéraux. Pour comprendre la croissance de la cuticule, son renouvellement et son ajustement périodique, il faut arriver à une connaissance précise de l'organisation ultrastructurale de la cuticule et les mécanismes physiologiques et biochimiques qui assurent le contrôle de sa biosynthèse et de sa dégradation à chaque mue (Hachman, 1984 ; Wilinder, 1975 & Jeuniaux, 1964). La disposition lamellaire de la cuticule est due à la présence dans cette dernière des fibres chitinoprotéiques qui constituent la charpente, de la procuticule, c'est-à-dire la partie la plus épaisse de la cuticule, situé entre l'épiderme et l'épicuticule, leur disposition est autrement organisée. La microscopie électronique montre, sur les coupes fines et semi – fines une disposition parabolique (Bouliguand, 1965), cette interprétation coïncide avec les résultats obtenus dans notre étude, la structure de base de la cuticule des crustacés est une charpente chitinoprotéique que est modifiée par des remaniements sous l'effet d'hydrolases épidermiques pendant la mue (Hackeman, 1984). On reconnaît chez les crustacés comme chez les insectes, l'existence de plusieurs fractions de protéines plus ou moins solubles appelées les arthropodiens qui sont liées à la chitine par des ponts « hydrogène »(Hackman, 1984).

Chez les Crustacés Décapodes, ces protéines cuticulaires présentent de légères variations de composition en acides aminés, dont les dominants sont la glycine, l'acide glutamique, l'acide aspartique la proline et l'alanine (Willinder, 1975 & Jeuniaux, 1986).

Chez le crabe *Carcinus maenas*, les microfibrilles sont associées entre elles, cette organisation en fibres dépend du degré de minéralisation de chaque strate envisagée.

Ces modalités ont été définies par Giraud-Grille, 1984a. Les travaux envisagés sur la cuticule de l'espèce étudiée *Penaeus kerathurus* coïncident avec ceux de Giraud-Grille, 1984 sur le Crabe *Carcinus*.

Dans les strates fortement calcifiées de la couche pigmentaire préecdysiale, les microfibrilles forment des réseaux réticulés ainsi qu'au niveau de la couche principale, calcifiée postexuviale ; Alors que dans la couche membraneuse, non calcifiée déposée tardivement après la mue, les microfibrilles sont distribuées de manière uniforme et homogène sous forme de lamelles, qui ont une disposition hautement organisée. La disposition parabolique que montre les coupes fines et semis fine a été vérifiée sur nos coupes, sur la cuticule de *Penaeus kerathurus*.

Pendant la période préecdysiale après l'apolyse (stade D1 à D4) l'épiderme secrète la partie de la nouvelle cuticule qui deviendra ensuite la couche pigmentaire.

Aspect de la cuticule chez les témions :

Les résultats obtenus après l'étude de l'ultrastructure de notre cuticule, montre que l'épicuticule de *P. kerathurus* n'a effectivement pas de lamelles qui sont une caractéristique des couches procuticulaires, comme a pu le démontré Giraud-Guille, 1984b chez une espèce de Crabe, *C.maenas*.

L'épaisseur de la procuticule dépend du nombre de lamelles des différentes couches. Les deux premières couches ont une épaisseur qui est plus ou moins constante, contrairement à la couche membraneuse qui, elle, varie suivant le nombre de lamelle (Bouliguand, 1965), Ces travaux confirment les résultats obtenus en ultrastructure. On a constaté que le nombre des lamelles de la couche membraneuse est d'environ 48.

Toute fois, Bouliguand ,1972 est le premier à avoir montré chez les Crustacés Décapodes que la structure des microfibrilles des lamelles de la procuticule a une disposition hélicoïdale au niveau des couches principale et membraneuse.

Certains Isopodes marins comme *Sphaeroma serratum* ont une cuticule minéralisée, présentant une organisation générale qui répond au plan fondamental de la cuticule des Crustacés Décapodes notamment celle de *P. kerathurus*. La distribution des microfibrilles chitino-protéiques forme un système homogène lâche (Ansenne, 1988). Ces canaux verticaux qui traversent la carapace des Arthropodes furent observés par Vitzou ,1882 ; Schmidt ,1924 & Drach ,1993 ont reconnu leur aspect hélicoïdal chez les Crustacés Décapodes.

Ces canaux ont été décrits récemment par Compère & al.,1987 dans la procuticule du Crabe, *C.maenas*. Ce réseau n'a pas été observé chez l'espèce étudiée, mais nous pouvons supposer que ces canaux existent chez *P.kerathurus*, du moment qu'ils véhiculent le calcium et d'autres matériaux inorganiques qui durcissent la cuticule, comme l'a démontré Hadley ,1986.

L'examen du cycle cuticulaire au cours des différents stades de mue chez l'espèce étudiée *P.kerathurus*, montre un début de sécrétion de la cuticule préexuviale au stade D. Cette sécrétion se poursuit jusqu'à la fin du stade D qui précède l'exuviation. Pendant la période préexuviale, on assiste à une résorption des couches procuticulaires de l'ancienne cuticule qui se traduit par une diminution de l'épaisseur de celle-ci, et la digestion des couches profondes est observée à la veille de l'exuviation. La formation et la consolidation de la cuticule post-exuviale, débutent en post-mue et se déterminent en inter-mue, comme l'ont signalé Drach et Tchernigovzeff ,1967.

Les études menées par Bouliguand, 1988 sur la cuticule des Arthropodes, plus essentiellement sur les Crustacés Décapodes, font ressortir que la structure cuticulaire se modifie pendant l'exuviation, phénomène caractéristique et indispensable à leur croissance.

Avant la mue, l'épiderme sécrète une nouvelle précuticule ; dès que la nouvelle épicuticule est mise en place, des particules chargées de la résorption de l'ancienne cuticule, entrent en jeu, ce sont des enzymes appelés exolysomes. Ces chitinases permettent la lyse des couches de l'ancienne cuticule, notamment la couche membraneuse. Lorsque cette dernière est digérée, le crustacé absorbe une grande quantité d'eau qui passe dans la cavité générale et gonfle le corps. A ce moment là l'épiderme sécrète la nouvelle procuticule. Cette nouvelle cuticule est progressivement dépliée, ce qui va aider l'animal à rejeter l'ancienne cuticule.

Les observations faites par Thorez & al. ,1988 sur *Maia squinado* et *Cancer pagurus* ont montré qu'une fois la couche membraneuse est digérée, elle se transforme en un gel hygroscopique puis commence ensuite la dégradation des autres couches proximales jusqu'au moment de l'exuviation. A ce moment là l'espace éxuvial commence à se creuser. Les différentes étapes du cycle de mue observées chez *P.kerathurus* sont en accord avec les travaux faits par Bouliguand, 1988 sur le Crabe.

L'étude ultrastructurale des cuticules témoins confirme les données histologiques et apporte des précisions sur l'architecture des lamelles qui constituent les différentes couches cuticulaires de *P.kerathurus*. Cette structure est semblable à celle des autres Crustacés Décapodes.

Aspect après traitement de la cuticule :

L'étude ultrastructurale de la cuticule traitée montre que la cuticule post-excuviale lorsqu'elle est sécrétée présente une perturbation notamment au niveau de la couche la plus profonde qui est la couche membraneuse. Le nombre de lamelles est réduit et les fibrilles ne montrent pas d'orientation particulière.

Au moment de l'exuviation, le poids de la cuticule des insectes, comme le criquet *Pelelium* correspond à celui de l'exocuticule toute fois l'augmentation du poids se produit au cours de ce stade correspondant au dépôt de nouvelles couches endocuticulaires. Ce poids diminue suite à une dégradation graduelle des protéines et de la chitine pour préparer la mue suivante (C.Nohr & .,1993). Ces différences de poids sec cuticulaire ont été soulignés par de nombreux auteurs chez divers insectes et crustacés, comme les adultes de *S.greyaria* et *locus migratoria* traités à l'hexaflumuron et au DFB et les larves de *Spodoptera littoralis* et *S.exigua* traités au DFB par Dhadialla & al., 2005 et Soltani & al., 1995.

La diminution significative du taux des protéines cuticulaires est observée chez les larves et adultes de *S.gregaria* traités au *M.anisoplia* par Halouane & al., 2013.

La destruction des couches cuticulaires chez les larves traitées est due à leur dégradation par les enzymes protéolytiques et chitinolytiques. L'application de *M.anisopliae* a perturbé cette structure. Cette destruction a engendré comme signes externes une mue, Perturbée et bloquée qui révèle un aspect froissé, onduleux et desséché.

Ces signes sont similaires à ceux observés avec d'autres inhibiteurs de la croissance chez divers insectes exposés à différents traitements comme le chlorofluazyron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine sur *Chloristoneura flumiferama* par Cunningham et al., 1987, ainsi que l'insecticide l'hématoporphyrine sur *Culex pipiens* rendant difficile la distinction entre l'endocuticule et l'escocuticule par Salama et al., 2002.

Toutefois, les inhibiteurs de croissance entraînent des perturbations physiologiques chez les insectes avec des modes différents. Beaucoup d'entre eux compromettent la synthèse et les dépôts de chitine dans la cuticule par A. Retnakaran et al., 1996. Cependant c'est le manque de chitine dû à l'inhibition de sa biosynthèse qui est la cause de la forme amorphe de cette région de la cuticule par contre les microfilaments rencontrés dans cette région se composent de chitine et requièrent la chitine pour son élaboration par Reynolds, 1978.

Les perturbations cuticulaires sont dues à une inhibition de la biosynthèse de la chitine comme l'ont démontré Post et Vincent , 1973 ; Marks & Sowa , 1974 ; Gijswijt & al., 1979 et Soltani & al., 1993 sur les insectes.

Mitsui et al., 1980a ont montré que cette inhibition de la synthèse de la chitine résulte d'un blocage de la chitine-synthétase. Certaines données démontrent que le Dimilin n'inhibe pas la chitine synthétase in vitro mais agirait plutôt sur la conversion de la chitine- synthétase en enzyme active (Cohen & Casida, 1980 ; Mayer & al., 1980 et 1981 et enfin Leighton & al., 1981).

Walker et al., 1992 ont démontré que la région de la couche membraneuse qui est située au dessus des cellules épithéliales, est l'aire où la majorité de la synthèse de la nouvelle chitine devrait être accumulée. Le traitement in vitro au DFB fait sur l'épithélium cuticulaire du Crabe bleu adulte en post-mue, altère la synthèse de la chitine, ce qui va réduire la formation de la nouvelle cuticule ; le dimilin a donc un effet inhibiteur sur la synthèse de la chitine et coïncide avec ceux observés chez les insectes et les larves de Crustacés traités au diflubenzuron. Nos

observations sont en accord avec les observations faites sur les insectes (Deul et al., 1978 ; ker, 1978) et sur les Crustacés (Christiansen et Costlow, 1982).

Dans notre cas, les Crustacés présentent, à une dose de 1 μ g/l, des perturbations de la structure cuticulaire caractérisées par une diminution de l'épaisseur de la cuticule due à une réduction du nombre de lamelles, leur architecture est modifiée et les fibrilles sont désorientées, l'exuviation se fait normalement ; à la différence du groupe exposé à une dose de 10 μ g/l où l'on remarque une mortalité juste après l'exuviation. Des résultats similaires ont été rapportés chez le Crabe Horseshoe (Weis & al., 1987).

Ainsi, les études menées par Weis & al., 1987, ont montré une résistance au dimilin, en traitement continu à des doses de 1 et 5 μ g/l chez les Crabes Horseshoe *Limulus polyphemus*, par rapport aux Crustacés Mysidés et les larves de Décapodes. A la différence du groupe traité à une dose de 50 μ g/l où l'on observe une mortalité juste après l'exuviation.

Ces Crabes sont des Crustacés qui ne meurent pas pendant le processus du changement de l'ancienne cuticule, mais après la mue.

Les résultats obtenus, chez *P.kérathurus* traités jusqu'à l'exuviation avec une dose de 10 μ g/l ont montré une mortalité après l'exuviation. Ces résultats confirment ceux trouvés chez le crabe *Fiddler*, *Uca pugilator* où l'effet du DFB à des doses de 5 à 50 μ g/l traité pendant une semaine, montre un retard dans la régénération des pattes, alors qu'il n'en est rien chez le Crabe exposé à une dose de 0.5 μ g/l (Weis & al., 1987).

Plusieurs auteurs comme Gunninghan, 1987 ; Cardinal & al., 1979 et Culka & al., 1980 ont remarqué qu'il y avait une mortalité importante chez le Crabe *U.pugilator* à une dose de 50 μ g/l, alors que nous avons de simples liaisons au niveau de la carapace à une dose de 5 μ g/l. Des résultats semblables ont été obtenus par Touart & al., 1985 sur des Crevettes adultes *Palaemonetes pugio* à des doses faibles de DFB. Ils ont constaté des lésions cuticulaires d'où un retard du cycle de mue, mais ces Crevettes survivent à l'éclosion.

Culka & al., 1980 ont remarqué que le dimilin à une dose de 0.5 μ g/l accélère l'exuviation chez *Balanus eburneus* (Crustacé, Cirripidé) ; ce phénomène a été observé par Rehim, 1993 après traitement par d'autres inhibiteurs de la synthèse cuticulaire chez *Culex pipiens*, *pipiens*.

La perturbation de la structure de la cuticule est due probablement à une déficience de la synthèse de la chitine ; l'effet du dimilin sur les modifications histologiques du tégument chez *B. eburneus* est similaire à celui observé chez les insectes (Gulka & al., 1982).

Le dimilin a une dose de 10ug/l agit sur la cuticule de *P.kerathurus* en inhibant la synthèse de la chitine comme l'on démontré Cardinal & al., 1979 sur *C.mediterraneus*, en montrant que la DFB à une concentration de 0.2 ppm empêche la résorption de l'ancienne carapace à la fin de la pré-mue et en inhibant la formation de la nouvelle cuticule. L'inhibition et la résorption de la mue sont également observées chez *P.kerathurus* après traitement avec 10 ug/l.

Les travaux menés par Andersen & al., 1979 ; Hunter & al., 1974 ; Post & al., 1973 et Sowa & al., 1975 , ont signalé que la DFB agit sur les insectes en bloquant la chitinogènèse.

En effet, les Crevettes traitées durant tout le cycle de mue avec une dose de 10ug/l de dimilin montrent que la couche la plus profonde n'est pas digérée, ce phénomène a été observé chez *Carcinus* (Crustacé, Décapode) par Cardinal & al., 1979 .

L'étude histologique et ultrastructurale des cuticules prélevées sur des individus traités au dimilin révèle une perturbation de la sécrétion cuticulaire. L'épaisseur totale de la cuticule ainsi que l'épaisseur relative de la couche membraneuse sont modifiées durant la métamorphose comparativement aux témoins. Les épaisseurs de la cuticule traitée sont moins épaisses que celles des témoins en raison de l'inhibition de la sécrétion. Cette inhibition est due à l'effet du Dimilin sur les enzymes qui sont responsables de la lyse des couches profondes de la cuticule. L'aspect architectural de la cuticule est également perturbé, le nombre de lamelles est réduit et les fibrilles ne montrent pas d'orientation particulière.

4.3. La composition biochimique de l'hémolymphe et de la chair

L'utilisation intensive des insecticides conventionnels pour le contrôle des ravageurs agricoles a causé des effets secondaires sur l'environnement (Aktar & al., 2009). En outre, ces pesticides contaminent les cours d'eau, les ruissellements agricoles, les lacs et les étangs pendant la saison des pluies, ce qui affecte les organismes aquatiques non ciblés. Ces effets négatifs ont incité l'élaboration de stratégies de luttés alternatives comme les produits chimiques plus respectueux de l'environnement comme les I.G.Rs qui ont un minimum de risques écotoxicologiques les rendant des éléments important dans les programmes de luttés intégrées (Horowitz & al., 2004). Sur la base du mode d'action, les IGRs sont regroupé en trois catégories, les hormones juvéniles (HJS) et leurs analogues (AHJs), également appelés juvénoïdes .Les agonistes de l'ecdysone (AE), et les inhibiteurs de la synthèse de la chitine (ISC) (Mondal & al., 2000). Les régulateurs de la croissance tels que les inhibiteurs de la synthèse de la chitine semblent prometteurs en raison de leur mode d'action spécifique sur les insectes, et leur faible toxicité contre les organismes non- ciblés en comparaison avec les insecticides conventionnels (Dhadialla & al., 2005). Cependant, il y'a une certaine inquiétude

au sujet des ISCs par rapport à leur effets probables sur les espèces de crustacés (Ishaaya & al., 1998). En effet, la chitine est le deuxième biopolimère naturel le plus important de la carapace des crustacés dans le monde (Prabu & al., 2012).

Chez les crustacés et comme d'autres Arthropodes, la mue est un processus complexe essentiel pour la croissance, la métamorphose et la reproduction qui est affectée par une séries de signaux environnementaux et réglementée par une cascade de signaux hormonaux (Kuballa & al., 2007)

La nature et les taux des ecdysteroides dans l'hémolymphe et les ovaires ont été réalisés par un dosage immunoenzymatique utilisant deux système d'anticorps, révèle la présence de deux principales hormones : 20 - hydroxecdysone et l'ecdysone, tandis que les changements dans la concentration hormonale dans l'hémolymphe au cours du cycle de mue montre un pic unique qui se déroule au début de la pré-mue (stade D) et qui coïncide avec l'apolyse (Soltani et al., 2002 ; Soltani et Bezazel., 2002). Enfin, la sécrétion de la cuticule a été examiné et les corrélations des concentrations des protéines et des lipides ont été définis (Derbal & al., 2008). En outre, dans une étude de dégradation en utilisant une analyse par CLHP on a constaté que le DFB présentait une faible stabilité dans l'eau de mer (Soltani & al., 2003) que dans l'eau douce (Zaidi & al., 2013).

L'exposition d'un organisme aux produits xenobiotiques peut modifier la synthèse de certains métabolites et perturber son fonctionnement (Rodriguez-Ortega & al., 2003). Dans cette étude, les principaux constituants biochimiques (glucides lipides et protéines) ont été mesurés dans l'hémolymphe et dans la chair de *P.kerathurus* pendant un cycle de mue. Chez les individus témoins, les constituants présentent un profil similaire avec un pic au stade C. Ces variations sont corrélées avec les principaux événements de dépôt de la cuticule. Comme chez d'autres espèces de crustacés, la sécrétion de l'ancienne cuticule continue du stade A jusqu'à la fin du stade C (Skinner, 1985 ; O'Brien & al., 1988 ; Promwikorn & al., 2005), tandis qu' au stade D, on observe une apolyse qui se traduit par la sécrétion de la nouvelle cuticule et la digestion de l'ancienne (Derbal & al., 2008). En outre, les protéines sont les constituants majeurs dans l'hémolymphe soit de *P. kerathurus* ce qui confirme les données rapportées chez d'autres crevettes péneides comme, *Fenneropenaeus mergueensis* et *F.penicillat* (Fatima et &., 2013).

Les variations observées au niveau des constituants biochimiques au cours d'un cycle de mue ont été modifiés par le diflubenzuron chez *P. kerathurus*. En effet, après le traitement, une légère augmentation de la concentration des glucides, des lipides et des protéines dans l'hémolymphe a été observée à la fin du cycle de mue (stade D). De même, le diflubenzuron a également aboutit à une augmentation des taux des glucides et des lipides dans la chair. Ce pendant ce composé n'a pas d'effet significatif sur les taux en protéines. Les glucides, comme éléments d'énergie jouent un rôle très important dans la physiologie, tandis que les lipides représentent la source d'énergie chez les insectes et sont transportés par l'hémolymphe de leur site de stockage vers l'organe utilisateur, en particulier lors de la vitellogénèse et la synthèse cuticulaire (Skinner & al., 1985 ; Dapporto & al., 2008).

L'augmentation des concentrations des constituants biochimiques de l'hémolymphe, en particulier les glucides et les lipides est observée au cours de la période pré-mue et pourrait s'expliquer par la digestion de l'ancienne cuticule et la libération des protéines et des glucides dans l'hémolymphe, et une inhibition de la sécrétion de la nouvelle cuticule après traitement au diflubenzuron (Morsli & al., 2003). Précédemment, nous avons montré que le diflubenzuron réduit l'épaisseur de la cuticule et modifie leur structure, en raison d'une diminution de la quantité de chitine dans les cuticules traitées de *P. kerathurus* (Morsli & al., 2003). La relative accumulation des glucides et des lipides dans la chair suggère la réduction de la glycolyse et la lipolyse suite à la perturbation du dépôt de la cuticule.

Plusieurs insecticides conventionnels ont été testés sur les espèces de crustacés. Ainsi, on a constaté que l'endosulfan est connu pour son influence sur les glucides, les protéines et les lipides chez *Macrobrachium malcolmsonii* (Sarvana Bhavan & al., 1997). Le monocrotophos appliqué aux Crabes *Barytelphusa guerini* a été signalé pour diminuer la glycogénèse et les protéines et d'augmenter la teneur en lipides (Chandrakala & al., 2008) et pour le malathion et le glyphosate à des concentrations sublétales diminuent les teneurs des composés biochimiques étudiés (protéines totales, les glucides et les lipides) en comparaison avec les témoins de *Streptocephalus dichotomus* pré-adultes (Arun Kumar & al., 2013).

4.4. Quantification par chromatographie liquide a haute performance des résidus du Dimilin dans l'eau de mer du golfe d'Annaba et étude de sa dégradation

La présence de pesticides dans l'eau, les sols, les produits alimentaires et leur effet potentiel sur la santé des personnes, sont des problèmes qui attirent de plus en plus l'attention des consommateurs et des pouvoirs publics (Pilette & Pease, 1993). De ce fait, la législation concernant les pesticides est devenue de plus en plus exigeante au fil des ans, nécessitent la réalisation de tests toujours plus sensibles. Les méthodes conventionnelles, telles que la chromatographie liquide à haute performance ou la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permettent déjà, dans certains cas, la détermination des concentrations en pesticides au niveau requis par la législation. Toutefois, leurs limites ont poussé à la mise au point de tests rapides permettant de réaliser un nombre important d'analyse sur le terrain et en laboratoire. A l'heure actuelle ce sont les tests immuno-enzymatiques qui sont développés dans certains laboratoires d'analyse médicale. Les dérivés de la diphenylbenzoyl urée, en raison de leur mode d'action spécifique (Ishaya, 1990 ; Binnigton & Retnakaran, 1992) et de leur innocuité dans l'environnement, sont de plus en plus intégré dans les programmes de lutte contre les ravageurs (Grosscurt, 1978 ; Grosscurt & *al.*, 1988). Le dimilin, non commerciale du diflubenzuron, est utilisé à grande échelle contre les ravageurs des forêts, il est connu comme régulateur de la croissance des insectes (Post & *al.*, 1974). Ce mode d'action a un spectre toxique large mais des effets contraires sur un important groupe d'organismes marins : Les Crustacés. Les lacs littoraux de la région d'Annaba représentent une zone particulièrement favorable aux moustiques. *Panaeus kerathurus* est une espèce noble qui se trouve dans le Golfe d'Annaba. Ce dimilin est connu pour interrompre la synthèse de la cuticule et la reproduction chez les Crustacés (Costlow, 1979 ; Christensen & Costlow, 1982). Le diflubenzuron ou ses analogues ont déjà faits l'objet d'une quantification dans des plantes (Abdel Momen & Mumma, 1981) ou dans les insectes (Spates & Wright, 1980 ; Soltani & *al.*, 1983 ; Soltani & Soltani-Mazouni, 1992) par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La réalisation d'un élevage de *Panaeus kerathurus* (Crustacés, Décapodes) en laboratoire en vue d'une étude sur les effets physiopathologiques du dimilin 25% WP, nécessite de l'eau de mer provenant du golfe de Annaba. C'est pourquoi, l'objectif de ce travail est d'analyser l'eau de mer utilisée.

Il à été déjà signalé dans la littérature des applications de l'HPLC aux dosages des résidus des dérivés bensoylurées. Spates & Wright, 1980 ont déterminé le taux de résidu de diflubenzuron chez les adultes de *Stomoxys calcitrans* traités par application topique. Abdel

Momen & Mumma, 1981 ont dosé un régulateur de la croissance l'EI-494 dans une plante, l'alfalfa. Plus récemment, Sundaram & North, 1989 ont analysé par HPLC le diflubenzuron dans les sols des forêts.

La méthode utilisée dans notre étude est une méthode simple, rapide et fiable. Elle a été déjà appliquée précédemment. En effet, Soltani & al., 1983 ont analysé par HPLC les résidus de diflubenzuron sur la cuticule, dans le corps et sur les boîtes d'élevage après un traitement des nymphes de *T. molitor* par trempage (10g/l) ou par application topique (10 ug/chrysalide). Ainsi, les résultats montrent que environ 10-12% appliquée topiquement ou retenue après trempage (61 ug) sont réellement incorporés dans la nymphe. Enfin, Soltani & Soltani – Mazouni, 1992, après traitement des chrysalides de *Cydia pomonella* avec une application topique de 0.5ug de diflubenzuron, ont quantifié les résidus dans les ovaires à l'émergence des papillons. Le taux détecté chez *C.pomonella* est de 156 +- 32 ng par paire d'ovaires et il est comparable à celui détecté au bout de 6 jours de traitement par ingestion avec la dose de 10 mg/g dans les ovaires de *T. molitor*. Depuis, chez *T. molitor*, les taux augmentent avec la dose de dimilin et le temps au cours de la maturité sexuelle.

Dans une directive émise en 1985 par CEE fixant les normes de qualité de l'eau potable, les pesticides sont considérés comme un groupe unique, avec une concentration maximale admise (CMA) limitée à 0.1 ug/l pour chaque substance du groupe et à 0.5 ug/l pour l'ensemble des pesticides et leurs dérivés (Pilette & Pease, 1993)

Parmi les 300 pesticides concernés par la législation, certains sont difficilement détectables à la concentration de 0.1ug/l. Les données obtenues dans notre étude sur l'eau de mer provenant du golfe d'Annaba et destinée à alimenter les élevages de *P. kerathurus* mettent en évidence :

- a-** Une absence du composé dans l'eau de mer.
- b-** Une diminution au cours du temps des taux de l'eau de mer contaminée à une concentration de 10ug/l dans les aquariums. Cette diminution traduit une dégradation de la molécule au cours du temps.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES:

Il existe une littérature abondante sur l'effet du dimilin sur les Crustacés Décapodes au cours du cycle de mue. La crevette *Penaeus kerathurus* par contre n'a pas fait l'objet d'études détaillées notamment écotoxicologiques. Notre étude entre dans le cadre d'un travail d'équipe dans notre laboratoire de biologie appliquée depuis 1990 où plusieurs chercheurs ont travaillé sur cet échantillon, notamment le présent travail, qui a pour objectif l'évaluation des effets secondaires d'un régulateur de croissance inhibiteur de la synthèse de la chitine, le dimilin, (25% poudre mouillable) administré à des doses de 1 et 10 µg de matière active /l dans l'eau d'élevage d'un organisme non ciblé, *Penaeus kerathurus* au cours d'un cycle de mue. Ce traitement s'effectue juste après l'exuviation au stade A et se prolonge jusqu'à l'exuviation.

La composition biochimique de la cuticule révèle un taux de chitine faible au stade A et qui augmente progressivement jusqu'au stade D où il atteint son maximum. Le taux des protéines est maximal après l'exuviation, c'est-à-dire au stade A, il diminue, au stade B et au stade C, et les plus faibles taux sont marqués au stade D; par contre les teneurs en sels calciques sont variables, on note des taux faibles au stade A et augmentent au stade B. Il y a une augmentation de ces taux du stade C jusqu'au stade D; on peut dire qu'après traitement on enregistre une réduction hautement significative du taux de chitine cuticulaire, ce qui confirme son mode d'action primaire, par contre le dimilin est sans effet secondaire sur la teneur en sels calciques.

L'étude histologique et ultra structurale sur le tégument de *P.kerathurus* après traitement au dimilin avec deux doses de 1 et 10 µg/l a été envisagée. Elle nous a permis d'une part de confirmer l'action de cette molécule sur la sécrétion cuticulaire caractérisée par une réduction de l'épaisseur de la cuticule notamment une perturbation au niveau de la couche la plus profonde qui est la couche membraneuse, avec un nombre de lamelles très réduit et les fibrilles ne montrent pas d'orientation particulière.

Chez les animaux témoins, cette couche membraneuse présente une architecture hélicoïdale, alors que chez les animaux traités on constate une modification de cette architecture qui devient peu visible.

Les teneurs des principaux métaboliques (protéines, glucides et lipides) ont été déterminées dans l'hémolymphe et la chair des crevettes. Chez les témoins les teneurs augmentent jusqu'au stade C, pendant la mise en place des couches cuticulaires, puis chutent au stade D en raison de la dilution de l'hémolymphe due à l'absorption de l'eau au moment de l'exuviation. Chez les

individus traités les concentrations hémolympatiques et les taux dans la chair en protéines, lipides et glucides diminuent considérablement, probablement en raison d'un ralentissement de la synthèse de la cuticule, due à l'action du D.F.B sur la sécrétion cuticulaire.

En ce qui concerne les résultats du dosage des résidus de dimilin dans l'eau de mer témoin et traitée avec ce pesticides (10 µg/l de matière active) mettent en évidence une absence du composé dans l'eau de mer témoin et une dégradation en laboratoire de cette molécule au cours du temps dans de l'eau de mer contaminée. Au bout de 2 semaines de traitement la concentration dans l'eau de mer n'est plus que de 6µg/l.

En perspective ce travail mérite d'être poursuivi par des dosages de caroténoïdes, une détermination du profil électrophorétique des protéines hémolympatiques et cuticulaires, une étude de la synthèse de la chitine par l'utilisation d'un précurseur marqué et enfin d'un dosage des résidus de dimilin dans divers organes de la crevette, afin d'obtenir des informations complémentaires sur l'action de cet insecticide chez *P.kerathurus* et traiter ces crevettes avec des doses plus élevées afin de déterminer l'effet toxique de ce dernier.

REMERCIEMENTS :

Les auteurs tiennent à remercier Pr G. Smagghe (université de Gand) pour le don de l'insecticide. Cette étude a été financée par le Fond algérien pour la recherche scientifique et par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique de la République Algérienne (projet C N E P R U. Pr. N. Soltani).

RESUMES

6. RESUME:

Ce travail porte sur l'effet du Dimilin une formulation commerciale d'un régulateur de croissance, insecticide dérivé de la diphenylbenzoyl urée, sur *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapota) au cours du cycle de mue. Cet insecticide est utilisé à grande échelle dans la lutte des ravageurs notamment des forêts.

L'insecticide est additionné dans l'eau d'élevage des crevettes à des doses de 1 et 10 ug de matière active/l. Les crevettes sont exposées au Dimilin au stade A jusqu'au stade C (intermue) où la minéralisation et le dépôt des couches cuticulaires sont achevés.

La composition biochimique de la cuticule chez les séries témoins montre que le taux de chitine cuticulaire augmente au cours de la période allant du stade A jusqu'au stade C pour atteindre une valeur maximale au stade D. Pour les taux de protéines cuticulaires, on note que les taux les plus élevés sont observés au cours de la post-mue (stade A et stade B), et les valeurs en sels calciques révèlent que le taux le plus faible est au stade A et il est variable au niveau des stades B, C et D. Concernant l'effet du Dimilin on enregistre chez les séries traitées une réduction significative du taux de la chitine et une augmentation significative pour le taux de protéines. Enfin, le Dimilin est sans effet sur le taux des sels calciques.

L'étude histologique et ultrastructurale du tégument après traitement confirme l'action du Dimilin sur la sécrétion cuticulaire avec une réduction de l'épaisseur de la cuticule et une modification de son aspect architectural.

L'évolution des constituants biochimiques (protéines, lipides et glucides) au niveau de l'hémolymphe et la chair a été précisée chez les témoins et les séries traitées. Chez les crevettes témoins, l'évolution montre une augmentation au stade C. En post-mue et à la veille de l'exuviation, ces teneurs diminuent. Le dimilin à la dose de 1ug/l, pendant 24 heures, provoque une réduction de ces taux chez les individus traités.

Les résultats des résidus dans l'eau de mer montrent une absence du composé dans l'eau de mer témoin et une diminution au cours du temps des taux dans l'eau de mer contaminée à une concentration de 10µg/l dans les aquariums. Ces résultats obtenus appuient l'hypothèse d'une action inhibitrice sur sécrétion de la cuticule *via* la synthèse de la chitine.

Mots clés : *Penaeus kerathurus* – Crustacés – Cycle de mue- Composition biochimique – Histologie et ultrastructure de la cuticule- HPLC et résidus – Dimilin – Chitine –

Abstract

The study was the subject of several studies in the laboratory of applied biology. This work deals with the effect of Dimilin, a commercial formulation of a growth regulator, insecticide derived from urea diphenylbenzoyl on kerathourus *Penaeus* (Crustacea, Decapota) during the moult cycle. This insecticide is widely used in the fight against pests including forests.

The insecticide is added in the shrimp culture water at doses of 1 and 10 ug of active matter/l. Shrimp are exposed to Dimilin in stage A to stage C (intermolt), where mineralization and deposition of cuticular layers are completed.

The biochemical composition of the cuticle in the control series showed that the rate of cuticular chitin have increased during the period from stage A to stage C to reach a maximum value at stage D. The highest rates of protein levels were observed during the post-molt (stage A and stage B), and values in calcium salts indicated that the lowest rate was in stage A and was variable at stages B, C and D.

Regarding the effect of Dimilin, a significant reduction of chitin and a significant increase in the protein rates were observed. Finally, Dimilin has no effect on the rate of calcium salts.

The histological and ultrastructural study of the integument after treatment confirmed the action of Dimilin on cuticular secretion with a reduction in the thickness of the cuticle and a change in its architectural appearance.

The evolution of biochemical components (proteins, fats and carbohydrates) at the hemolymph and the flesh has been clarified in the controls and after treatment. In control shrimp, the evolution showed an increase in stage C. However, in post-molt and just before moulting, these levels decreased significantly. The dose of Dimilin at 1ug/l for 24 hours caused a reduction in these rates among the treated individuals.

The results of seawater residues showed an absence of these compounds in the control of sea water and a decrease over time in the rate of sea water contaminated with a concentration of 10 µg/l in the aquariums. These results support the hypothesis of an inhibitory action on the secretion of the cuticle via chitin synthesis.

Keywords: *Penaeus kerathurus*- crustacean-molting cycle -biochemical composition- Histology and ultrastructure of the cuticle- HPLC- Dimilin-chitin.

المخلص

الدراسة التي أجريت كانت ضمن عدة أعمال طبقت في مختبر البيولوجيا التطبيقية. تناول هذا العمل تأثير مبيد الحشرات Dimilin المنظم للنمو على دورة انسلاخ القشري *Penaeus kerathourus*. يستخدم هذا المبيد على نطاق واسع لمكافحة الآفات بما في ذلك آفات الغابات.

أضيف هذا المبيد إلى ماء تربية الجمبري بجرعة 1 و 10 ميكروغرام من المادة النشطة/ل. عرض القشري إلى المبيد في طور A إلى طور C ، حيث يتم الانتهاء كلية من تمعدن وترسب الطبقات الجليدية.

بين التركيب البيوكيميائي للجليد عند سلسلة من الشواهد زيادة في معدل الكيتين الجليدية خلال الطور من A إلى C ، حتى وصلت أقصى معدل لها في الطور C. وصلت معدلات البروتين إلى أقصى قيمة لها في الطورين A و B، كما كانت معدلات أملاح الكالسيوم متدنية في الطور A ومتغيرة في الطور B، C و D.

سجل تأثير المبيد في سلسلة من المعاملات، حيث لوحظ انخفاض معنوي في معدل الكيتين وزيادة كبيرة في معدل البروتينات، كما لم يظهر أي تأثير له على معدل أملاح الكالسيوم. أكدت الدراسة النسيجية والتركيبية الدقيقة بعد المعاملة التأثير الواضح للمبيد على الإفرازات الجليدية، مع انخفاض في سماكة الجليد وحدوث تغيير في مظهره التركيبي.

لقد تم توضيح تطور المكونات البيوكيميائية (البروتينات، الدهون والكربوهيدرات) على مستوى الهيموليمف والجسد. أظهرت زيادة خلال الطور C. انخفضت هذه المكونات بعد طور الانسلاخ وبعد التعرض للجرعة 1 ميكروغرام/ لتر لمدة 24 ساعة.

بعد استعمال مياه البحر في أحواض السمك، أظهرت النتائج غياب بقايا المبيد في الفوج الشاهد، وانخفاض معدلها على مر الزمن في مياه البحر الملوثة بتركيز 10ميكروغرام/لتر. هذه النتائج تدعم فرضية حصول تثبيط بشكل خاص على إفراز الجليد عن طريق التأثير على تخليق الكيتين.

كلمات المفتاح : P.kerathurus- القشريات-دورة الانسلاخ-التركيبية البيوكيميائية- الانسجة و التركيب الدقيق للانسجة-dimilin-HPLC-كيتين.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- Abdelmomen AH. & Mumma R.O., 1981.** Development of an analytical procedure for An insect growth regulator (EL-494) employing high-pressure liquid chromatography and its application on residues. *Agric. Food chem.*, 29:75-78.
- Achou M. & Soltani N., 1997.** Impact of *Varroa jacobsoni* on the morphometry and biochemical composition of hemolymph in honeybees *Apis mellifera intermissa* L. *Parasitica.*, 53: 127-134.
- Adersen S.** annual review of entomology, 1979, 24, pp 29-61.
- Aktar, M.W., D. Sengupta and A. Chowdhury, 2009.** Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1): 1-12.
- Ali A., Nigg N., Stamper J.H., Kok-Yakomi M. L. and Weaver M., 1988.** Diflubenzuron application of Citrus and its impact on in vertabrates in an adjacent pond. *Bull. Environment. Contamination and Toxicology*, 41, pp781-790.
- Amrani, L., Zerguine, K., Farine, JP., Smaghe, G. & Soltani Mazouni, N., 2004.** Imidazole derivative KK -42 reduces ecdysteroid titers and interferes with reproductive processus in adlt females of *Tenebrio molitor*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 80: 163-172.
- Andrieux N., Berreur-Bonnenfant J., Herberts C., 1976.** Composition protéique de L'hémolymph des Crabes *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky sains ou parasites par *Sacculina carciny* Thompson. *C.R.A cad.Sci.*282, D, 2091-2094.
- Andrieux N., Herbert C., de Frescheville J., 1980.** Métabolisme protéique et Parasitisme chez le crabe *Carcinus maenas*. Effet de *Sacculina* carcine (Crustacé, Phisocéphale) sur les proteines seriques et epidermiques de l'hote *J.Can.Zool.*, 58 :580-585.
- Andrieux N., Herbert C., de Frescheville J., 1981.** Relations hote-parasite chez les Crustacés *Carcinus* et *Sacculina carcini* :Effet d'extraits de parasitr de l'hémolymph de Crabes infestés sur le proteinogramme de Crabes sains -*Annales de parasitologie (Paris)*,t.56,n°4 ,pp441-448.
- Ansenne A., Compere PH. Et Gaffinet G., 1988** Organisation, Sclérotisation et Composition minérale des sclerites d'une espèce d'Isopode marin et de quatre espèces d'Isopodes terrestres oniscoïdes. *Actes de colloques*, 8. IFREMER, pp 39-46.
- Aribi N. & Lakbar C., 2001.** Effects du puriproxyfène sur certains aspects physiologiques du developpement de *Tenebrio molitor* (coleoptra Tenebriomidae). *Synthèse*, 9 : 78-94.
- Aribi, N., Smaghe, G., Lakbar, S., Soltani- Mazouni, N., & Soltani, N., 2006.** Effet of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *pestic.biochem. physiol.*, 8:55-62.

- Arun Kumar, M.S and A. Jawahar Ali., 2013.** Toxic impacts of two organophosphorus pesticides on the acetylcholinesterase activity and biochemical composition of freshwater fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 4(2): (B/P) 966 - 972.
- Arzul G, Bocquené G, Claisse D, Grossel H, MarchandM, Munsch C, Tissier C, Tixier C & Tronczynski J., 2004.** Strategie pour la surveillance des produits phytosanitaires en milieu marin côtier. 45 p.
- Attoum, D., & Bouzid, .S., 2000.** Contribution à l'étude hydrologique et sédimentologique d'un facies de *Donax trunculus* dans la plage d'El Chat (golfe d'Annaba).
- Azzouz., 1981. In Derbal, F., 1991.** Inventaire des crustacés Benthiques du golfe d'Annaba. Cycle cuticulaire et ses corrélations métaboliques au cours du cycle de mue chez *Orchestia cavimana* Heller 1965 (Crustacé, Amphipode) et *Penaeus kerathurus* Forskal 1775 (Crustacé, Décapode). Mémoire de Magister. Université d'Annaba. 110p.
- Bhavan P.S. & P. Geraldine., 2002.** Carbaryl induced alterations in biochemical metabolism of the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*, Journal of Environmental Biology, 23, 157-162.
- Barclay M. C., Dall W. & Smith D. M., 1983** Changes in lipid and protéins during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus exulentus* Haswell., 68 : 229-244.
- Barour, C., Tahar, A., Radloff, S.E. & Hapburn, H.R., 2005.** Multivariate analysis of honeybees, *Apis mellifera* Linneaus (Hymenoptera : Apidae) of the northeastern and southern regions of Algeria. *Afric. Entomol.*, 13(1) : 17-23.
- Beldi, H., Gimbert, F. Maas, S., Scheiffler, R. & Soltani, N., 2006.** Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusca, *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from gulf of Annaba, Algeria. *Afric. J.Agricul. Res.*, 1(4) : 85-90.
- Bendjedou F, Bouslema Z, Chebira S & Soltani N., 1988.** Effects of flucyclosuron a benzyphenylurea devirative, on growth developement and cuticle secretion in *Ephetia kuehniella*. Med. Fac. Landlouw.W Univ. Gent., 63(2b) : 575-580.
- Berghiche, H., Houamria, M., van develde, S., Soltani, N., & Smagge G., 2008.** Effect of two insect growth regulators on the ecdysteroid contents in eggs of the mealworm. Belg. J. Zool., 138 (2) : 140-145.
- Bezzazel N & Soltani,N., 2001.** Contribution à la physiologie de la crevette *Penaeus kerathurus* : Secretion cuticulaire, correlation métabolique et hormonale. Thèse de Magister en science de la mer . Option biologie et physiologie animale. Option, Ecotoxicologie. Université d'Annaba .

- Binnington, K & Retnakaran, A., 1991.** Epidermis: A biologically active target for metabolic inhibitors, pp. 307-334. In K. Binnington & A. Retnakaran (eds.), *physiology of the insect epidermis*. CSIRO Publications. Australia.
- Bocquené, G & Galgani, F., 1998.** Cholinesterase inhibition by organophosphorus and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science*. 22, 13.
- Bocquené, G., Roig, A., & Fournier, D., 1997.** Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). *FEBS Letters*. 14, 1-6.
- Bordereau C. & Andersen S. O., 1978.** Structural cuticular proteins in termite queens. *Comp. Biochem. Physiol.* 60 B , 251-256.
- Boudjelida H, Bouaziz A, Smaghe G & Soltani N., 2002.** Insecticidal activity of a non steroidal moulting hormone agonist on mosquito larvae and effects on escysteroid amounts. *Med . Fac. LandlouW.W. Univ.Gent.* 67 : 657-663.
- Boudjelida, H., Aissaoui, L., Bouaziz, A., Smaghe, G. & Soltani, N., 2008.** Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac WDG) against mosquito larvae, *Culex pipiens* and *Culiseta longiareolata*. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent.*, 73 (3) : 603-609.
- Bouligand Y., 1965.** Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthropodes. *C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*261 : 3665-3668.
- Bouligand Y., 1972.** Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissus an cell*, 4, pp 189 -217.
- Bouligand Y., 1988.** Problèmes de morphogénèses cuticulaires chez les crustacés. Actes de colloques 8. Ifremer, pp 13-32.
- Bourguet J.P & Exbrayat J.M., 1977.** Quelques aspects de la croissance, du développement sexuel et du métabolisme chez *P.japonicus*. Influence des facteurs externes et internes. Thèse Doctorat de spécialité. Université USTL, Montpellier. France 128p.
- Bradford M. M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding analyt. *Biochem.* 72, 248, 254.
- Brannon, A.C., & Rao, K.R., 1979.** Barium, strontium and calcium levels in the exoskeleton, hepatopancreas and abdominal muscle of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. Relation to molting and exposure to varite. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63 (A): 261-274.
- Bretscher R., 1973.** In : Variations de la concentration des protéines totales hémolympatiques et dans la chair d'une espèce de crevette (*Penaeus kerathurus*) en fonction de la taille et au cours de la transformation sexuelle de l'individu. D.E.S. en Biologie marine. Université d'Annaba.
- Bruce A, Dennis B, Julian L, Martin R, Keith R Lames D.W., 1987.** Biologie moléculaire de la cellule. Edition Flammarion. Médecine science . (Edition spéciale étudiants), Paris.

- Cardinal H., Vernet G. & Sinigre G., 1979.** Quelques effets d'un inhibiteur de croissance : le Diflubenzuron sur un Crabe *carcinus mediterraneus* (Czerniavsky). C. R. Soc. Biol., 173, pp1105-1108. Biologie. Compte rendus n°6 , T.173.
- Chan S. M., Ankin S. M. & Keeley L. L., 1988.** Caractérisation of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. Biol. Bull., 175:185-192.
- Chandrakala, P., P. Ravindra & M. Malkanna., 2008.** Neuroendocrine regulation and pesticidal impact on freshwater crab, *Barytelphusa guerini* (H. Milne Edwards). Journal of Environmental Biology, 29(6): 887- 892.
- Chang E. S. & O'connor J. D., 1977.** Secretion of ecdysone by organs in vitro. Prog. Natl. Acad. Sci., 74 : 615-618.
- Chang E. S. & O'Connor J. D., 1978.** In vitro secretion and hydroxylation of ecdysone as a function of the Crustacean molt cycle. Gen. Comp. Endocr., 36: 151-160.
- Chebira, S., Soltani, N., Muylle, S. & Smaghe, G., 2006.** Uptake distribution of three insect growth regulators diflubenzuron, flucycloxuron and halofenozide in pupae and adults of *Tenebrio molitor*. Phytoparasitica., 34 (2) : 187-196
- Chen A. C. & Mayer R. T., 1985.** Insecticides: effects on the cuticle, pp 57-74. In G. A. kerkut et L. I. Gilbert (eds). Comprehensive insect biochemistry, physiology and pharmacology, vol. 12, Pergamon press, Oxford.
- Chouahda, S., Sifi, K., & Soltani, N., 2005.** Toxicité du cadmium et de l'halofénozide chez les alvins d'un poisson culiciphage *Gambusia affinis* : croissance et activités enzymatiques. Bulletin I.N.S.T.M. **10**, 137-140.
- Christiansen, M.E., Gosling, E. & Williams, M.A., 1984.** Effect of the insect growth regulator diflubenzuron (Dimilin ®) on the uptake of glucose and N- accetylglucosamine into the cuticle of crab larvae. *Marine Biology*. 83, 225-230.
- Christiansn M. E. & J. D. Costow Jr., 1982.** Ultrastructural study of exoskeleton of the estuarine Crab *Rhithropanopeus harrisu*: effect of the insect growth regulator Dimilin^R (diflubenzuron) on the formation of the larval cuticle. *Marine Biology*, 66 : 217-226.
- Clarke, B.S., & Jewess, P.J., 1990.** The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera Littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and biflubenzuron. *Pestic. Sci.* 28, 377-388.
- Cognie D., 1970.** Contribution à l'étude de la biologie de *Penaeus kerathurus* (Crustacé, Décapode) en fonction du cycle d'intermue. Thèse Doctorat de spécialité. Université Aix Marseille II. 83p.

- Cohen E., 1987.** Interference with biosynthesis in insects. In : J. E. Wright, and A. Retnakaran, eds., Chitin and benzoylphenyl ureas. Pp 43-74. Dr. W. Junk publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Cohen E. & Casida J., 1980.** Inhibition of *Tribolium* guts chitin synthetase. *Pestic Biochem. Physiol.*, 13 : 129-136.
- Compere Ph., 1988.** Mise en place de l'épicuticule chez le Crabe *Carcinus maenas*.
Aspects récents de la biologie des Crustacés. Actes de colloques, 8. IFREMER, pp47-54.
- Coppage, D.L., & Matthews, E., 1974.** Short-term effects of organophosphate insecticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2(5), 438-48
- Costlow J.D., 1979.** Effect of Dimilin^R on development of larvae of the stone Crab *Menippe mercanaria*, and the blue Crab, *Callinectes sapidus*. Duke University marine laboratory Beaufort, North Caroline
- Cunningham P. A. 1976.** Effects of Dimilin (TH 6040) on reproduction in the brine shrimp, *Artemia salina*. *Environ. Environ. Entomol.* 5 : 701 – 706.
- Cunningham P. A. & Myers L. E., 1987.** Effects of Diflubenzuron (Dimilin^R) on survival, Molting and Behavior of Juvenile Fiddler Crabs, *Uca pugilator*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 16, pp 745 -752. Springer – Verlag New York.
- Daas T, Bouzerna N. & Descamps M., 1996.** Développement post-embryonnaire et cycle biologique d'*Eupolybothrus elongatus* (Newport) dans l'Est Algérien. *Mem. Mus. Natur. Hist. Nat.*, 169 :365-370.
- Daas T, Scaps P, Bouzerena N. & Descamps M., 2007.** Effect of two ecdysteroid analogs (RH-0345 and RH-2485) on the total growth of *Eupolybothrus nudicornis* (Myriapoda: Chilopoda). *Life Environ.* 1-5.
- Dall, W., 1965a.** Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus sp.* (Crustacea: Decapoda: Penaeidea). III. Composition and structure of the tegument *Austr. J. mar. Freshwat. Res.*, 1, 13-23.
- Dall, W., 1965b.** Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus sp.* (Crustacea: Decapoda: Penaeidea). V. Calcium metabolism. *Austr. J. mar. Freshwat. Res.*, 16, 181-203.
- Dall, W., 1965c.** Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus sp.* (Crustacea: Decapoda: Penaeidea). IV. Carbohydrate metabolism. *Austr. J. mar. Freshwat. Res.*, 16, 163-180.
- Damien G, His E, Gnassia-Barelli M , Quiniou F & Romeo M., 2004.** Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and physiology*, part C., 138, 121 – 128.

- De Cock, A., & Degheele, D., 1998.** Buprofezine a novel chitin synthesis inhibitor affecting specifically planthoppers, whiteflies and scale insects. In: Ishaaya I., Degheele, D., (eds.), *Insecticides with Novel Modes of action. Mechanism and Application.* Springer. 74-91.
- De Loach, J., Meola, S., Mayer, R., & Thompson, M., 1981.** Induction of DNA synthesis by diflubenzuron in pupae of the stable fly, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 15, 172.
- Degheele P., 1990.** Chitin synthetis inhibitors. Effects on cuticle and componements . in : J Casida (eds). *Pesticides and alternatives.* Elsevier Amsterdam., 377-388.
- Delachambre J., 1970.** Etude de l'épicuticule des insectes. I. Le développement de l'épicuticule chez l'adulte de *Tenebrio molitor*. *Z. Zellforsch. Microsk. Anat.*, 108 : 380 – 396.
- Dennell R., 1947.** The occurrence and significance of phenolic hardening in the newly formed cuticle of Crustacea Decapoda. *Proc. R. Soc.*, 134(B), 485-503.
- Derbal F. & Soltani. N., 2008.** Cycle cuticulaire et variations de la protéinémie et de la lipémie chez la crevette Royale *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) des cotes est Algériennes .Science et technologie C-n° 28 : 80-86.
- Derbal F., 1991.** Inventaire des Crustacés Benthiques du golfe d'Annaba. Cycle cuticulaire et ses corrélations métaboliques au cours du cycle de mue chez *Orchestia cavimana* Heller 1965 (Crustacé, Amphipode) et *Penaeus kerathurus* Forskal 1775 (Crustacé, Décapode). Thèse de Magister I.S.N. Annaba. 110 p.
- Deul D. H.; B. J. de Jong & J. A. M. Kortenbach., 1978.** Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2,6 – disubstituted benzoyl) -3- phenylurea insecticides. II- pesticide Biochemistry and physiology 8 : 98-105.
- Dhadialla T.S. & Ross R., 2007.** Bisacylhydrazines: Novel Chemistry for Insect Control, In: W. Kramer and U. Schimer, Eds., *Modern Crop Protection Compounds.* Wiley-VCH, Weinheim, pp: 773-79
- Dhadialla T.S., Retnakaran A., & Smagghe G., 2005.** Insect growth and development disrupting insecticides. In : Gilbert, L.I., Kostas, I., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Insect Molecular Science*, Vol. 6. Elsevier, Oxford, UK, pp. 55-116.
- Dhadialla T.S., Retnakaran A., & Smagghe G., 2010.** Insect growth- and developmental-disturbing insecticides. In: L.I. Gilbert, and S.S Gill (eds.). *Insect Control.* Elsevier, New York, pp. 121-184.
- Dorto L., Lambardi D & Turillazzi S., 2008.** Not only cuticular lipids: first evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus*. *Journal of Insect Physiology*, 54: 89-
- Drach P.T & chernicovtzeff C., 1967.** Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie et milieu.* 18, 595-609.

- Drach P., 1939.** Mue et cycle de mue chez les Crustacés décapodes. Ann. Inst. Oceanogr. Paris. 19, 103 – 392.
- Drach P., 1944.** Etude préliminaire sur le cycle de mue et son conditionnement hormonal chez *Leander serratus* (pennant). Bull. Biol. Fr. Bel . 78, 40-61.
- Drach P., & Lafon M., 1942.** Etudes biochimiques sur le squelette tégumentaire des décapodes brachyours (variations au cours du cycle d'intermue). Arch. Zool. Exp. Gen., 82, 100-118.
- Drardja-Beldi H. & Soltani N., 2003.** Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathione activity in mosquito fish, and target species. Comm. Agri. Appl. Bio. Sci., 68 (4a): 299-305.
- Du Y., X. Shi C. Liu K. Yu & Zhou B., 2009.** Chronic effects of water-borne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: a partial life-cycle test. Chemosphere, 74: 723–729.
- Duchateau G. & Florkin M., 1959.** Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. Arch. Int. Physiol. Bioch. 67, 306-314.
- Fatima H., Z. Ayub & S.A. Ali., 2013.** Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). Turkish Journal of Zoolgy, 37: 334-347.
- Filshie B. K. & Waterhouse D. F., 1969.** The structure development of a surface patten on the cuticle of the green vegetable bug *Nezara virudula*. Tissue and cell, 1(2), 367-385.
- Filshie B. K., 1970.** The fine structure and deposition of the larval cuticle of the sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). Tissue and cell, 2(3), 479-498.
- Filshie B. K., 1982.** Fine structure of the cuticle of Insects and others Arthropds. In : Insect Ultrastructure, vol. I, édité par R. C. King et H. Akai plenum press, New York, London, 281-312.
- Forskal., 1775 in Derbal F., 1991.** Inventaire des Crustacés Benthiques du golfe d'Annaba. Cycle cuticulaire et ses corrélations métaboliques au cours du cycle de mue chez *Orchestia cavimana* Heller 1965 (Crustacé, Amphipode) et *Penaeus kerathurus* Forskal 1775 (Crustacés, Décapode). Thèse de Magister. I.S.N. Annaba 110p.
- Friend S. S. & Farquhar M. E., 1967.** Functions of coated vesicles during protein absorption in the ratvas de ferens. J. Cell. Biol., 35 : 357-376.
- Galois R., 1980.** Le métabolisme des lipids chez *P.japonicus bate* : teneur en eau et incorporation de lipides dans les tissus au cours du cycle d'intermue. Thethys. 9 :371-377.

- Galois R., 1983.** Aspects du métabolisme lipidique chez quelques Crustacés Décapodes *Natantia*, en particulier au cours de la vitellogénèse et de l'embryogénèse Thèse d'état. Université. Aix Marseille. France 273p.
- Galois R., 1984.** Variation de la composition lipidique tissulaire au cours de la vitellogénèse chez la Crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards. S. Exp. Mar. Biol. Ecol., 84 : 155-166.
- Galois R., 1987.** Les lipides neutres chez les Crustacés Décapodes : métabolisme et besoins. *Oceanis*, Fasc. 2(13) : 197-215.
- Gheid S., 2006.** Effets secondaires d'un xénobiotique (Halofénozide) sur un organisme non visé : *Penaeus kerathurus* (Crustacé, Décapode) : Aspects biochimique et histologique. *Mémoire de magister. Université d'Annaba. 91p.*
- Gljswijt. J. Deul D. H. & DE Jong B. J., 1979.** Inhibition of chitin syntheses by benzoylphenylurea insecticides. III Similarity in action in *Pieris brassicae* L. with polyoscin D. *pestic. Biochem. Physiol.*, 12, pp 87-94.
- Giraud Guille M. M., 1984a.** Fine structure of the chitin – protein system in the Crab cuticle In : *Tissue and cell*. 16(1). P 75-92.
- Giraud Guille M. M., 1984b.** Les matrices extracellulaires analogues de cristaux liquides. Structure et biominéralisation. Exemple de la cuticule du Crabe *Carcius maenas*. Thèse d'état, université de Parsi VI.
- Glodsworthy G. J., Mordue W. & Guthkelch J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocr.* 18, 545-551.
- Gnatzy W. & Romer F., 1984.** Arthropods: Cuticle : Formation, moulting and control.
- Goffinet G., Raich. D & Vass- Foucart M.F., 1987** – Alternation morphologique et chimique de la carapace du Crabe *carcinus menas* au cours des stades oreecdysiaux.
- Gooday G.W., 1990.** The coology of chitin degradation in *Advances in Microbial Ecology*, Vol 11 (Edited by Marshall K. C), pp. 387 – 430. Plenum press, New York and London.
- Gottschalk A., 1972.** Glycoproteins, composition, structure and function, 2 ed., 2 vols, Elsevier, Amsterda
- Grosscurt A. C., 1978.** Diflubenzuron: Some aspects of its ovicidal and some larvicidal modification and evaluation of its practical possibilities. *Pestic. Sci.*, 9, 37
- Grosscurt A.C., Ter Haar M., Jongmsa B., & Stocker A., 1987.** PH-70-32: A new acaricide and insecticide interfering with chitin deposition *Pestic. Sci.* 22, 51-59.
- Gulka G., Doshier C. M. & Watabe N., 1980.** Toxicity and molt accelerating effects of diflubenzuron on the Barnacle, *Balanus eburneus*. *Bull, environmental Contamination and Toxicology.* 25, pp 477-481.

- Gulka G., Gulka C. M. & Watabe N., 1982.** Histopathological effects of Diflubenzuron on the Cirripede Crustacean, *Balanus eburneus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 11, pp 11-16.
- Gwinn J.F., & Stevenson J.R., 1973 a.** Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish. I. Correlation of: 4C-acetylglucosamine incorporation with stages of the molting cycle. Comp. Biochem. Physiol., 45:17, 769-776.
- Gwinn J.F., & Stevenson J.R., 1973.** Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish. II. Enzymes in the epidermis for incorporation of acetylglucosamine into UDP-acetylglucosamine. Comp. Biochem. Physiol., 45(B) 777-784.
- Habes D, Morakchi S, Aribi N, Farine J.P & Soltani N., 2006.** Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alteration in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. Pest. Biochem. Physiol., 84 :17-24.
- Hackman R. H., 1984.** Cuticle. Biochemistry. In biology of the integument, vol.1, invertebrates (Edited by Bereiter –Hahm J., Matolsky A. G. and Richards K.S.) pp 583-610. Springer Verlag, Berlin.
- Hadley N., 1986.** La cuticule des Arthropodes, pour la science. Pp : 63-72 Revue.
- Hamdani A & Soltani-Mazouni N. , 2011.** Changes in biochemical composition of gonads of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria) in relation to reproductive events and pollution. Jordan Journal of Biological Sciences, 4(3): 149-156.
- Hamdani A., Soltani-Mazouni N & Soltani., 2014.** Quantitative and qualitative analysis of proteins in gonads of *Donax trunculus* from the Annaba Bay: effects of site, season and sex. Advances in Environmental Ishaaya, I. Biology, 8(13): 740-749.
- Hami M., Taibi F & Soltani-Mazouni N., 2004.** Effects of flucucloxuron, a chitin synthesis inhibitor, on reproductive events and thilness of chorion in mealworms, Appl. Biol. Sci., 69(3)), 249.
- Hepburn H.R., 1976.** The insect integument. Elsevier Scientific Pullishing Company (Amsterdam).
- Hepburn H.R., 1985.** Structure of the integument. In Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Eds. G.. Kerkut & L.I. gilbert, Pergamon Press (Oxford), 3, 1-58.
- Herberts C., Andrieux N. & DE Frescheville J., 1978.** Variation des proteines de l'hémolymph et de l'hypoderme au cours du cycle de mue chez *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky : analyse électrophorétique et imminochimique. Can P. Zool. 56 : 1735-1743.
- Hohnke L.A., 1971.** Enzymes of chitin metabolism in the decapods, *Hemigrapsus nudus*. Comp. Biochem Physiol., 40(B) 757-779.

- Holthuis L.B., 1980.** Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries F.A.O. Species catalogue. F.A.O. fish. Synop. 215 I, FIR/S 125, 271p.
- Holthuis L.B., 1987.** In Fiches F.A.O. d'identification des espèces pour les besoins de la pêche Méditerranéenne et Mer noire, zone de pêche 37. 1, végétaux et Invertébrés. Red. Fisher, W., Schneider, M. & Bauchot, M.L. 760p.
- Holthuis L.B., & Gottlieb E., 1958.** An annotated list of the Decapoda of the Mediterranean Coast of Israel, with an appendix listing the Decapoda Eastern Mediterranean. *Bull. Res. Coun. Israel.* 7, 1-126.
- Hornung D.E. & Stevenson J.R., 1971.** Changes in the rate of chitin synthesis during the crayfish molting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40(B), 341-346.
- Horowitz A.R. & Ishaaya I., 2004.** Biorational insecticides- mechanisms, selectivity and importance in pest management, In: A.R. Horowitz, I. Ishaaya I, Eds., *Insect Pest Management.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 1–28.
- Hu A.S.L., 1958.** Glucose metabolism in the crab, *Hemigrapsus nudus.* *Arch Biochem. Biophys.* 75, 387-395.
- Humennik F.J., Smolen M.D., & Dressing S.A., 1987.** Pollution from non point sources. *Environ. Svi. Technol.* 21(8), 737-742.
- Huner J.V & Avault J.E., 1976.** Postmolt calcification in subadult red swamp crayfish, *Procambarus clarkia* (Girard) (Decapoda, Cambaridae). *Assoc. S. E. Boil. Bull.*, 23, 68-73.
- Hunter E. & Vincent J.F.V., 1974.** The effects of a novel insecticide and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 4: pp 484-490.
- Ifen ., 2004.** Les pesticides dans les eaux. Sixième bilan annuel, données 2002. *Etudes et travaux.* 42, 32.
- Illerton J. E., 1984.** Cuticle. Mechanical properties. In *Biology of the Integument*, vol. 1, Invertebrates (Edited by Bereiter – Hahn J., Matolsky A. G. and Richards J. S.) pp 626-637.
- Ihunter E. & Vincent J. F. V., 1974.** The effects of a novel insecticide and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 4: pp 484-490.
- Ishaaya I & A.R. Horowitz., 1998.** Insecticides with novel modes of action: an overview, In: Ishaaya I, Degheele D, Eds., *Insecticides with novel modes of action, mechanism and application.* Springer, Berlin, pp: 1–24.
- Ishaaya I & Cacida J.E., 1974.** Dietary TH 6070 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 4, 484.
- Ishaaya I., 2001.** Biochemical processes related to insecticide action: an overview. In: Ishaaya I. (ed.), *Biochemical sites of Insecticide Action and Resistance.* Springer, Berlin. 1-16.

- Ishaya I & Asher K. R. S., 1977.** Effects of diflubenzuron on growth and carbohydrate hydrolases of *Tribolium castaneum*. *Phytoparasitica*, 5: 149-158.
- Ishaya I., 1990.** Benzoylphenyl ureas and other selective control agents: mechanism and application, pp 365-376. O*In J. E. Casida (de.), pesticides and alternatives. Elsevier science, Amsterdam.
- Ishi S., & Matsumura F., 1992.** Diflubenzuron-induced changes in activities of the CAMP-dependent proteinkinase in the newly molted integument of the American cockroach in situ and in cell free conditions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22, 69-79.
- Jacob F. & Monod J., 1961.** Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Biol. Med.* N° 3, pp 318-321.
- Jeuniaux Ch., 1964.** Chitine libre et chitine masquée dans les structures squelettiques d'invertébrés. *Archive internationales de physiologie*.
- Jeuniaux Ch, Campere p & Goffind G., 1986-** Structure, synthèse et dégradation des chitioprotéines de la cuticule des crustacés décapodes. *Bull. Zool.*, 53 : 183-196.
- Jeuniaux ch., 1963.** Chitine et chitinolyse (chapitre de la biologie moléculaire) Masson, Paris, 181p.
- Jeuniaux Ch., 1982.** La chitine dans le règne animal, *Bull. Scien. Zool. France*, 107 : 363-386.
- Kaestner, A., 1970.** Invertebrat zoology, Vol. III. *Interscience Publishers*, New York.
- karlovac O., 1959.** Peneidae et Pandalidae Présentent un intérêt économique et decouverte d'espèces nouvelles en Adriatique . *Proc. Gen. Fish. Counc. Medit.*, 5, 299-302.
- Karnovsky M. J., 1965.** Formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 24: 137A.
- Kaufmann C. & Brown., 2008.** Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Insect Physiology*, 54: 367-377.
- Ker E. F., 1978.** Investigation of locust using the insecticide diflubenzuron. *J. Insect physiol.* 23: 39.
- Khebbeb M.E.H, Gaouaoui R. & Bendjeddou F., 2008.** Tebufenozide effects on the reproductive potentials of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella* Afric. *J. Biotech.*, 7(8) : 1166-1170.
- Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P., Smaghe, G. & Soltani, N., 2006.** Cuticular hydrocarbon profils in *Blattella germanica*: effects of halofenozide, boric acid and benfuracab. *Comp. Appl. Biol Sci, Ghent.* 71 (2b) : 555-562.

- Kincaid, F. D., & B.T., 1952.** Hormonal control of metabolism in crustaceans IV. Relation of tissue composition of *Hemigrapsus nudus* to intermolt cycle and sinus gland. *Physiol. Zool.*, 25, 372-380.
- Kleinholz, L. H., 1941.** Molting and calcium in decapods crustaceans *J. Cell. Physiol.*, 18, 101-107.
- Kuballa, A & A. Elizur., 2007.** Novel molecular approach to study moulting in crustaceans. *Bulletin Fisheries Research Agency*, 20: 53-57.
- Lafon, M., 1941.** Sur la composition tégumentaire des crustacés. *C. r. Seanc. Soc. Biol.* 135, 1003-1006.
- Lafon, M., 1943.** Recherches biochimiques et physiologiques sur le squelette tégumentaire des Arthropodes. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Animale.*, 11, 113-146.
- Lafon. M., 1948.** Nouvelles recherches biochimiques sur le squelette tégumentaire des crustacés. *Bull. Inst. Oceanorg., Monaco.*, 45, 1-28.
- Lagardere, J.P., 1971.** Les Crevettes des côtes du Maroc. Travaux de l'institut scientifique chérifien et de la faculté des sciences, série Zoologie n° : 36. Pp. 29-30.
- Lang, R., 1971.** Chitinsynthese bei dem Fluss krebs *Orconectes limosus* : Aktivit-it der Phosphoglucosamin-isomerase und Einbau von Glucose-U-14C in Chitin. *Z. vergl. Physiol.*, 73, 305-316.
- Lautier., J. & Vernet, G., 1972.** Composition du métabolisme lipidique de l'hépatopancréas de *Pachygrapsus marmoratus* Fabricius (Décapode, Brachyours). Chez les animaux témoins et après des pédoncules articulaires en fonction du cycle d'intermue. *C. R. Acad. Série D.*, 275 : 1899-1902.
- Le Roux Karine & Jean – pascal Bergé., 2012.** Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de produits de crevettes *Penaeus vannamee*. Caractérisations de produits et optimisation du procédé.
- Lechekheb, H. & Soltani, N., 2009.** Impact d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine (dimilin^R) sur la composition biochimique de la cuticule de *Penaeus kerathurus*. *Bulletin de l'INSTM NS*, 13: 96-100.
- Lechekheb, H & Soltani N., 2009.** Effets secondaires d'un insecticide sélectif (Dimilin) sur un organisme non ciblé *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda) : Composition biochimique de la cuticule et mesure de deux biomarqueurs. Thèse de Magister université d'Annaba.
- Leighton, T. Marks, E & Leighton, F., 1981.** Pesticides, insecticides and fungicides are chitin synthesis inhibitors. *Science*, 213: 905-907.
- Loke M., 1966.** The structure and formation of the cuticulin layer in the epicuticle of an insect. *Calpodetes ethlius* (Lepidoptera, hespirudae). *J. Morph.*, 118: 461-494.

- Loke M., 1969.** The structure of epidermal cell during the development of the protein epicuticle and the uptake of molting fluid in an insect. *J.Morph.* 127: 7-40.
- Loke M., 1976.** The role of the plasma membrane plaques and Golgi complex vesicles in cuticle deposition during the moult/intermoult cycle, in: *The insect Integument*, édité par H. R. Hepburn Elseviser, Amsterdam, 237-258.
- Long E.R., 2000.** Degraded sediment quality in us estuaries: Areview of magnitude and ecological implication *Ecol. Appl.*, 10 (2), 338 – 350.
- Loucif-Ayad W, Aribi N. & Soltani N., 2008.** Evaluation of secondary effects of some acaricides on *apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): acetylcholinesterase and glutathione S- transferase activities. *Europ. J. Sci. Res.*, 21(4): 642-649.
- Lumare F., 1978.** Etat actuel des connaissances sur les espèces cultivables en Méditerranée. *PNUE/FAO (CGPM) Consultation d'experts sur le développement de l'aquaculture en Méditerranée (en collaboration avec le Gouvernement grec) Athènes.* 13-18.
- M C Cauley D.J, De Graeve G.M, & Linton T.K., 2000.** Sediment quality guidelines and assessment: overview and reserch needs. *Environmental science et policy.* 3, 133-144.
- Mahler H., & Cordes E., 1968.** Biological chemistry, Harper and Row. In; Maïza, A., kilani, S., Farine, J.P., Smaghe, G., Aribi, N. & Soltani, N., 2004. Reproductive effects in German cockroaches by ecdysteroid agonist (RH-0345), juvenile hormone analog (methoprène and carbamate benfuracab). *Comm. Appl. Boil. Gent University.* 69(3), 257-266.
- Maiza A, Killani S, Farine J.P, Smaghe G, Aribi N & Soltani N ., 2004.** Reproductive eg*ffects in German Cockroaches by ecdystéroid agonist RH – 0345, Juvenile hormone analogue methropene and carbanate benfuracarb. *Commun Agric Appl Biol Sci*; 4, 69 (3) 257-66.
- Malher H. & Cordes E., 1968.** Biological chemistry, Harper and Row.
- Mann P & Ghomb E., 1983.** The effect of temperature on growth ammonia of the Manila clam *Tapes japonica*. *Estuary. Coast. Mar. Sci.*, 6: 335-339.
- Marks E. P. & Sowa B. A., 1974.** Mecanism of pesticide action. ACS symposium serie, n°2, pp 145-155. *Ann. Chem... Soc.*, publishers Washington D. C., Ed., G. K. Kohm.
- Martoja A. R & Martoja P. M., 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Ed. masson et Cie. Paris VI.345p.
- Mayer R. T, Chen A. C. & de Loach J. R., 1980.** Characterization of a chitin synthetase from the stable fly, *Stomoxys calcitrans* L., *Insect Biochem.* 10: 549-556.
- Mayer R. T., Chen A. C. & De Loach J. R., 1981.** Chitin synthesis inhibition insect growth regulators do not inhibit chitin synthetase. *Experiential*, 37: 337-338.

- Meenakshi V.R., & Scheer B.T., 1961.** Metabolism of glucose in crabs *Cancer magister* and *Hemigrapsus nudus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 3, 30-41.
- Meola S. & Mayer R., 1980.** Inhibition of cellular proliferation of the imaginal epidermal cells by diflubenzuron in pupae of the stable fly. *Science.*, 207, 985.
- Merzendorfer H., 2013.** Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Science* 20: 121-138..
- Mikolajczyk P., Oberlander H., Silhacek D.L., Ishaaya I., & Shaaya E., 1994.** Chitin synthesis in *Spodoptera frugiperda* Wing imaginal discs. I. fluazuron, diflubenzuron, and teflubenzuron inhibit incorporation but not of (¹⁴C) N-acetyl-D-glucosamine. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 25, 245-258.
- Mitsuit T, Nobusawa, Fukami J. I, Colins J. & Riddiford L. M., 1980a.** Inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in *Manduca* larvae. *J. pest. Sci.*, 5 : 335-341.
- Mokrash L. C., 1954.** Analysis of hescose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *J. bio. Chem.*, 208: 55-59.
- Mondal K. & Parween S., 2000.** Insect growth regulators and their potential in the management of stored-product insect pests. . *Integrated Pest Management Reviews*, 5: 255–295
- Morsli M.S. & Soltani N., 2003.** Effets d'un insecticide inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron sur la cuticule de la crevette *Penaeus kerathurus*. *Journal de Recherche Océanographique*, 28(1-2) : 85-88.
- Mulder R. & Gijswijt M.J., 1973.** The laboratory evolution of two promissig new insecticides wich interfere with cuticule deposition *pest. Sci.*, 4:737-745.
- Munoz- P. & Ceccaldi H. J., 1987.** Variation des protéines de l'hémolymph pendant le cycle de mue, chez *P. kerathurus*. 15(2) : 263-267.
- Munoz-Sevilla P., 1982.** Contribution à l'étude de l'hémolymph de *Penaeus kerathurus* et *P. japonicus* (Crustacés, Décapodes). Thèse Doctorat 3^{ème} cycle océanologie. Université Aix Marseille II, France. 142.
- Neville, A.C., 1975.** Biology of the arthropod cuticle. *Springer-verlag* (New York).
- Halloran M.J & O Dor R.K., 1988.** Molt cycle of male snow Crabs *Chionoectes opilio*, from observation of external features, setal changes and feeding . bhaviour. *I. Crust. Biol.*, 8(2), 164-176.
- O'brien J.J. & Skinner D.M., 1988.** Characterization of enzymes that degrade crab exoskeleton. II. Two acids proteinase activities. *Journal of Experimental Zoology*, 246: 124-131.
- O'connor J. D. & Gilbert L. I., 1968.** Aspect of lipids metabolism in crustaceans, *Amer, Zool.* 8 : 529-539.

- O'connor J. D. & Gilbert L. I., 1969.** Aspect of lipids metabolism associated with premolt events in a blood Crab and fresh- Water Grayfish. *Comp. Biochem.* 29: 889-904.
- Oberlander H & Sihacec D.L., 1998.** New perspectives on the mode of action of benzoylphenylurée insecticides. In Ishaya I, Degheele D. (eds), insecticides with novel modes of action. Springer- Verlag, Berlin, Germany 92-105.
- Oberlander H., 1976.** Hormonal control of growth and differentiation of insect tissues cultured in vitro. 12, 225-235.
- Oberlander H; Silhacek D; leach C.E & Ishaaya E., 1991.** Benzoylphenyl ureas inhibit chitin synthesis without interfering with amino sugar uptake in imaginal *wind discs of Plodia interpunctella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 18, 219-227.
- Ouakid M.L. Farine J.P. & Soltani N., 2005.** Effets des extraits de plantes associés au chêne-liège sur l'attraction en enceinte des chenilles de *Lymantria dispar*. *IOB/wprs Bull.*, 28(8) : 171-178.
- Parant M., 1998.** Le metabolism des xénobiotiques chez les bivalves. C.R. Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie., 321, 485-49.
- Passano L. H., 1960.** Molting and its control in: *The Physiology of crustacean*. WATTE J. F. et C. PEASE, 1993. Détection des pesticides des systems immune-enzymatiques. *Biofutur*, 129 : 59-64.
- Pillette J.F & Pease C., 1993.** Detection des Pesticides des systèmes immuno-enzymatiques. *Biofutur*, 129 : 59-64.
- Post L. C, De Jong B. J. & Vincent W. R., 1974.** 1- (2.6 – disubstutued benzoyl)-3 phenylurea insecticides. Inhibition of chitin synthesis. *Pest. Biochem. Physiol.*, 4: 473-483.
- Post L. C. & Vincent W. R., 1973.** A new insecticide inhibits chitin synthesis. *Naturwissenschaften*, 60: 431-432.
- Pouget J., 2009.** In wich cases does molicular biology allow a diagnosis inneuromuscular pathology. *Rev. Neurol (Paris)*. 165 spec n° 2 : F9-73.
- Poulicek M & Jeuniaux C., 1991.** Chitin biodegradation in marine environements; Anexpermental approach. *Biochemical Systimatics and Ecology* 19, 385-394.
- Prabu K. & Natarajan E., 2012.** Bioprospecting of shells of crustaceans. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4):1-3.
- Promwikorn W., Boonyoug P & Kirirat P., 2005.** Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin Journal of Sciences and Technology*, 27 (3): 765-772.
- Ramade F., 1992.** *Precis d'ecotoxicologie*. Collection d'Ecologie 22, Masson, Paris, 70 – 171.

- Rehimi N. & Soltani N., 1999.** Laboratory evolution of alsystine. A chitin synthesis inhibitor agonist *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Effects on development and cuticle secretion. J. Appl. Ent., 123: 437-441.
- Rehimi N., 1992.** تأثير ثلاثة مركبات جديدة الذرات. الأتدلين و الألسستين على يرقات كل من الطور الثالث و الرابع. النشاط الحيوي للمبيدات، الأنماط المرفولوجية الناجمة، الدورة الجليدية و مدة التطور
- Retnakaran A. & wright J.E., 1987.** Control of insect Pest with benzoylphenyl ureas. In : wright, J.E., Retnakaran, A. (Eds), Chitin and Benzoylphenyl ureas Dr. W.junk Publishers, Dordrecht, Netherlands, 205-282.
- Retnakaran A., Granett J. & Ennis T., 1985.** Insect growth regulators in: Kerkut G. A. and Gillert L. I. Comprehensive insect physiology. Biochemistry and pharmacology. Vol 12 New York: 530-601.
- Reynolds G. S., 1963.** The use of lead citrate et high pH as an electron opaque stain to the moting. Comp. Biochem. Physiol. 1: 183-212.
- Robertson N. L, Bray W, Leung-Trujillo J. & Lawrence A., 1987.** Practica molt staging of *Panaeus setiferus* and *Panaeus stylirostris*. L. Worlit. Aquac. Soc. 18 (3): 180-185.
- Rodriguez-Ortega M. J.,Grosvik B.E; Rodriguez-Ariz ;Goksoy A & Lopez-Barea., 2003.** Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. Proteomics, 3(8):1535–1543.
- Sansri S., 2008.** Effet secondaire d'un xénobiotique (RH-0345) sur un organisme non visé : *Panaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda) : Aspects biochimique et hormonal. Thèse de Magister. Université de Annaba. 80 p.
- Sarkar S; Ray D; & Sshrivastava A.N., 2006.** Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicol. 15: 333-340.
- Sarvana Bhavan, P & Geraldine p., 1997.** Alternations in concentrations of protein, carbohydrates, glycogen, free sugar and lipid in prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to sublethal concentration of endosulfan. Pesticide Biochemistry and Physiology, 58: 89-10
- Schalfer J., K. J., Garbow J. R., Jacob G.S., Stejkal E., Hopkins T. L. & Spurs R. ,1987.** Anomalous cross – links in insect cuticle: detection by solustade ¹³C and ¹⁵N NMR. Science 235, 1200-1204.
- Scheltes P., Hoffman T.W & Grosscurt A.C., 1988.** Field data on PH-70-23, a novel benzoylphenylurée controlling mites and insects in a range of crops. Brighton crop Protection conference, pests and diseases. 559-566.
- Schmidt W. J., 1924.** Die Bausteine des Tierkörpers in polarisiertemlichte. Fr. Cohen Verlag, Bonn Cf.pp 247-257.

- Scott G.R; Sloman K.A., 2004.** The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators on toxicity. *Aqua. Toxicol.*, 68: 369-392.
- Sepulveda M; Quinn B; Densolow N; Holm S & Gross T., 2003.** Effects of pulp and paper mill effluents on reproductive success of largemouth bass. *Environ . Toxicol. Chem.*, 1: 205-213.
- Sevend Olav A., 1991.** Cuticular proteins from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B (2) 453-458.
- Shibko S., Koivistoinen p., tratyneck C., New hall E & Feidman L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction.
- Sifi K ; Chouahda S & SOLTANI N., 2007.** Biosurveillance de l'environnement par la mesure de biomarqueurs chez *Donax trunculus* (L., 1758) dans le golfe d'Annaba (Algerie). *Mesogée*. Volume 3 : 11-18.
- Skinner D. M., 1985.** Molting and regeneration. In : the biology of the Crustacea . Bliss, D. E. and Mantel L. H. eds. *Acad. N. Y.* 9 : 43-146.
- Skinner D.M., 1985.** Molting and regeneration. *in: The Biology of the Crustacea*. Bliss D.E & Mantel L.H., Eds., NY, 9, pp: 43- 146,
- Soltani - Mazouni N. & Soltani N., 1992.** Effets du diflubenzuron sur les métabolites hémolymphatiques et ovariens chez *T. molitor* L. pendant la maturation sexuelle. *Mém. Soc. Belgge ent.* 35 : 743 – 747.
- Soltani – Mazouni N., Boukachabia A. & Smagghe G., 2004.** Biological activity of some molting hormone agonists in mealworms: ecdysteroids and protein synthesis in ovaries. *Rev. Sci. Technol. (Synthèse)*, 7-10.
- Soltani N; Chebira S; Delbecque J. P & Delachambre J., 1993 .** Biological activity of flucycloxyuron, a novel benzoyphenyl urea derivative on *Tenebrio molitor* comparaison With diflubenzuron and triflumuron. *Experienta.*, 49 (12), 1088 – 1091.
- Soltani N; Delachambre J & Delbecque J. P., 1989.** Stage specific effects of diflubenzuron on ecdysteroid titer during the development of *Tenebrio molitor*: evidence for a change in hormonal source. *Gen. Comp. Endocr.*, in press.
- Soltani N ; Delachambre J. & Mauchamp B., 1983.** Effets du diflubenzuron sur la nymphe de *T. molitor* L (Coleoptera, Tenebrionidae). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 108 (4) : 498-703.

- Soltani N ; Desson M. T. & Delachambre J., 1984.** Effects of diflubenzuron on pupal adult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae) : growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21: 256-264.
- Soltani N ; Quenedey A ; Delbecque J. P. & Delachambre J., 1987.** Diflubenzuron induced alterations during in vitro development of *Tenebrio molitor* pupal integument. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 5: 201-209.
- Soltani N & Soltani – Mazouni N., 1992.** Diflubenzuron and oogenesis in codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Pestic. Sci.*, 34 : 257-261.
- Soltani N., 1990.** Action du diflubenzuron et de la 20 – Hydroxyedysone sur les glucides et les protéines hémolymphatiques chez les nymphes de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera : Tenebrionidae). *Annls Soc. Ent. Fr. (N. S.)* , 26 (4) : 575 – 584.
- Soltani N. & Rehim N., 2001.** Laboratory evaluation of Andalin, a new insecticide interfering with cuticle deposition, against *Culex pipiens*. *Algerian Journal of Medicine* 1 (XI), 28–33.
- Soltani N & Soltani-Mazouni N., 1995.** Effet du diflubenzuron en traitement in vivo et in vitro sur la morphométrie de l’ovaire de *Tenebrio molitor*. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent.*, 60(35), 961-967.
- Soltani N & Soltani-Mazouni N., Quenedey B., & Delachambre J., 1996.** Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under in vitro condition: Effects of diflubenzuron. *J. Stored Prod Res.*, 32(3), 205-212.
- Soltani N., Aouadene A. & Chouahda S., 2005.** Surveillance de la qualité des eaux du golfe d’Annaba (Algérie) par la mesure d’un biomarqueur du stress environnemental chez *Donax trunculus*. *INOC-Marine & Coastal Protected Areas.*, 462-467 pp.
- Soltani N & Bezzazel N., 2002.** Profil des ecdystéroïdes hémolymphatiques et corrélations avec la sécrétion cuticulaire au cours d’un cycle de mue chez la crevette, *Penaeus kerathurus*. *J. Rech Océanogr.*, Vol. 27, fasc. 3(4) : 22-231.
- Soltani N., Chouahda S. & Smaghe G., 2008.** Evaluation of halofenozide against prey mosquito larvae *Culex pipiens* and the predator fish *Gambusia affinis*: impacts on growth and enzymatic activities. *Comm. Appl. Biol. SCi. Ghent.*, 73 (3) 659-666.
- Soltani N., H. Lechekhab & Smaghe G., 2009.** Impact of the insect growth regulator diflubenzuron on biochemical composition of cuticle of the shrimp *Penaeus kerathurus*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 74(1): 137-141.
- Soltani N., Aribi ;N Berghiche H ;Lakbar & Smaghe G., 2002.** Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion in *Tenebrio molitor* pupae in vivo and in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72: 83-90.

- Soltani-Mazouni N., Khebbeb M.E.H & Soltani N., 1999.** Production d'ecdystéroïdes ovariens durant la maturation des oocytes chez *Tenebrio molitor*. Annales de la Société Entomologique de France, 35: 82-86.
- Sowab B. A. & Marks E. P., 1975.** An in vitro system for the quantitative measurement of chitin synthesis in the cockroach inhibition by TH 60-40 and polyscin D. Insect Biochem., 5: pp 855 – 559.
- Spates G. E. & Wright J.E., 1980.** Residues of diflubenzuron applied topically to adult stable flies. J. Econ. Ent. 73: 595-598.
- Speck U., Urich K., & Herz-Ht-Bner U., 1972.** Nachweis einer Regulation des Glucosaminbildung bei dem Flusskrebs *Orconectes Limosus* zur Zeit der H/-utung. Z. vergl. Physiol., 7,341-346.
- Spinler K. D., Keller R. & O'connor J. D., 1980.** The role of ecdysteroids in the Crustacean molting cycle in progress In Ecdysone Research. (Hoffmann J. A., ed) 247-280.
- Staal G.B., 1982.** Insect control with growth regulators interfering with the endocrine system. Entomol. Exp . App., 31, 15-23.
- Steele J. E., 1981.** The role of carbohydrate metabolism in physiological function, pp 101-133. In R.G.H. Downer (ed.). Energy metabolism in insects. Plenum press, New York.
- Stegeman J.J. & Hahn M.E., 1994.** Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome p450 in aquatic species. In: Malins, D.D. et ostrander, G.K. (Eds).Lewis.Bica Raton.
- Stenvenson J. R., 1985.** Dynamics of the integument. In the biology of Crustacean (Edited by Bliss P. E. and Mantel L. H.), vol.9, pp 1-42. Academic press, New York and London.
- Stevenson J.R., 1972.** Changing activities of the crustacean epidermis during the molting cycle. Am. Zool., 12, 373-380.
- Sundaram K. M. S & Noth R., 1980.** High performance liquid chromatographie method for the determination of diflubenzuron from forestry substrates. Journal of liquid chromatography, 12: 2333-2343.
- 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., 135:257-267. Thèse de Magister I.S.N Annaba, p 182.
- Theshima S & Kanazawa A., 1980.** Lipids transport in Crustaceans. Mar. rep. Data files fisch. Res. 1: 1-25.
- Theshima S. Kanazawa A & Okamoto H., 1977.** Variation in lipids classes during the molting cycle of the prawn *Penaeus japonicas*. Mar. Biol. 39: 129-139.

- Thompson A. C & Sikorovski P. P., 1982.** Hemolymph analysis of irradiated and Dimilin – treated boll weevils *Anthonomus grandis*. J. Insect path., 39: 158-163
- Thorez A., Compere PH. & Goffinet G., 1988.** Aspect ultrastructuraux de la biodegradation de l'ancienne cuticule de *Carcinus meanas* Durant la période préecdysiale. Actes de colloques, 8 : IFREMER, pages 55-64.
- Tine- Djebbar F. & Soltani N., 2008.** Activité biologique d'un agoniste non stéroïdien de l'hormone de mue sur *Culiseta longiareolata* : analyses morphométrique, biochimique et énergétique. *Rev. Sci. Technol. (synthèse)*, 18 : 23-34.
- Touart L. W & Rao K. R., 1985.** Influence of diflubenzuron on survival, molting and limb regeneration in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. In: Pollution physiology of estuarine organisms edited by W. B. Vernberg A. Calabrese F. P. Thurberg and F. J. Vernberg. Univ. of South Carolina press, Columbia, S. C., pp 333-399.
- Travis D. F., 1955.** The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille III. Physiological changes which occur in the blood and urine during the normal molting cycle. *Rap. Biol. Bull.* 109 (3) : 484-503.
- Travis C.C., 1993.** Use of biomarkers in assessing health and environmental impacts of chemical pollutants. Nato ASI series. Series A life sciences. New York plenum press./ 284p.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. & Scoullou M., 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64 : 178-189.
- Van Daalen J.J., Meltzer J., Mulder R., & Wellinga K., 1972.** A selecticide with a novel mode of action. *Naturwissenschaften.* 59,312-313.
- Van Der Qost R., Beyer J. & Vermeulen N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13 : 713-721.
- Van Erp S., Booth L., Gooneratne R. & O'halloran K., 2002.** Sublethal responses of wolf spiders (Licosidae) to organophosphorous insecticides. *Environmental Toxicology.* 17, 449-456.
- Van Heusden M. C. & J. H. Law., 1989.** An insect transport particulate promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry.* 264: 17287-17292.
- Vight D.A. & Dendinger J.E., 1982.** Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, *Comp. Biochem. Physiol.*, 72(A), 35-369.
- Vitzou A. N., 1982.** Recherches sur la structure et la formation des teguments chez les Crustacés Décapodes. *Archives. Zool. Expt 1. Et Gén.*, 1, 140 : pp 451-467.

- Walker A. N. & Horst M. N., 1992.** Effect of Diflubenzuron on chitin synthesis in the post molt Blue Crab *Callinectes sapidus*: A morphologic study using an in vitro explants culture system. *Journal of Crustacean biology*, 12 (3): pp354-360.
- Weis J.S.R., Cohen & Kwiatkowski J., 1987.** Effects of diflubenzuron on limb regeneration and molting in the fiddler Crab, *Uca pugilator*. *Aquatic Toxicology*, 10: 279-290. Elsevier.
- Weis J.W, Cristini A, & Rao K.R., 1992.** Effect of pollutants on molting and regeneration in Crustacea . *Am. Zool.* 32, 49S-500.
- Welinder B.S., 1975a.** The crustacean cuticle-II. Depositin of organic and inorganic material in the cuticle of *Astacus fluviatilis* in the period after moulting. *Comp. Biochem. Physiol.* **51(B)**, 409-416.
- Wight D.A & Dendinger J.E., 1982.** Temporal relation ships of postmolt deposition of calciums magnesium, chitin and protein in the cuticle of atlantic blue crab, *Callinectes sapidus rathbun*. *Comp. Biochem. Physiol.* , 72 (A), 365-369.
- Welinder B. S., 1974.** The Crustacean cuticle. I.Studies on the composition of the cuticle.*Comp.Biochem.*47 (A), 779-787.
- Wu R.S.S., W.H.L. Siu & P.K.S. Shin., 2005.** Induction, adaptation and recovery of biological reponses: implication for environemental monitoring.*Maritime Pollution Bulletin*, 51:623-634.
- Wyatt G. R., 1967.** The biochemistry of sugars and polysaccharide in insects. *Adv. Insect physiol.*, 4: 287-360.
- Yu S. J. & Terriere L. C., 1977.** Ecdysone metabolism by soluble enzymes from tree species of dipteral and its inhibition by the insect growth regulator TH 60-40. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 7 pp 48-88.
- Zaidi N., Farine JP. & Soltani N., 2013.** Experimental study on diflubenzuron: degradation in freshwater and bioconcentration in mosquitofish following chronic exposure. *Journal of Environmental Protection*, 4 (2): 188-194.
- Zaidi N., 2005.** Effets secondaires d'un insecticide sélectif (Dimilin) sur un organisme non ciblé, *Gambusia affinis* : croissance, activités enzymatiques et analyse par CLHP des résidus. *Mémoire de Magister. Université d'Annaba. Algérie.* 32p.
- Zaidi N. & Soltani N., 2011.** Environmental Risks of Two Chitin Synthesis Inhibitors on *Gambusia affinis*: Chronic Effects on Growth and Recovery of Biological Responses. *Biological Control*, 59: 106-113.
- Zariquiey Alvarnez R., 1952.** Crustaceos Decapodos recogidos por el Dr. Rutlant en aguas de Melilla. *Faun.Mogreb.* 1-52.

Zimowska G., Milkolajczyk P., Silhacek D.L. & Oberlander H., 1994. Chitin synthesis in *Spodoptera frugiperda* Wing imaginal discs. II. Selective action of chlofluazuron on wheat germ agglutinin binding and cuticle ultrastructure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*,

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

8. PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Communications:

- *Journée mondiale de l'environnement 5 juin 1994. Hôpital Central de l'armée (Alger)*
- *3^{ème} journées nationales d'enseignement post-universitaire en pharmacie Annaba : 28 -29 mai 1995*
- *Colloque international d'hydrogéologie. Annaba ;19 et 20 octobre 1999*
- *3^{ème} journées de recherche sur les productions animales .Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou .13, 14,15 novembre 2000.*
- *Séminaire Internationale "Biologie et Environnement" .20, 21,22 Octobre 2002. Constantine.*
- *2^{ème} journée de l'environnement de Constantine 17, 18,19 Février 1997*
- *Journée de la mer "océan 98" Hôtel international, Alger 12,13 mai 98*
- *5^{ème} congrès international de Limnologie-océanographique "CILO" Paris du 9 au 12 septembre 2002 (orale et affichée).*
- *3^{ème} congrès Franco-Tunisien de zoologie Tabarka-Tunisie du 3 au 7 Novembre 2006.*
- *6^{ème} Congrès Maghrébin des Sciences de la mer,17 au21 Decembre2005.Tunis.*
- *8^{ème} journées Tunisienne des sciences de la mer, 16 au19 décembre 2006.Tunis.*
- *2^{ème} Colloque Euro-méditerranéen de biologie Environnementale du7au8 Décembre 2006 muséum d'histoire naturelle. Marseille.*
- *Séminaire international (U.S.N.B) 2015.Monastir (Tunisie).*
- *8^{ème} Congrès Magrébin des Sciences de la mer du 4au7Novembre 2007.Maroc.*
- *9^{ème} journée Tunisienne des science de la mer, 15au18 Decembre2007.Tunis.*

Publications:

- *Revue des sciences et de la technologie université d'Annaba (synthèse N°9 , mars 2001,pp : 114-121.*
- *Journal de recherche océanographique. 2003, vol.28, FASC.1 et 2 (2pub)*
- *Revue des sciences et technologie de la mer 6^{ème} congrès des sciences de la mer du 18 au 22 décembre 2005. Tunisie (Monastir).*
- *Publication in Advances in Environmental Biology, 9(3) February 2015, pp: 518-525.*