



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE

THESE

Présentée En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat

Spécialité: Biologie Animale et Environnementale

Option: Reproduction et Développement

Intitulé

Effet *in vivo* d'un agoniste de l'hormone de mue le Méthoxyfénozide, sur la reproduction et le développement des chrysalides femelles d'un ravageur des denrées stockées : *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae).

Présentée par: M^{me}. Djihen CHERIROU- BAKLI

Membres de Jury:

M. Nouredine SOLTANI	Pr. Président	Université B.M-Annaba
M ^{me} . Leila KIRANE-AMRANI	Dr. Directeur de thèse	Université B.M-Annaba
M ^{me} . Nedjouda ZAIDI	Dr. Examinatrice	Université de Skikda
M ^{me} . Aicha TADJINE	Pr. Examinatrice	Université d'El-Taref
M. Abdelhamid BOUDJELIDA	Pr. Examineur	Université B.M-Annaba

Année Universitaire: 2016-2017.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	01
MATERIEL ET METHODES.....	08
1. Matériel biologique	08
1.1. Présentation de matériel biologique.....	08
1.2. Cycle de vie d' <i>E. kuehniella</i>	09
1.3. Condition d'élevage.....	09
2. Présentation de l'insecticide.....	11
3. Doses et traitement.....	11
4. Morphométrie de l'ovaire.....	11
5. Techniques histologiques.....	13
6. Analyse quantitatif et qualitatif des protéines ovariennes.....	14
6.1. Etude électrophorétique des protéines ovariennes.....	14
6.1.1. Extraction des protéines ovariennes.....	15
6.1.2. Principe de l'électrophorèse.....	15
6.2. Dosage des protéines ovariennes.....	19
7. Quantification des vitellogénines et des vitellines.....	19
7.1. Prélèvement des ovaires.....	19
7.2. Extraction et dosage des vitellogénines et des vitellines.....	20
8. Analyse statistique.....	20
CHAPITRE 1 : Impacts sur la reproduction	
1. INTRODUCTION.....	21
2. RESULTATS.....	25

2.1. Effet du méthoxyfénoside sur la morphométrie de l'ovaire.....	25
2.1.1. Effet du méthoxyfénoside sur la taille de l'ovocyte basale.....	25
2.1.2. Effet du méthoxyfénoside sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire.....	31
2.2. Effet du méthoxyfénoside sur les protéines ovariennes.....	34
2.2.1. Effet du méthoxyfénoside sur la quantité des protéines ovariennes.....	34
2.2.2. Effet du méthoxyfénoside sur profil électrophorétique des protéines ovariennes.....	36
2.3. Effet du méthoxyfénoside sur les vitellogénines et les vitellines dans les ovaires.....	38
2.3.1. Effet du méthoxyfénoside sur les vitellogénines dans les ovaires.....	39
2.3.2. Effet du méthoxyfénoside sur les vitellines dans les ovaires.....	40
3. DISCUSSION.....	41
3.1. Effet sur la morphométrie de l'ovaire.....	41
3.2. Effet sur l'épithélium folliculaire.....	43
3.3. Effet sur la structure de l'ovaire.....	44
3.4. Effet sur les protéines ovariennes.....	46
3.5. Effet sur les vitellines et les vitellogénines.....	48

CHAPITRE 2 : Impacts sur le développement

1. INTRODUCTION.....	50
2. RESULTATS.....	55
2.1. Effet du méthoxyfénoside sur la sécrétion cuticulaire.....	55
2.1.1. Effet du méthoxyfénoside sur l'épaisseur de la cuticule nymphale totale.....	55

2.1.2. Effet du méthoxyfénoside sur l'épaisseur de la nouvelle cuticule.....	56
2.2. Effet du méthoxyfénoside sur la structure du tégument sternal abdominal.....	59
3. DISCUSSION.....	61
3.1. Effet du méthoxyfénoside sur la sécrétion cuticulaire.....	61
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	65
RESUMES.....	67
Français.....	67
Anglais.....	68
Arabe.....	69
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	70
ANNEXE	

Liste des figures

N°	Titre	Titre
01	Cycle de développement d' <i>E. kuehniella</i> à 27°C. (Yezli-Touiker, 2014).	10
02	Formules de structure de la 20-hydroxyecdysone et de quelques agonistes de l'hormone de mue (Dhadialla <i>et al.</i> , 2005).	12
03	Contrôle de la reproduction chez les insectes. CNS: cellules neurosécrétrices, NHAT: neurohormone allatotrope, NHAST: neurohormone allatostatique, JHBP: juvenil hormone binding proteins, FCSH: follicle cells stimulating hormone, CGP: cellules germinales primordiales (Cassier <i>et al.</i> , 1997).	24
04	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la longueur (µm) de l'ovocyte basal d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).	27
05	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la largeur (µm) de l'ovocyte basal d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).	28
06	Coupes histologiques montrant l'évolution de la taille de l'ovocyte basale prélevés sur des chrysalides femelles d' <i>Ephestia kuehneilla</i> à différentes âges au cours de la métamorphose (x 40).	29
07	Section longitudinal des ovarioles chez des chrysalides d' <i>E.kuehniella</i> témoin et traité avec le méthoxyfénoside (DL 50, DL90) (x10).	30
08	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de l'épithélium folliculaire d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).	32
09	Coupes histologiques montrant l'évolution de l'épithélium folliculaire chez la série témoin prélevés sur des chrysalides femelles d' <i>Ephestia kuehneilla</i> à différentes âges au cours de la métamorphose (x 40).	33
10	Dosage des protéines ovariennes, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg) (BSA).	34
11	Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside (DL50, DL90), administré par application topique à l'exuviation nymphal, sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h) chez <i>E. kuehniella</i> . (m ± s, n = 5).	35
12	Courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (KDa) des protéines standards en fonctions de leurs mobilités relatives (a : Myosin; b : B Galactosidase; c : Phosphorylase b; d : Bovine serum albumin).	37
13	Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines ovariennes des femelles adultes d' <i>E.kuehniella</i> témoins et traitées avec le méthoxyfénoside comparée à celle des protéines marqueurs.	38

14	Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénozide RH-2485 (DL50, DL90) sur le contenu en vitellogénines dans les ovaires ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm s$, $n = 5$).	39
15	Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénozide RH-2485 (DL50, DL90) sur le contenu en vitellines dans les ovaires ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> ($m \pm s$, $n = 5$).	40
16	La biosynthèse de l'ecdysone (Gilbert & Rewitz, 2009).	53
17	Contrôle hormonal des différents types de mue chez les insectes (Truman & Riddiford, 1999).	54
18	Mode d'action des ecdysteroides (Klowden,2010).	54
19	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01 μg , 0,37 μg / 2 μl) sur l'épaisseur (μm) de la cuticule nymphal d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, $n = 6$).	57
20	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01 μg , 0,37 μg / 2 μl) sur l'épaisseur (μm) de la nouvelle cuticule d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm s$, $n = 6$).	58
21	Coupes histologiques montrant le tégument sternal abdominal prélevés sur des chrysalides femelles d' <i>E. kuehneilla</i> à différentes âges au cours de la métamorphose (A; B; C; K ;L x 10), (D; E; F; G; H; I x 40).	60
22	Représentation schématique des événements se produisant au niveau du tégument pendant le cycle de mue (d'après Hadley, 1986).	64

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Composition des gels (Running gel, Staking gel).	16
02	Composition du tampon de migration (Running buffer).	16
03	Composition du tampon d'échantillons.	17
04	Composition de la solution de la coloration.	18
05	Composition de la solution de rinçage.	18
06	Composition de la Solution de décoloration.	18
07	Dosage des protéines chez <i>E. kuehniella</i> : Réalisation de la gamme d'étalonnage.	19
08	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la longueur (µm) de l'ovocyte basal d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).	27
09	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la largeur (µm) de l'ovocyte basal d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).	28
10	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de l'épithélium folliculaire d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).	32
11	Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard.	34
12	Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside (DL50, DL90), administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>E. kuehniella</i> sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± s, n = 5).	35
13	Poids moléculaire et mobilités relatives des fractions protéiques des différentes protéines standards.	36
14	Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM Da) des différentes fractions protéiques des ovaires d' <i>E. Kuehniella</i> témoins et traitées au RH-2485 (DL50, DL90) par application topique à l'émergence des chrysalides.	37
15	Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside RH-2485 (DL50, DL90) sur le contenu en vitellogénines dans les ovaires (µg/mg) chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s, n = 5).	39
16	Effet <i>in vivo</i> du méthoxyfénoside RH-2485 (DL50, DL90) sur le contenu en vitellines dans les ovaires (µg/mg) chez les adultes d' <i>E. kuehniella</i> (m ± s, n = 5).	40

17	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de la cuticule nymphal d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 6).	57
18	Effet <i>in vivo</i> d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de la nouvelle cuticule d' <i>E. kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 6).	58

INTRODUCTION GENERALE

Les denrées stockées remonte jusqu'à la récente histoire de l'humanité, au moment où l'homme commençait à stocker ses denrées alimentaires afin de subvenir à ses besoins pendant les périodes difficiles où la nourriture se faisait rare, l'homme doit sans relâche protéger ses réserves alimentaires. Les pertes de production avant récolte des cultures mondiales majeures dues aux ravageurs (insectes, micro-organisme) et aux adventices sont estimées à 35 %. Sans une protection efficace des cultures, ces pertes seraient de 70 % (Popp *et al.*, 2013).

Les pesticides sont actuellement utilisés dans de nombreux domaines comme la santé publique, l'hygiène vétérinaire, la protection des denrées alimentaires, les usages domestiques ou encore l'entretien des espaces publics. Cependant, ces produits restent principalement utilisés dans le domaine agricole afin d'accroître, de stabiliser les rendements et d'assurer une meilleure rentabilité de la production alimentaire (Nauen & Bretschneider, 2002; Calvet *et al.*, 2005). Leur utilisation a également contribué à l'amélioration de la santé publique en luttant contre certains insectes vecteurs de maladies (Ramade, 2011). De ce fait, ils sont devenus un enjeu économique et sanitaire important. Néanmoins, leur utilisation massive dans l'environnement peut perturber plusieurs systèmes physiologiques tels que la croissance, la reproduction et le métabolisme des organismes non visés (Kegley *et al.*, 1999).

L'usage des pesticides en agriculture existe depuis des millénaires. D'abord, on utilisait des composés relativement simples à base d'arsenic, de soufre, de chaux, ensuite des dérivés du pétrole et des substances à base de fluor ou extraits de plantes comme la nicotine (Philogène *et al.*, 2002). Cependant, ce n'est qu'au XIXe siècle que l'utilisation des pesticides a connu un développement important justifié par l'accroissement démographique de la population humaine, l'affaiblissement des terres agricoles et l'apparition du machinisme agricole. Depuis, les traitements des cultures sont à base de sulfate de cuivre ou de mercure. Les insecticides tels l'arsénite de cuivre, l'acétoarsénite de cuivre, l'arséniate de plomb et le pyrèthre ont fait leur apparition. Au cours de la seconde guerre mondiale, les pesticides ont profité très largement du développement de la chimie organique avec l'apparition des insecticides de synthèse qui sont majoritairement des composés organochlorés. Le dichlorodophenyltrichloroethane (DDT) fut très efficace dans la lutte contre les insectes ravageurs comme les moustiques vecteurs du paludisme. D'autres

organochlorés, furent utilisés comme l'hexachlorocyclohexane (HCH), l'endosulfan, l'aldrine ou la dieldrine. Cependant, ces molécules ont provoqué des effets secondaires; par leur bioaccumulation dans la chaîne alimentaire, leur rémanence et leur toxicité élevée chez les Mammifères (Hoffman & Lorenz, 1998; Bonde *et al.*, 2008).

Afin de faire face aux problèmes de toxicité et d'effets néfastes, les industries chimiques ont développé au cours de la seconde moitié du XXe siècle, une deuxième génération d'insecticides de synthèse dont le principe actif est différent. Ce sont les organophosphorés (téméphos, malathion), les carbamates (carbaryl, propoxur) et les pyréthriinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine). Ces insecticides à action neurotoxique, agissent sur le système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates) soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (pyréthriinoïdes) (Haubruge & Amichot, 1998). Leur forte capacité insecticide associée à une toxicité aiguë considérée modérée chez les mammifères et une stabilité relativement faible dans l'environnement (par rapport aux organochlorés) ont fait des organophosphorés et des carbamates, les principales classes d'insecticides les plus utilisés dans le monde (Casida & Durkin, 2013).

Malgré les progrès réalisés, ces insecticides restent responsables de nombreux problèmes tant pour l'environnement avec leurs persistance à tous les échelons édaphiques que pour la santé humaine par la présence de résidus dans les eaux de distribution ainsi que dans les aliments. Certaines molécules ont une toxicité à long terme redoutable et une persistance extraordinaire avec une demi-vie chiffrant en millénaires (Cabidoche & Lesueur Jannoyer, 2011). De plus, l'utilisation massive d'insecticides depuis plus d'une trentaine d'années est à la base de l'apparition de populations d'insectes résistants limitant ainsi leur efficacité (Nauen *et al.*, 2012; Harrop *et al.*, 2014; Sparck & Nauen, 2015); les insectes sont donc parmi les organismes qui ont su le mieux développer diverses stratégies comportementales et physiologiques afin de s'adapter à leur environnement en développant une résistance vis-à-vis de différents types d'insecticides, causant ainsi des problèmes d'environnement et de santé en incluant la pollution (Brévault *et al.*, 2009).

La connaissance des mécanismes qui contrôlent la reproduction ou le développement de ces insectes présente donc à la fois un intérêt fondamental et un intérêt économique des plus importants. Ainsi, le développement et la reproduction chez les insectes sont contrôlés par deux principales hormones qui sont l'hormone juvénile (HJ) et les ecdystéroïdes (Bellés & Piulach, 2015).

L'hormone juvénile (HJ) est un sesquiterpène synthétisé par les corps allates (glandes subsphériques situées dans la tête en arrière du cerveau) (Riddiford, 1994; Yin, 1994; Ho *et al.*, 1995; Kou & Tu, 1998; Kou & Chen, 2000), dont la sécrétion est contrôlée par des neuropeptides activateurs, allatotropines ou inhibiteurs, allatostatines (Bellés & Maestro, 2005) et des neurotransmetteurs tel que la dopamine (Granger *et al.*, 2000) et l'octopamine (Schulz *et al.*, 2002). L'HJ est libérée dans l'hémolymphe puis transportée vers les tissus grâce à des protéines vectrices spécifiques appelées (juvenile hormone binding proteins) qui les protègent contre les JH-estérases (Goodman & Chang 1985; Kort & Granger, 1996). Le métabolisme de l'HJ s'effectue non seulement au niveau de l'hémolymphe mais également au niveau des tissus tel que le tégument, le corps gras, le cerveau, l'intestin et les glandes séricigènes (Kallapur *et al.*, 1996). L'HJ contrôle la métamorphose chez les insectes par le maintien des caractères juvéniles et la programmation des mues larvaires (Cassier *et al.*, 1997). Par ailleurs, elle a aussi un rôle très important chez l'insecte adulte, où elle régule la reproduction, en particulier, la vitellogénèse (Riddiford, 2011).

Les ecdystéroïdes sont des stéroïdes polyhydroxylés qui contrôlent des processus vitaux chez les insectes, la reproduction, le développement ovarien (Swevers & Latrou, 1999), l'embryogenèse et le développement post-embryonnaire (Raikhel *et al.*, 2005). Les cellules neurosécrétrices du cerveau secrètent les hormones prothoracicotrope (PTTH) qui sont ensuite stockées dans le complexe corps-cardiaques corps-allates (CC-CA), qu'on appelle l'organe neurohémal de la PTTH (Marchal *et al.*, 2010). La sécrétion de la PTTH, en réponse à des facteurs physiologiques (l'état nutritionnel de l'insecte) et environnementaux (la photopériode) vont stimuler la synthèse de l'ecdysone (E) par la glande prothoracique (Nijhout, 1994; Gilbert *et al.*, 2002; Lafont *et al.*, 2005; Gilbert, 2008). L'ecdysone est une prohormone libérée dans l'hémolymphe puis convertie en une hormone active, la 20E grâce à une enzyme, l'ecdysone 20-monooxygénase qui est le cytochrome P450 (CYP) dépendant des hydroxylases des stéroïdes (Smith, 1985; Gilbert *et al.*, 2002; Rewitz *et al.*, 2006 a et b; Gilbert & Rewitz, 2009) dans différents organes périphériques tels que le corps gras, le tube digestif et les tubes de malpighi (Gilbert *et al.*, 1997, 2002; Rybczynski, 2005; Huang *et al.*, 2008).

Chez la plupart des insectes notamment chez *Ephestia kuehniella*, les glandes prothoraciques dégénèrent lors de la dernière mue larvaire (Glitho *et al.*, 1979) et la production des ecdystéroïdes est ensuite assurée par des sources alternatives tel que l'épithélium folliculaire (Soltani-Mazouni *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2002 ; Brown *et al.*, 2009),

les testicules (Loeb *et al.*, 1984) et les ovaires (Hagedorne, 1985), ce qui peut expliquer que pendant la phase de reproduction, les gonades deviennent temporairement des organes endocrines. Il existe également d'autres organes pouvant produire les ecdystéroïdes chez les insectes comme les oenocytes, les sternites (Delbecque *et al.*, 1990; Spindler *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1992; Asahina *et al.*, 1994) et l'épiderme (Soltani *et al.*, 1997).

Face aux enjeux majeurs pour l'environnement et la santé des populations, et afin de valoriser rationnellement l'exploitation des ressources naturelles, les recherches se sont tournées vers l'utilisation des pesticides naturels ou biopesticides (Maïza *et al.*, 2013; Tomé *et al.*, 2013; Cepeda-Palacios *et al.*, 2014). Les bactéries comme *Bacillus thuringiensis* peuvent être utilisées car elles produisent des endotoxines délétères pour l'insecte (Bravo *et al.*, 2011). D'autres familles d'insecticides agissent au niveau de cibles bien distinctes tels que les néonicotinoïdes (imidaclopride, acetamepride) mimant l'action de la nicotine *via* les récepteurs de l'acétylcholine (Tomizawa & Casida, 2003), les phénylpyrazoles (pyriprole) agissant sur les récepteurs GABAergiques (Nauen *et al.*, 2012), les oxadiazines ciblant les canaux sodium (Wing *et al.*, 2000) ou encore les régulateurs de croissance des insectes (Insect growth regulators: IGRs), renommés IGDs (Insect growth disruptors) ou perturbateurs de croissance des insectes appartenant aux insecticides de la troisième génération (Pener & Dhadialla, 2012).

Les IGDs présentent beaucoup d'avantage par rapport aux pesticides conventionnels, notamment une haute spécificité et une faible toxicité à l'égard des auxiliaires et des Vertébrés (Dhadialla *et al.*, 2005; 2010; Pener & Dhadialla, 2012). Ils sont classés en 2 groupes selon leurs cibles d'actions. Le premier correspond à des substances qui perturbent l'action des hormones spécifiques des insectes, que ce soit en mimant, ou en inhibant l'action de l'hormone juvénile (Brook & McCaffery, 1990; Dhadialla *et al.*, 2005, Bensbaa *et al.*, 2015) et ecdysone (Tunaz & Uygun, 2004; Dhadialla *et al.*, 2005; 2010). Le second aux inhibiteurs de la synthèse de la chitine qui interviennent dans la formation de la cuticule (Tunaz & Uygun, 2004; Sun *et al.*, 2015). La description, le mode d'action et le domaine d'application des IGRs ont fait l'objet de nombreux travaux (Taylor, 2001; Tunaz & Uygun, 2004; Dallaire *et al.*, 2004; Ware & Whitacare, 2004; Dhadialla *et al.*, 2005; Ishayaa *et al.*, 2005; Collins, 2006; Gilbert & Gill, 2010; Perveen, 2011).

- La première catégorie comporte les agonistes et les antagonistes de l'hormone juvénile et des ecdystéroïdes : Les analogues de l'HJ ou juvénoides agissent sur la sécrétion cuticulaire en induisant des mues larvaires surnuméraires et en prolongeant les

durées des stades larvaires et nymphaux (Dhadialla *et al.*, 1998); ils présentent une efficacité envers plusieurs Coléoptères et Lépidoptères des denrées stockées (Abo-Elghar *et al.*, 2004; Aribi *et al.*, 2006; Arthur *et al.*, 2009; Sial & Brunner, 2010; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). Les antagonistes de l'HJ sont considérés comme des anti-HJ empêchant la production de l'hormone juvénile; ou facilitent sa dégradation en détruisant les corps allates (Retnakaran *et al.*, 2005). Le précocène I et II sont des anti-HJ puissants qui provoquent une réduction de la croissance ovarienne, et une métamorphose précoce chez *Zophobas atratus* (Davis *et al.*, 1990; Aribi *et al.*, 1999).

Les agonistes et les antagonistes des ecdystéroïdes : Les antagonistes comme le KK-22 et le KK-42 sont des dérivés de l'imidazole. Le KK-42 est le dérivé le plus actif, considéré comme un anti-ecdystéroïdes (Tunaz & Uygun, 2004). Il affecte le développement et la croissance des ovocytes et la production d'ecdystéroïdes *in vitro* chez *Tenebrio molitor* (Soltani *et al.*, 1997; Amrani *et al.*, 2004). De plus, il a été suggéré que le KK-42 peut affecter le développement des ovaires en agissant au niveau de l'épithélium folliculaire, site de synthèse de l'ADN et source d'ecdystéroïdes ovariens (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001), et provoque un retard dans le développement nymphal chez *Tenebrio molitor* (Kirane-Amrani *et al.*, 2015).

Les agonistes sont représentés par les bisacylhydrazines à structure non stéroïdale, comme le RH-5849 (prototype), le tébufénozide (RH-5992), le halofénozide (RH-0345), et le méthoxyfénozide (RH-2485). Ces composés sont des agonistes de la 20E (Yanagi *et al.*, 2006), qui miment l'action de l'hormone de mue en induisant des mues précoces et létales (Dhadialla *et al.*, 2005; Smaghe *et al.*, 2012). De ce fait, ils sont considérés comme des accélérateurs de mue ou MACs (molting acclerating compounds) qui se fixent aux récepteurs (EcR) spécifiques des ecdystéroïdes (Dhadialla *et al.*, 1998, 2005) par compétition avec les ecdystéroïdes naturels (Dhadialla & Ross, 2007). Leur toxicité relative peut-être classée dans l'ordre suivant : RH-2485, RH-5992, RH-0345 et enfin RH-5849 (Smaghe *et al.*, 2002). Ils stimulent les cellules épidermiques pour la synthèse de nouvelles cuticules (Smaghe & Degheele, 1994 a et b, 1997; Trisyono & Chippendale, 1997). De plus, le RH-2485 perturbe la reproduction et affecte certains comportements sexuels chez plusieurs espèces de Lépidoptères (Reinke *et al.*, 2007; Bruce & Barrett, 2008 ; Dhadialla *et al.*, 2010). Un autre bisacylhydrazine, le chromofénozide est commercialisé pour le contrôle des larves de Lépidoptères (Toya *et al.*, 2002; Soltani-Mazouni, 2012).

Les effets sublétaux des agonistes des ecdystéroïdes ont été largement étudiés chez les larves et les adultes. Ces effets incluent, la diminution ou l'allongement de la durée du développement nymphale (Biddinger *et al.*, 2006), la perte du poids des larves et des nymphes (Pineda *et al.*, 2007; Zamora *et al.*, 2008), les malformations et la mortalité des nymphes et des adultes (Hami *et al.*, 2005), la perturbation de la diapause (Eizaguirre *et al.*, 2007) et une altération des paramètres de la reproduction (Seth *et al.*, 2004; Smagghe *et al.*, 2004). De plus, le méthoxyfénozide (RH-2485), affecte la reproduction en réduisant la fécondité et la fertilité (Seth *et al.*, 2004; Saenz-de-Cabezón *et al.*, 2005; Dhadialla *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2010; Hami, 2012; Bouzeraa & Soltani-Mazouni, 2014), provoque une activité ovicide, une altération du processus de la spermatogenèse (Nakagawa, 2005), perturbe le comportement sexuel (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009, 2014) et nuit de manière générale à la dynamique des populations (Pineda *et al.*, 2009).

-La seconde catégorie comporte les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, essentiellement représentés par le diflubenzuron (DFB) qui est le seul actuellement en vente en Algérie. Il agit sur la sécrétion cuticulaire en réduisant l'épaisseur de la cuticule et en perturbant la synthèse de la chitine (Soltani *et al.*, 1996) mais aussi la reproduction (Soltani-Mazouni & Soltani, 1995; Soltani *et al.*, 1996; Chebira *et al.*, 2006). Plus tard, d'autres inhibiteurs de la synthèse de la chitine ont été développés, tels que le chlorfluazuron, le flucyclozuron (FCX) et hexaflumuron (Sheets *et al.*, 2000; Kellouche & Soltani, 2006) ou encore le lufenuron, le teflubenzuron et le triflumuron (TFM). Le novaluron affecte la mue par le dépôt d'une endocuticule anormale; il agit contre plusieurs espèces de lépidoptère par ingestion ou par contact (Kim *et al.*, 2000, 2011; Dhadialla *et al.*, 2005). Le buprofezin et la cycromazine interfèrent avec la croissance et la biosynthèse de la chitine (Tomlin *et al.*, 2000; Ishayaa, 2001).

Récemment, de nouveaux composés ont été introduits dans le but d'approfondir le mécanisme d'action au niveau cellulaire. Ces composés sont des médicaments connus tels que le captopril, l'énalapril, et le lisinopril prescrit dans le traitement de l'hypertension artérielle chez les mammifères. Ils sont considérés comme des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) qui provoque une réduction de l'oviposition et des taux d'ecdystéroïdes chez les Lépidoptères (Kirane-Amrani & Soltani-Mazouni, 2012; Bensalem *et al.*, 2013; Yezli-Touiker *et al.*, 2016).

En vue d'approfondir le mécanisme d'action de ces nouveaux insecticides sélectifs sur la reproduction (Dhadialla *et al.*, 2005; Pineda *et al.*, 2009; Soltani-Mazouni *et al.*,

2012); de nombreuses études ont été menées à travers le monde sur cet insecte ravageur des denrées stockées *E. kuehniella*, sur les plans économiques (Belles, 1975; Jacob & Cox, 1976), biologiques, morphologiques, physiologiques (Weiranther, 1989; Anderson & Hallberg, 1990) et génétiques (Marec & Mirchi, 1990; Traut & Traut, 1991; Pandir & Sahingoz, 2014). En Algérie, et dans notre laboratoire cet insecte qui est un bon modèle biologique, a fait l'objet de plusieurs travaux : (Bendjeddou, 1993; Bendjeddou *et al.*, 1998; Maamcha, 1997; Hami *et al.*, 2005; El Ouar, 2005; Taibi, 2007; Chebira *et al.*, 2006; Khebbeb *et al.*, 2008; Soltani-Mazouni *et al.*, 2010, 2012; Bouzeraa, 2010; Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011; El Ouar *et al.*, 2010; Hami, 2012; Kirane-Amrani & Soltani-Mazouni, 2012; Bensalem *et al.*, 2013; Meskache *et al.*, 2013; Bouzeraa & Soltani-Mazouni, 2012 ; 2014; Yezli-Touiker *et al.*, 2016). Les données acquises ont servi de base pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces xénobiotiques sur le développement et la reproduction chez les insectes.

Notre objectif est donc de poursuivre les études menées par notre laboratoire, la présente recherche réalisée *in vivo* a pour but d'étudier les effets d'un régulateur de croissance, agoniste de l'hormone de mue, le méthoxyfénoside, sur la reproduction et le développement d'un modèle de laboratoire, *E. kuehniella*. Elle comporte deux parties :

1 / La première partie concerne la reproduction :

- Elle examine l'efficacité du RH-2485, sur l'aspect morphométrique et structural de l'ovaire, la taille des ovocytes basaux et l'épaisseur de l'épithélium folliculaire à la métamorphose.
- Elle aborde l'aspect qualitatif et quantitatif des protéines ovariennes au stade adulte.
- Tester l'effet du méthoxyfénoside sur le contenu des vitellogénines et des vitellines dans les ovaires.

2/ La deuxième partie traite le développement et vise à évaluer :

- L'épaisseur de la cuticule nymphale et adulte durant la métamorphose après une application topique du RH-2485, sur les chrysalides femelles nouvellement exuviées.
- La structure du tégument sternal abdominale à différentes âges au cours de la métamorphose.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

1.1. Présentation du matériel biologique

Ephestia kuehniella (Zeller) 1879, insecte holométabole lépidoptère de la famille des pyralidés, est une espèce cosmopolite qui est originaire de l'Inde mais existe aussi dans les régions tempérées, notamment la méditerranée. Elle provoque des dégâts principalement sur la farine (Doumandji–Mitiche, 1977) d'où le nom « Pyrale de la farine », mais également sur les grains de céréales, biscuits, pâtes alimentaires, chocolat et riz. Sa position systématique est la suivante :

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

De type à mœurs nocturnes, *Ephestia kuehniella* (Zeller) se tient au repos contre les murs ou caché dans la farine (Balachowsky, 1972). Ses larves facilement identifiables, présentent une tête bien développée et un corps clairement découpé en trois segments. Leur développement est fortement influencé par l'environnement, à savoir la température, l'humidité, et les sources de nourriture.

1.2. Cycle de vie d'*E. kuehniella*

Le cycle complet du développement d'*Ephestia kuehniella* (Zeller) est de 80 jours (Figure 1). L'accouplement a lieu immédiatement après le début de la vie adulte. Juste après, sur une période de 3 jours, la femelle pond environ 100 à 200 œufs de couleur blanchâtre, de forme ovoïde, d'une longueur de 440 μm , et une largeur de 250 μm . Après 4 à 5 jours, les œufs formant un amas au fond et sur les parois des sacs de farine, éclosent en donnant naissance à des larves blanchâtres.

Six mues plus tard, les larves achèvent leur croissance, elles sont totalement brunes et mesurent entre 10 à 13 mm. Elles quittent alors leur source de nourriture en tissant une enveloppe de soie «cocon» contenant des substances nutritives dans laquelle elles évolueront pendant 8 à 12 jours donnant un stade immobile dans les coins sombres des bâtiments ou des machines. À l'émergence, l'adulte de couleur grise, mesure 10 à 12 mm d'envergure; il a une petite tête globulaire et formé par deux paires d'ailes : deux ailes antérieures grisâtres avec des points noirs et deux ailes postérieures blanchâtres finement frangées. La finalité de la vie adulte est la reproduction. Les mâles meurent en général quelques jours après l'accouplement, les femelles après la ponte (Balachowsky, 1972).

La distinction des sexes est bien visible au stade larvaire où les larves mâles portent des taches brunes qui représente les testicules.

1.3. Condition d'élevage

La farine infestée a été obtenue du moulin Hippone (Annaba). L'élevage est réalisé au laboratoire à une température de 27°C et une humidité relative de 80% et une photopériode de 14h de lumière (Payne, 1966). Les larves femelles du dernier stade sont récoltées, et isolées dans des boîtes en plastique contenant la farine et du papier plissé pour qu'elles puissent se nymphoser. Après la mue nymphale, les chrysalides sont traitées et mises dans des boîtes de pétrie.

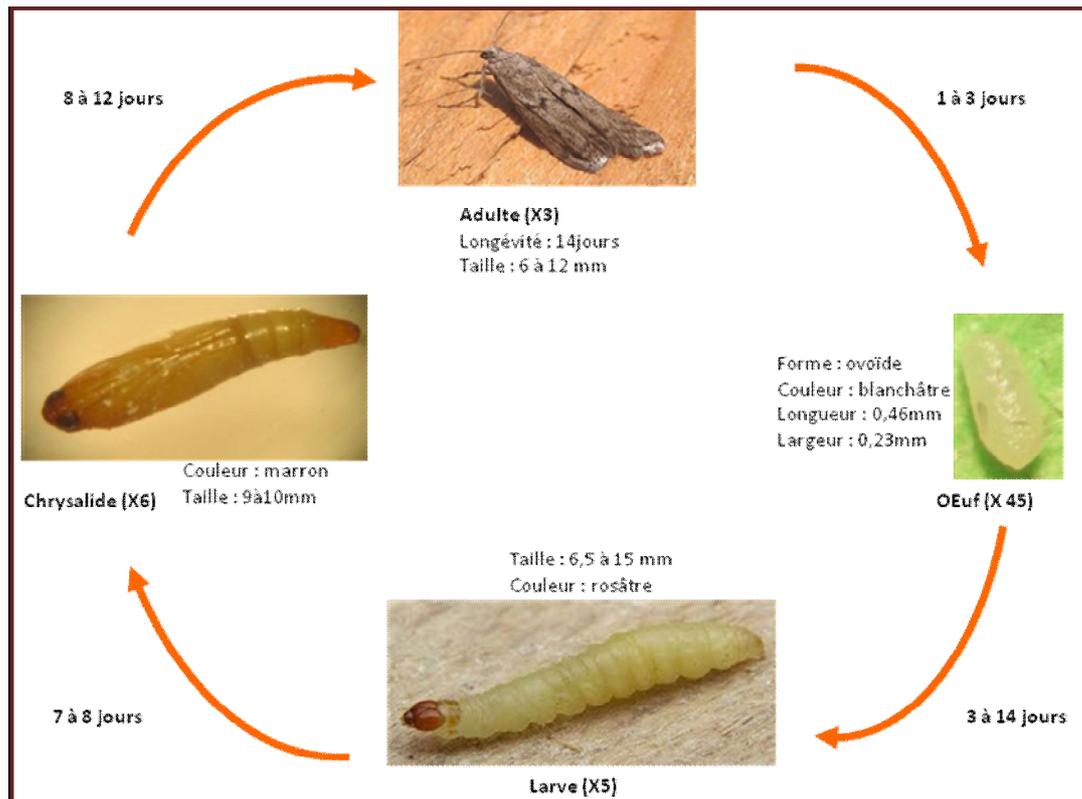


Figure 1. Cycle de développement d'*E. kuehniella* à 27°C. (Photos, Yezli-Touiker, 2014).

2. Présentation de l'insecticide

Le (RH-2485), communément appelé méthoxyfénoside, est le nom commun du 3-méthoxy-2-méthylbenzoic acide 2- (3,5-diméthylbenzoyl) -2- (1,1diméthylethyl) hydrazine; N-tert-butyl-N'- (3 méthoxy-o-toluoyl)- 3,5 xylohydrazide. Sa formule empirique est : $C_{22}H_{28}N_2O_3$ et son poids moléculaire est de 368,47g (Fig. 2).

Le méthoxyfénoside a été découvert par la compagnie (Rohm & Haas, Spring House PA, USA) en 1998, cette molécule a été aimablement fourni par Pr. G. Smaghe (Ghent University, Belgium). C'est un régulateur de croissance, agoniste de la 20E, qui mime l'action de l'hormone de mue, dérivé de la bisacylhydrazine à structure non stéroïdiale.

3. Dose et traitement

Le RH-2485 a été administré *in vivo* par une application topique aux deux doses de : 0,01µg/insecte pour une inhibition de 50 (DL50), et 0,37µg/insecte pour une inhibition de 90 (DL90). Les deux doses ont été déterminées précédemment par Soltani-Mazouni *et al.*, 2012. Le produit a été dilué dans l'acétone, 2µl ont été déposés sur la face ventrale de l'abdomen des chrysalides femelles nouvellement exuviées (0 jour) à l'aide d'une seringue Hamilton. Les chrysalides témoins ne reçoivent aucun traitement.

4. Morphométrie de l'ovaire

Les paramètres morphométriques des ovaires témoins et traités ont été mesurés sur des coupes histologiques au cours de la métamorphose (1, 3, 5, 7, et 9 jour).

La longueur, la largeur de l'ovocyte basal, ainsi que l'épaisseur de l'épithélium folliculaire ont été mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire monté sur un microscope préalablement étalonné.

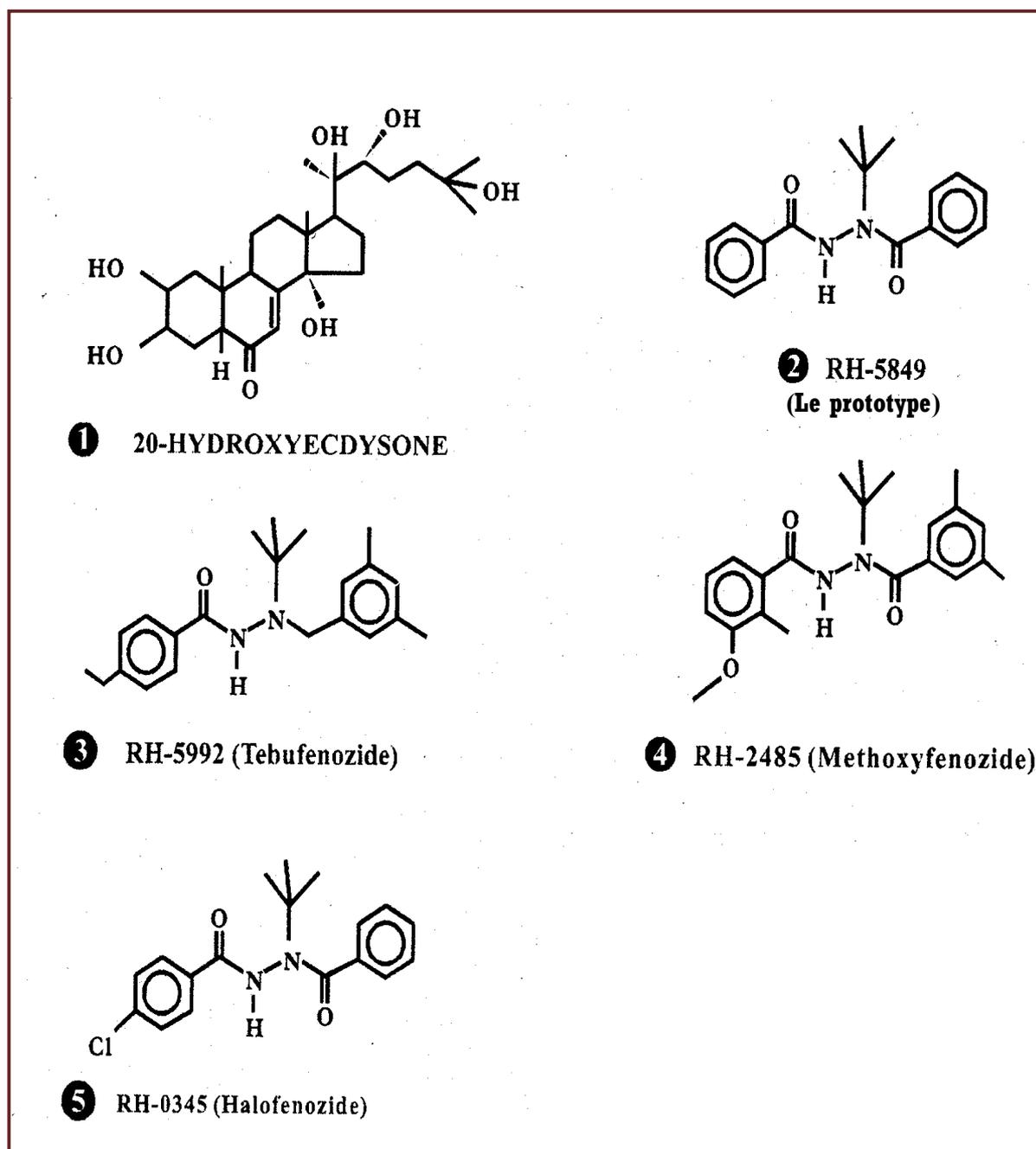


Figure 2. Formules de structure de la 20-hydroxyecdysone et de quelques agonistes de l'hormone de mue (Dhadialla *et al.*, 2005).

5. Techniques histologiques

La structure des ovaires des séries témoins et traitées, ainsi que le tégument sternal abdominal ont été déterminées sur des coupes semi - fines à différents âges au cours de la métamorphose (0, 1, 3, 5, 7, et 9 jour) préparées selon la technique histologique, réalisées selon les indications de *Martoja & Martoja, (1967)*. Les échantillons doivent passer par plusieurs étapes afin d'éviter toute altération des tissus et assurer la stabilité de leurs structures macromoléculaires. Ces étapes sont : fixation, inclusion, confection des coupes, coloration, et montage.

* **Fixation** : cette étape a pour but la conservation des structures contre l'attaque microbienne et l'opposition à l'autolyse des constituants fondamentaux sous l'effet d'enzymes cellulaires pour éviter la destruction des protéines des tissus, le durcissement des pièces de façon à faciliter les coupes et la préparation de l'échantillon aux traitements ultérieurs, notamment en augmentant l'affinité du protoplasme pour les colorations.

La fixation a été réalisée sur la chrysalide entière dans du Bouin alcoolique (formol 26 ml, acide acétique 7 ml, 45ml de solution d'acide picrique à 1 % dans l'alcool 95°et 22 ml d'eau distillée) pendant 48 heures.

* **Inclusion** : la pièce fixée, doit être incluse dans une matière plastique chimiquement neutre. Le principe de l'inclusion consiste à traiter les pièces dans un ordre déterminé par différents solvants de manière à faire pénétrer dans un tissu, à l'origine hydraté, une substance hydrophobe, qui maintiendra ses éléments en place lors de la coupe : ceci implique que la pièce soit soumise à une série de traitements successifs par des mélanges dont chacun est destiné à préparer la pénétration de celui qui le suivra et à éliminer celui qui l'a précédé. Chaque solvant doit être évidemment miscible à celui qui le précède et à celui qui le suit. On procède tout d'abord à deux bains de 24 heures dans l'alcool 95°, puis à trois bains de 24 h dans le butanol (liquide d'attente ou intermédiaire), ensuite on passe à l'inclusion dans la paraffine. On effectue d'abord une imprégnation par plusieurs bains de paraffine.

La mise en bloc se fait dans des cassettes en plastique, qui nous donne des blocs de paraffine, avec la pièce à l'intérieure.

* **Confection des coupes** : les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome (Stassnier LEICA AN 2125 RT) qui comporte un support de rasoir, un support d'objet et un système d'avance mécanique. Le bloc, contenant la pièce est taillé et fixé sur le porte objet sous l'action de la chaleur. L'excès de paraffine, entourant la pièce est enlevé, avec une lame de scalpel. Le bloc est orienté parallèlement au rasoir. On obtient ainsi des rubans droits de paraffine. L'épaisseur des coupes est de 5 à 7 μm .

Les rubans obtenus mis sur des lames soigneusement nettoyées, marquées avec une pointe de diamant sur lesquelles on dispose de l'eau gélatinée, qui permet de coller les rubans des coupes. La lame est mise sur une platine chauffante (20°C), Ces lames sont mises dans une étuve à 37°C pendant 24h afin de compléter le séchage des coupes.

* **Déparaffinage et coloration** : le déparaffinage élimine le milieu d'inclusion et précède la coloration. Les coupes sont d'abord traitées par le xylène (3 bains de 3 minutes chacun). Elles sont ensuite plongées dans trois bains d'alcool 95° (2 minutes chacun) et lavées à l'eau courante et à l'eau distillée.

Les coupes sont ensuite colorées à l'hématoxyline pendant 10 minutes. Le rinçage se fait dans l'eau, puis dans l'eau ammoniacuée, l'eau courante puis à l'eau distillée. On colore ensuite les coupes à l'éosine pendant 5 minutes et on les rince à l'eau courante et à l'eau distillée. On les passe dans deux bains d'alcool (95°) afin d'éliminer l'excès d'éosine puis dans un mélange acétone-xylène.

* **Montage** : les coupes colorées ne supportant pas le dessèchement, il est nécessaire d'interposer entre la lame et la lamelle un milieu de montage qui doit être transparent pour satisfaire les conditions d'observation. Les lames colorées doivent être conservées, pour cela on utilise du baume de Canada. Ensuite elles sont séchées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Les lames sont observées par un microscope photonique préalablement étalonné pour faire les mensurations.

6. Analyse qualitatif et quantitatif des protéines ovariennes

6.1. Etude électrophorétique des protéines

6.1.1. Extraction des protéines ovariennes

Les ovaires (pools de 12 paires) sont prélevés des femelles adultes d'*E. kuehniella* témoins et traitées *in vivo* avec le méthoxyfénoside (0,01 µg et 0,037 µg), les échantillons sont conservés dans une solution de PMSF à 0,1 % dans l'eau distillée.

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

6.1.2. Principe de l'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de séparation fondée sur le fait que les molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. La vitesse de migration dépend également du poids moléculaire, de la configuration, ainsi que des propriétés amphotères de la protéine (Lemoine, 1980; Mauer, 1991). La séparation électrophorétique des protéines est réalisée selon la technique de Laemmli, (1970). Il s'agit d'une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide (PAGE) à 30 %.

Ce gel joue le rôle d'un tamis moléculaire additionné de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 10%. Le SDS est un détergent anionique qui dénature les protéines et leur donne une charge négative ce qui donne une densité de charge équivalente par unité de longueur de polypeptide. Par conséquent, les protéines vont migrer dans le gel et la distance parcourue sera en corrélation avec leur poids moléculaire (Kaufman, 1995).

* Montage de l'appareil

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

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

Les gels sont préparés extemporanément. On coule d'abord le gel de séparation ou running gel (12,5 %) entre la plaque d'alumine et la plaque de verre et on laisse polymériser pendant 30 mn (Tableau.1).

On prépare ensuite le gel de concentration (4,5%) ou stacking gel, que l'on fait couler jusqu'aux bords des plaques. On place enfin les peignes qui serviront au moulage des dix chambres de dépôt, puis on laisse polymériser pendant 30 mn. Après polymérisation du gel de concentration, on remplit la cuve de tampon de migration ou running buffer (Tab.2). On enlève délicatement le peigne, les puits sont prêts pour le dépôt des échantillons.

Tableau 1: Composition des gels (Running gel, Staking gel).

Produits		Stacking gel	Running gel
Acrylamide 30%	(ml)	1,5	5,3
Eau distillée	(ml)	5,7	6,8
Upper buffer	(ml)	1,2	-
SDS 10%	(ml)	-	0,2
Sucrose 55%	(ml)	-	2,5
Lower buffer	(ml)	-	5,0
Ammonium persulfate	(ml)	0,3	0,2
Temed	(ml)	0,01	0,025

Tableau 2: Composition du tampon de migration (Running buffer).

Produits		Running buffer
Tris bas	(g)	6,00
Glycine	(g)	28,80
SDS	(g)	1,00
H ₂ O	(ml)	1000

* Dépôt des échantillons et migration

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans une solution tampon (Tab.3). La détermination du volume de l'échantillon a été obtenue à partir du dosage des protéines dans les échantillons. Au niveau de chaque chambre de dépôt, on introduit 10 à 15 µl d'échantillon biologique à l'aide d'une micro seringue.

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

Tableau 3: Composition du tampon d'échantillons.

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

* Coloration

A la fin de la migration, les gels sont placés dans la solution de coloration (Tab. 4) pendant 24 heures sous agitation. Elle permet la révélation des bandes protéiques. Les gels subissent ensuite 2 à 3 bains successifs d'acide acétique à 10 % afin d'éliminer l'excès de colorant. Un dernier bain est effectué dans une solution de rinçage pour obtenir une meilleure visualisation des bandes protéiques. La décoloration du fond du gel est effectuée avec deux bains d'acide acétique à 10% (1heure chacun). La procédure prend fin lorsque l'acide devient clair. Le gel est alors fixé pendant 15 min dans la solution de rinçage (Tab.5).

Tableau 4 : Composition de la solution de coloration.

Produits		Quantité
Propanol 2	(ml)	250
Acide acétique 10%	(ml)	100
Bleu de coomassie R250	(mg)	250
Eau distillée	(ml)	1000

Tableau 5 : Composition de la solution de rinçage.

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

* **Décoloration**

Tableau 6 : Composition de la solution de décoloration.

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

6.2. Dosage des protéines ovariennes

Les ovaires prélevés des séries témoins et traitées avec le méthoxyfénoside (DL50, DL90) à l'émergence des adultes, sont débarrassés du corps gras, puis conservés dans des tubes eppendorfs contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 %.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 (BBC) ¹ comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (1mg/ml) comme standard, dans une fraction aliquote de 100 µl.

La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme (Tab.7).

[1] 100mg de BBC + 50ml d'éthanol puis agitation pendant 2 heures ; 100 ml d'acide orthophosphorique à 80% sont alors rajoutés et le tout est complété à 1000 ml avec l'eau distillée.

Tableau 7 : Dosage des protéines chez *E. Kuehniella* : Réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

7. Evaluation des vitellogénines et des vitellines dans les ovaires

7.1. Prélèvement des ovaires

Les ovaires, sont prélevés à l'émergence des adultes sous loupe binoculaire, pesés et déposés dans des tubes contenant un tampon (Tris-HCl-NaCl) (pH 7,4 ; 0,5 M) ² permettant l'extraction des vitellogénines et des vitellines. La conservation se fait à (-20C°) jusqu'au dosage.

[2] (3,02 g de Tris + 300 ml d'eau distillé, puis ajusté avec l'HCl et complété à 500 ml d'eau distillé ; il en résulte une solution mère de Tris-HCl ; 2,9 g de NaCl sont alors dilués dans 10 ml de la solution mère de Tris-HCl ; pour obtenir le tampon complet.

7.2. Extraction et dosage des vitellogénines et des vitellines dans les ovaires

L'extraction des vitellogénines et des vitellines dans les ovaires est réalisée selon la méthode de Postlethwait *et al.*, (1980) et Fabre *et al.*, (1990). Les échantillons biologiques, conservés dans 500 µl de tampon d'extraction, sont broyés aux ultrasons. L'homogénat obtenu est centrifugé à 5000 trs/min pendant 10 minutes. Il en résulte 3 couches distinctes, une couche surnageante qui représente les lipides, un culot contenant des glycoprotéines et une couche intermédiaire renfermant les vitellogénines et les vitellines. La fraction soluble obtenue est récupérée puis déposée dans un tube eppendorf. Les échantillons sont ensuite conservés au froid (-20°C) jusqu'au dosage.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (1mg/ml) comme standard, dans une fraction aliquote de 100 µl. La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme.

8. Analyse statistique des données

Les résultats sont exprimés statistiquement par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm SD$). Les moyennes des différentes séries sont comparées deux à deux en utilisant le test t de Student avec un seuil de signification $P \leq 0,05$, le test de Tukey a été utilisé pour définir les groupes. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel MINITAB (Version 17, PA State College, USA).

Le nombre des chrysalides ou d'adultes testés sont précisés avec les résultats.

1. INTRODUCTION

La reproduction représente, pour l'individu, un acte important mettant en jeu des comportements complexes, alors que, pour l'espèce, elle est fondamentale, en assurant la pérennité. Le potentiel reproducteur des insectes reste un des facteurs les plus importants de leur indéniable pullulation et l'étude de la reproduction est nécessaire pour toute approche raisonnée visant une diminution sensible des dégâts causés par les déprédateurs (Soltani-Mazouni & Soltani, 1995).

Chez *E. kuehniella*, l'ovaire est de type méroïstique polytrophique. Il comprend de 8 à 10 ovarioles, il est constitué par un tube épithélial mésodermique dans lequel les ovocytes sont en succession linéaire reflétant leur développement (William, 1971). Le tractus génital féminin est strictement ectodermique, il se développe à partir d'ébauches situées au niveau des sternites 7, 8 et 9 chez les larves du 6^{ème} stade. La différenciation de ses composants se réalise pendant la nymphose, alors que la différenciation des ovarioles est précoce, elle s'effectue chez la larve du 2^{ème} stade, ceux-ci sont en effet distincts au sein du tissu interstitiel; l'ovaire.

Chaque ovariole est caractérisée par l'existence de deux zones fonctionnelles, le germarium apical et le vitellarium (Cassier *et al.*, 1997). Le germarium se différencie le premier, il contient des cellules germinales primordiales qui engendrent par division les ovocytes et les cellules nourricières (trophocytes) et somatiques (Cassier *et al.*, 1997). Le vitellarium permet aux ovocytes, entourés par une assise de cellules folliculaires, dont l'ensemble forme un follicule, d'accumuler des réserves (vitellus) et d'acquérir des enveloppes protectrices, sécrétées par le follicule, appelées enveloppe vitelline et chorion (Raikhel & Dhadialla, 1992).

La vitellogénèse débute chez *E. kuehniella* à 4 jours après la mue nymphale, et la choriogénèse commence deux à six heures après l'exuviation adulte (Zimowska *et al.*, 1995; Beckemeyer & Shirk, 2004). Dans certains cas comme chez les lépidoptères, la sécrétion des enveloppes de l'œuf nécessite l'action conjointe de deux hormones, l'hormone de mue et l'hormone juvénile (Cassier *et al.*, 1997; Kidikora *et al.*, 2006).

Sur le plan fonctionnel, la vitellogénèse est une phase d'accroissement ovocytaire, qui commence par l'accumulation des trois types de réserves vitellines : lipides (triglycérides, lipoprotéines), glucides, protéines et sels minéraux (Cassier *et al.*, 1997).

Les globules lipidiques paraissent élaborés à partir d'un matériel qui transite par le réticulum puis l'appareil de Golgi. Ils proviennent des corps gras *via* l'hémolymphe sous forme de lipoprotéines, ils représentent une partie importante des réserves. Les glucides, représentent également l'élément énergétique de l'organisme jouant un rôle essentiel dans la physiologie des insectes (Casier *et al.*, 1997). Certains représentent une source d'énergie pour les organismes vivants, soit immédiatement utilisable (tréhalose), soit sous forme de réserves (glycogène); d'autres ont un rôle structural (cellulose, chitine et acide hyaluronique). Les taux de glycogène et de tréhalose, dans les tissus et l'hémolymphe, sont étroitement liés aux événements physiologiques comme la mue et la reproduction (Wiens & Gilbert, 1968).

Les protéines jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'organisme, les divisions cellulaires et la catalyse biochimique (Mahler & Cordes, 1969; Hassan, 2002). Elles assurent également la régulation hormonale et peuvent être intégrées dans les cellules comme composant structuraux tels que les lipides et les sucres (Cohen, 2010; Sugumaran, 2010).

Dans ce processus, la protéine essentielle est la vitellogénine, protéines précurseur du vitellus dans les ovocytes (Attardo *et al.*, 2005) qui constituent 80-90% des substances de réserve de l'œuf, synthétisée dans le corps gras, qui est un lieu de stockage des métabolites (protéines, glucides et lipides), mais aussi de synthèse de la majorité des protéines hémolyphatiques (Roma *et al.*, 2010), secrétés dans l'hémolymphe puis captée par endocytose par les ovocytes en voie de développement sous l'effet de l'hormone juvénile JH (Engelmann, 1983; Kunkel & Nordin, 1985; Gilbert *et al.*, 2000; Telfer, 2009). Les vitellogénines sont ensuite stockées et transformées en vitellines dans les ovocytes (Engelmann, 1979). Des travaux antérieurs ont confirmé la présence de récepteurs sur la membrane des ovocytes pour les vitellogénines (Amdam *et al.*, 2002).

L'activité ovarienne des insectes est régulée par des facteurs intrinsèques, neurohormones et hormones (Ou *et al.*, 2011), mais aussi extrinsèques environnementaux (Garelli *et al.*, 2012; Rideout *et al.*, 2012), comme l'accouplement, la prise de nourriture, les phéromones et la température, qui déterminent de manière directe ou indirecte l'activation des voies endocrines et neuroendocrines conduisant à la reproduction (Fig. 3).

Chez les adultes femelles, les cellules folliculaires produisent en effet, des ecdystéroïdes (Rees *et al.*, 2010) qui jouent un rôle important dans le développement des

ovaires, la vitélogénèse et la maturation des œufs. Ces ecdystéroïdes sont absorbés et accumulés dans des œufs matures et servent comme un substrat hormonal pour les mues embryonnaires au cours de l'embryogénèse (Hagedorn, 1985; Lafont *et al.*, 2005). Des expériences *in vitro* ont permis de démontrer que les ovaires produisent des ecdystéroïdes chez des espèces de différents ordres d'insectes comme *Schistocera gregaria* (Rees & Isaac, 1984), *Locusta migratoria* (Lagueux *et al.*, 1981), *Manduca sexta* (Thompson *et al.*, 1987), *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 1999).

Subséquentement, l'ecdysone est rapidement convertie en 20-hydroxyecdysone (20-HE) au niveau des ovaires, mais également des corps gras. Martin *et al.*, (2001) ont démontré que la 20-E maintenait l'expression des gènes de la vitellogénine dans les corps gras, la protéine étant par la suite acheminée et incorporée aux oocytes (Koller & Raikhel, 1991). Par ailleurs, la 20-E induit la différenciation folliculaire des ovaires (Sahlen, 1994; Lafont *et al.*, 2005) et pourrait agir au cours de la choriogénèse (Lin *et al.*, 1993).

Outre son activité dans la régulation de la maturation des systèmes reproducteurs mâle et femelle, le système endocrinien influence également plusieurs comportements reproducteurs chez les insectes. Chez les femelles de la mouche domestique, *Musca domestica*, la production de la phéromone sexuelle est directement corrélée avec une augmentation du taux d'ecdystéroïde dans l'hémolymphe (Adams *et al.*, 1984; Dees, *et al.*, 1985). Dans ce cadre, les hormones ont pour fonction de synchroniser la maturation sexuelle avec l'initiation des comportements pré-copulatoires ayant pour finalité la rencontre des partenaires sexuels en vue de réaliser l'accouplement (Barth & Lester, 1973).

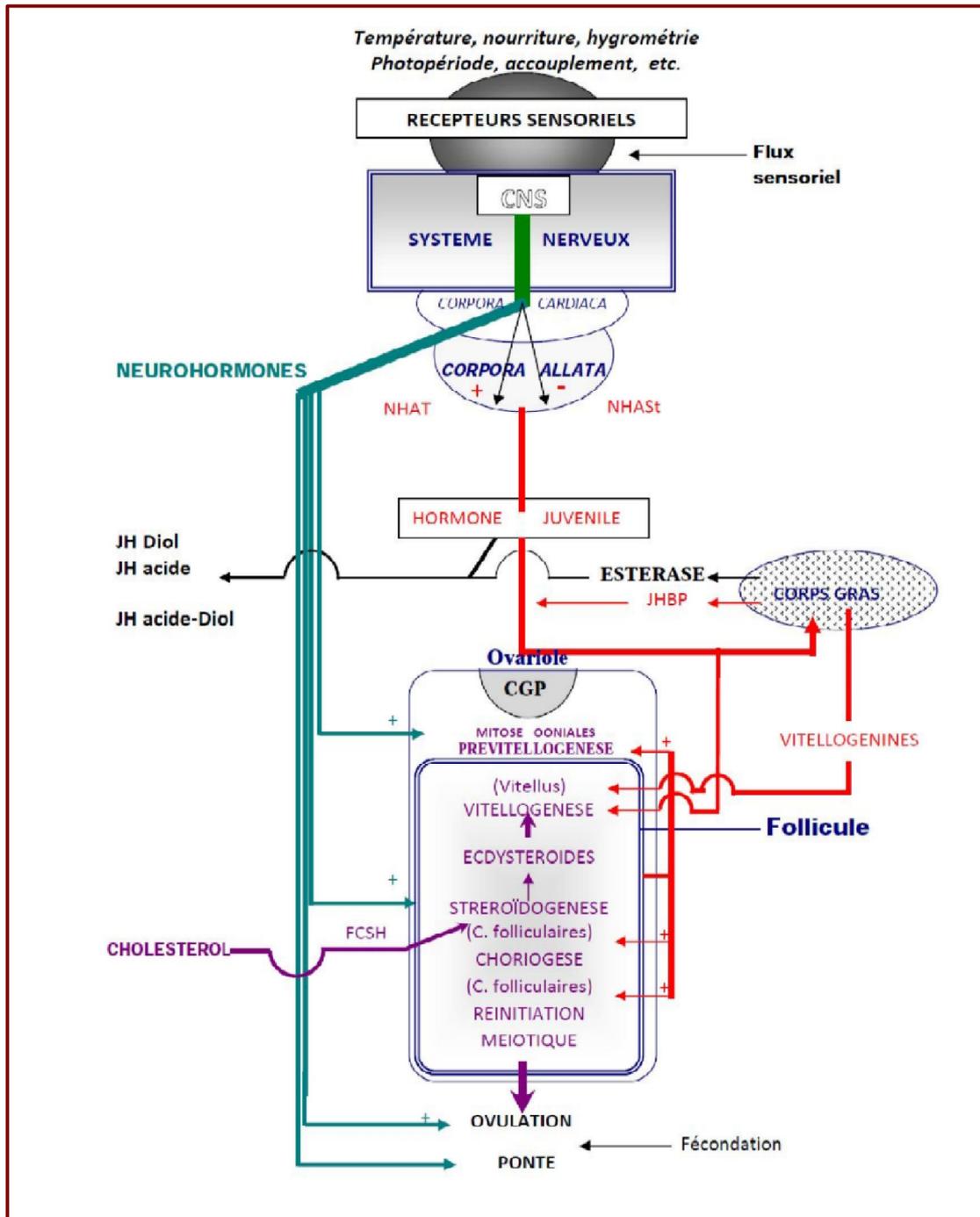


Figure 3. Contrôle de la reproduction chez les insectes. CNS : cellules neurosécrétrices, NHAT : neurohormone allatotrope, NHASt: neurohormone allatostatique, JHBP: juvenil hormone binding proteins, FCSH: follicle cells stimulating hormone, CGP: cellules germinales primordiales (Cassier *et al.*, 1997).

2. RESULTATS

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

L'efficacité de méthoxyfénozide, a été testée, par application topique, sur des nymphes nouvellement exuviées d'*E. kuehniella* aux deux doses d'inhibition DL 50 (0,01µg/ 2µl) et DL 90 (0,37µg/ 2µl). La longueur, la largeur de l'ovocyte basal ainsi que l'épaisseur de l'épithélium folliculaire ont été déterminées sur des coupes histologiques chez des chrysalides femelles à différentes âges au cours de la métamorphose (de 0 à 9 jours).

2.1.1. Effet du méthoxyfénozide sur la taille de l'ovocyte basal

Les observations au microscope photonique des coupes histologiques, ont permis de mesurer la longueur et la largeur de l'ovocyte basal des chrysalides femelles témoins et traitées au cours de la métamorphose. Les résultats sont représentés dans les (Tableaux 8, 9), et les (Figures 4, 5).

La longueur de l'ovocyte basale augmente significativement avec l'âge pour atteindre un maximum de $284.64 \pm 1.90 \mu\text{m}$ au neuvième jour ($p = 0,000$) de la vie nymphale pour la série des témoins. Le même profile a été enregistré chez les séries traitées avec une augmentation de $297,05 \pm 2,77 \mu\text{m}$ pour les traitées avec la DL50, et de $325,49 \pm 2,10 \mu\text{m}$ au neuvième jour pour les traitées avec la DL90.

L'analyse statistique montre que le méthoxyfénozide augmente la longueur de l'ovocyte basale de façon très significative au premier jour ($p = 0,008$) chez les traités seulement avec la dose la plus forte DL90.

La longueur de l'ovocyte basale augmente de façon hautement significative au troisième jour, chez les traités avec les deux doses ($p = 0,001$, $p = 0,000$), au cinquième ($p = 0,000$), et au septième jour, ($p = 0,003$) chez les traités avec la DL90 par rapport aux témoins.

De plus au neuvième jour, le RH-2485 provoque une augmentation très significative de la longueur de l'ovocyte basal chez les traitées avec la DL 50 ($p = 0,008$), et hautement significative chez les traitées avec la DL 90 ($p = 0,000$).

Concernant la largeur de l'ovocyte basale, elle augmente significativement avec l'âge pour atteindre son maximum au bout du neuvième jour, ($p = 0,000$) avec une valeur de $174,84 \pm 1,05 \mu\text{m}$ pour la série témoins.

Le même profil a été observé chez les séries traitées avec la DL 50 où on remarque une augmentation de $187,91 \pm 0,91 \mu\text{m}$, et de $192,99 \pm 1,05 \mu\text{m}$ au neuvième jour, pour les traités avec la DL90. Les résultats relatifs à l'effet du méthoxyfénozide, révèlent qu'il est sans effet significatif au premier jour, chez les traitées avec les deux doses par rapport aux témoins.

Le traitement avec le RH-2485, provoque une augmentation significative de la largeur de l'ovocyte basal au troisième jour ($p = 0,015$) seulement chez les traités avec la DL90. Au cinquième jour, le méthoxyfénozide augmente d'une manière très significative ($p = 0,009$) la largeur chez les traitées avec la DL 90 par rapport aux témoins.

La largeur de l'ovocyte basale augmente de façon hautement significative au septième jour ($p = 0,006$) avec la dose la plus forte, et au neuvième jour ($p = 0,001$, $p = 0,000$) avec les deux doses chez les traitées par rapport aux témoins.

Tableau 8 : Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la longueur (µm) de l'ovocyte basal d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).

Ages (jours)	Témoins	RH-2485 (DL50)	RH-2485 (DL90)
1J	29,64 ± 1,05 a A	31,46 ± 1,05 ab A	35,09 ± 1,05 b A
3J	41,14 ± 1,05 a B	56,26 ± 1,82 b B	62,67 ± 0,91 c B
5J	163,59 ± 0,74 a C	164,07 ± 0,6 b C	215,98 ± 1,82 b C
7J	237,40 ± 1,31 a D	238,61 ± 1,11 b D	246,23 ± 1,05 b D
9J	284,64 ± 1,90 a D	297,05 ± 2,77 b D	325,49 ± 2.10 c D

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.
- Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à différents temps pour une même série.

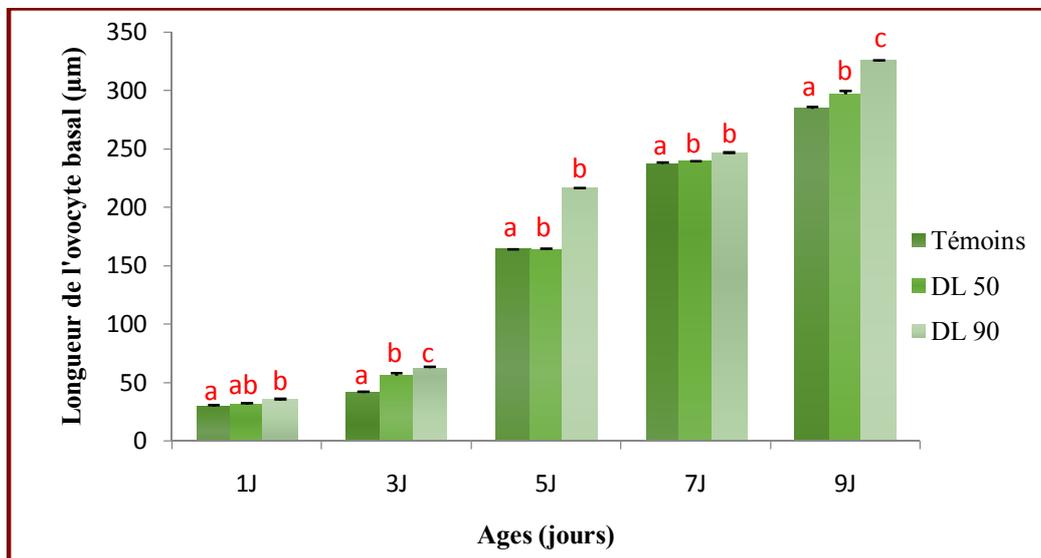


Figure 4. Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la longueur (µm) de l'ovocyte basal d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).

Tableau 9 : Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la largeur (µm) de l'ovocyte basal d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).

Ages (jours)	Témoins	RH-2485 (DL50)	RH-2485 (DL90)
1J	19,36 ± 1,05 a A	20,57 ± 1,05 a A	20,81 ± 0,91 a A
3J	25,28 ± 0,21 a B	26,01 ± 1,05 a B	27,46 ± 0,42 b B
5J	133,00 ± 2,01 a C	135,76 ± 1,3 b C	140,96 ± 1,05 b C
7J	154,27 ± 1,82 a C	159,72 ± 6,29 b C	169,64 ± 0,91 b C
9J	174,84 ± 1,05 a D	187,91 ± 0,91 b D	192,99 ± 1,05 c D

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.
- Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à différents temps pour une même série.

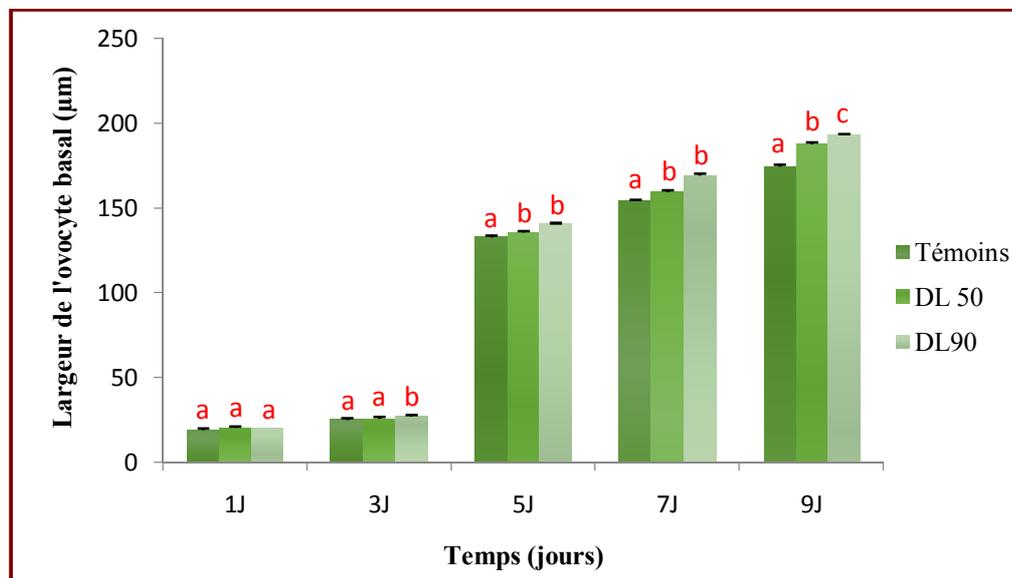


Figure 5. Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur la largeur (µm) de l'ovocyte basal d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).

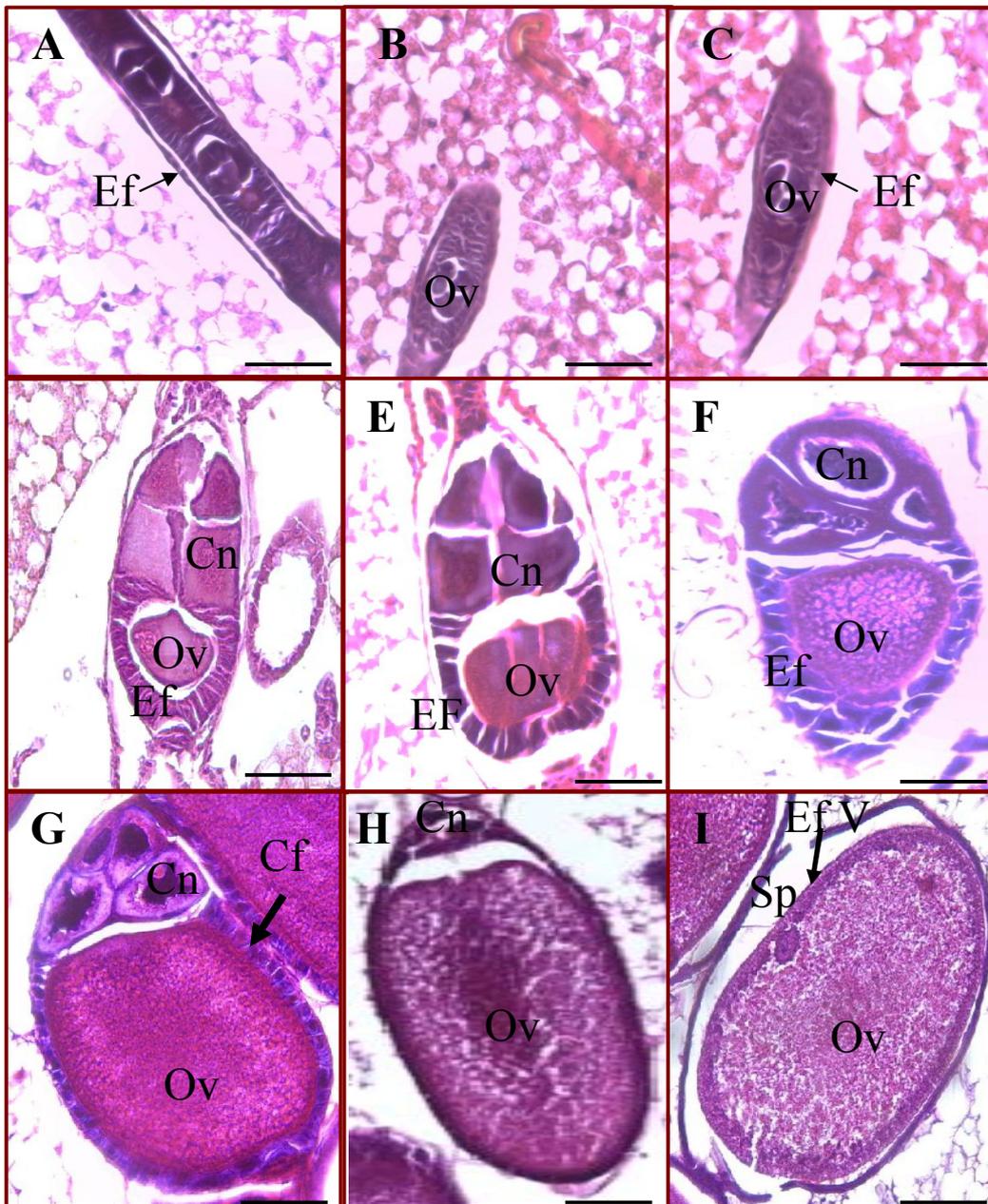


Figure 6 . Coupes histologiques montrant l'évolution de la taille de l'ovocyte basales prélevés sur des chrysalides femelles d'*Ephestia kuehneilla* à différentes âges au cours de la métamorphose (x 40). (A) : Témoin 3 jour ; (B) : Traité avec la DL50 3 jour; (C) : Traité avec la DL90 3 jour; (D) : Témoin 5 jour; (E) : Traité avec la DL50 5 jour; (F) : Traité avec la DL90 5 jour; (G) : Témoin 7 jour; (H) : Traité avec la DL50 7 jour ; (I) : Traité avec la DL90 7 jour. (Ov) : Ovocyte ; (Cn) : Cellule nourricière ; (Ef) : Epithélium folliculaire ;(Cf) Cellule folliculaire ; (Sp) Séparation ; (Ef V) : Epithélium folliculaire vacuolé. La barre d'échelle correspond à 30 μ m.

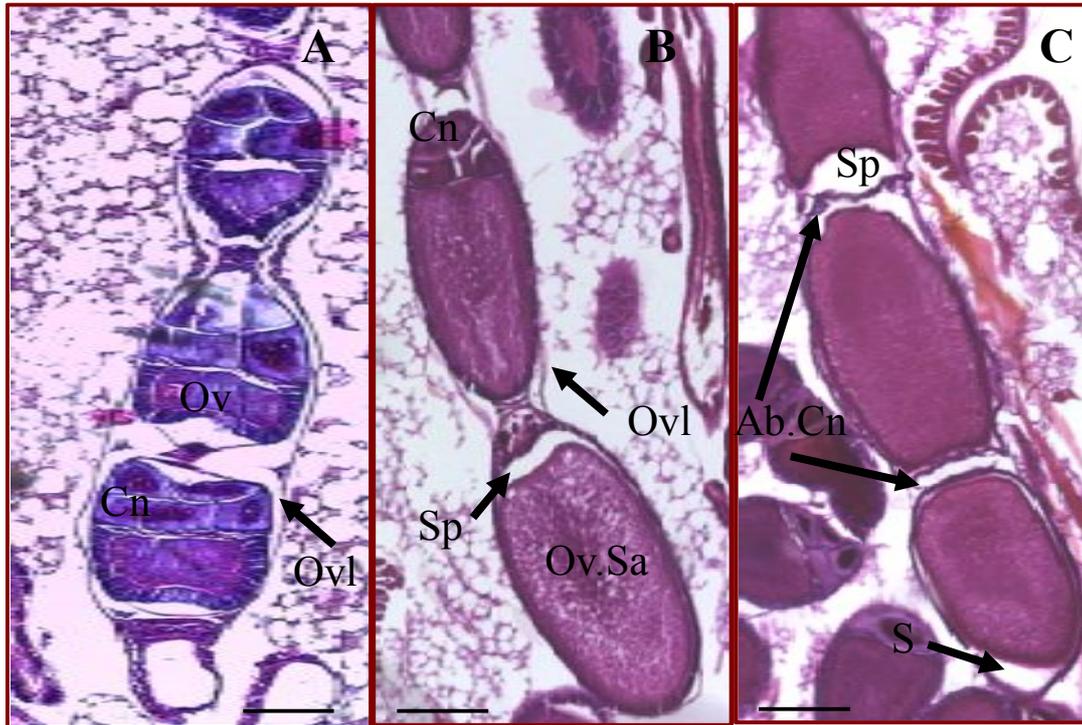


Figure 7. Section longitudinal des ovarioles chez des chrysalides d'*E.kuehniella* témoin et traité avec le méthoxyfénoside (DL 50, DL90) (x10). (A) : Ovariole normal témoin 9 jour ; (B) : Ovariole traité DL50 9 jour ; (C) : Ovariole traité DL90 9 jour. (Ovl) : Ovariole ; (Ov) : Ovocyte ; (Cn) : Cellule nourricière ; (Ov.Sa) : Ovocyte semi-absorbé ; (Sp) : Séparation ; (S) : Espace ; (Ab.Cn) : Absence de cellule nourricière. La barre d'échelle correspond à 20 μ m.

2.1.2. Effet du méthoxyfénozide (RH-2485) sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire

Après observations au microscope photonique et menstruation, l'analyse statistique montre que l'épaisseur de l'épithélium folliculaire augmente significativement avec l'âge pour atteindre un maximum de $47,65 \pm 7,94 \mu\text{m}$ au cinquième jour ($p = 0,021$) puis décroît par la suite ($p = 0,056$) chez la série des témoins. Le même profil a été observé chez les séries traitées respectivement avec les deux doses DL50, DL90 (Tab. 10, Fig. 8).

Le traitement avec le RH-2485 entraîne une réduction significative de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez les traitées seulement avec la DL 90 au premier jour ($p = 0,046$) de la vie nymphale.

Au troisième jour, le méthoxyfénozide réduit d'une manière significative cet épaisseur chez les traitées respectivement avec les deux doses ($p = 0,036$, $p = 0,015$).

Le RH-2485 réduit d'une manière significative l'épaisseur de l'épithélium folliculaire au cinquième jour ($p = 0,049$) de la vie nymphale seulement chez les traitées avec la dose la plus forte.

Au septième jour, le traitement avec l'agoniste de l'hormone de mue, le RH-2485 provoque une réduction très significative de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez les traitées avec la DL90 ($p = 0,011$) par rapport aux témoins. Ainsi, au neuvième jour, le traitement est significative ($p = 0,057$) seulement chez les traitées avec la DL90 par rapport aux témoins.

Tableau 10 : Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de l'épithélium folliculaire d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n =10).

Ages (jours)	Témoins	RH-2485 (DL50)	RH-2485 (DL90)
1J	15,73 ± 2,09 a A	11,97 ± 1,86 a A	9,68 ± 1,05 b A
3J	22,99 ± 1,05 a B	15,46 ± 2,32 b AB	12,10 ± 2,10 b AB
5J	47,65 ± 7,94 a C	35,69 ± 2,77 a C	27,22 ± 1,82 b C
7J	31,46 ± 2,10 a B	28,43 ± 1,05 a B	18,75 ± 1,05 b B
9J	21,17 ± 1,05 a A	20,57 ± 2,01 a B	15,73 ± 2,10 b B

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.
- Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à différents temps pour une même série.

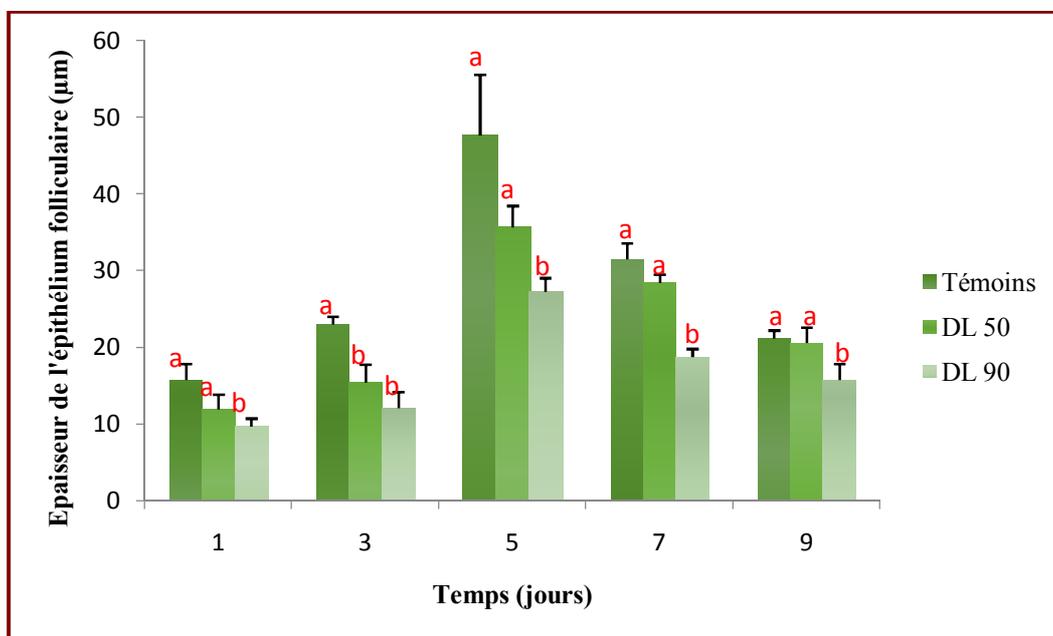


Figure 8. Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de l'épithélium folliculaire d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 10).

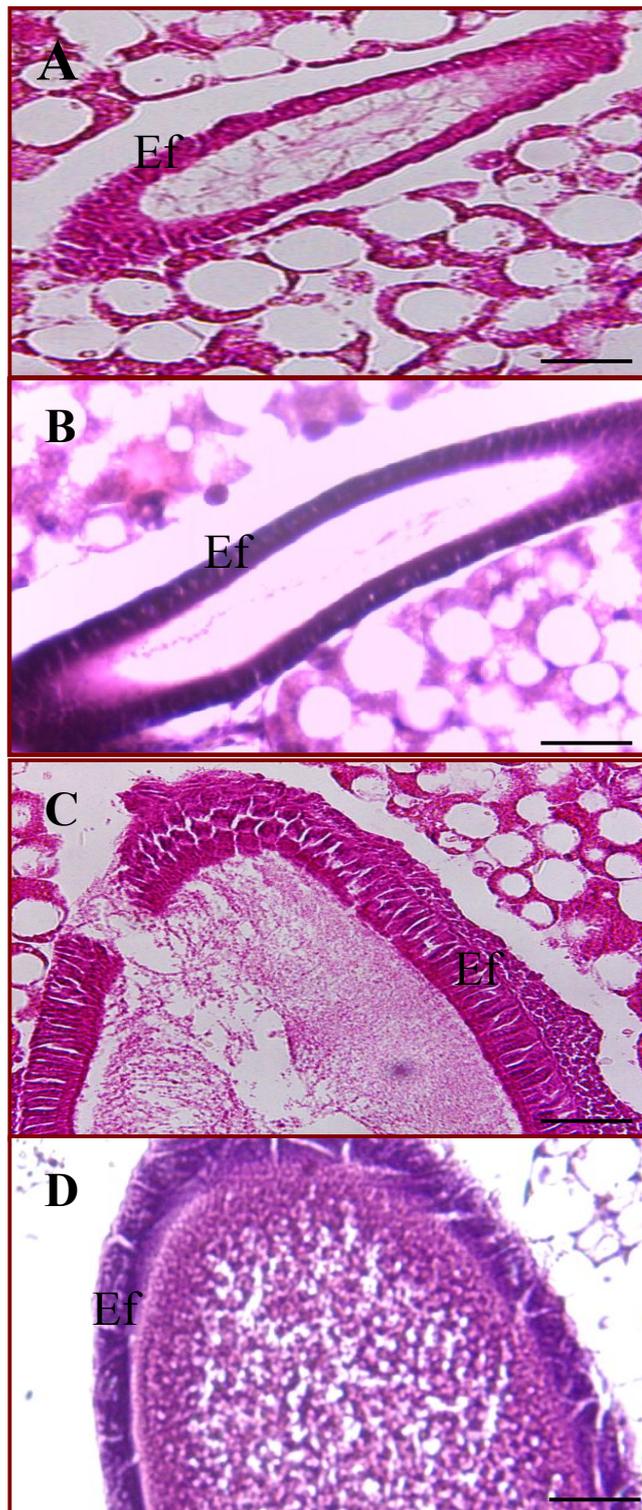


Figure 9. Coupes histologiques montrant l'évolution de l'épithélium folliculaire chez la série témoin prélevés sur des chrysalides femelles d'*E. kuehneilla* à différents âges au cours de la métamorphose (x 40). (A) : 1 jour ; (B) : 3 jour ; (C) : 5 jour ; (D) : 9 jour ; (Ef) : Epithélium folliculaire. La barre d'échelle correspond à 100 μ m.

2.2. Effet sur les protéines ovariennes

2.2.1. Effet du méthoxyfénozide sur la quantité des protéines

La quantification des protéines ovariennes a été déterminée au niveau des ovaires d'adultes d'*E. kuehniella* nouvellement émergées chez les témoins et les traitées aux deux doses (DL50, DL90). La quantification des protéines dans les ovaires des adultes a été réalisée à partir d'une courbe de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard (Tab.11, Fig.10).

Tableau 11 : Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard.

Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbances	0	0,191	0,292	0,391	0,561	0,770

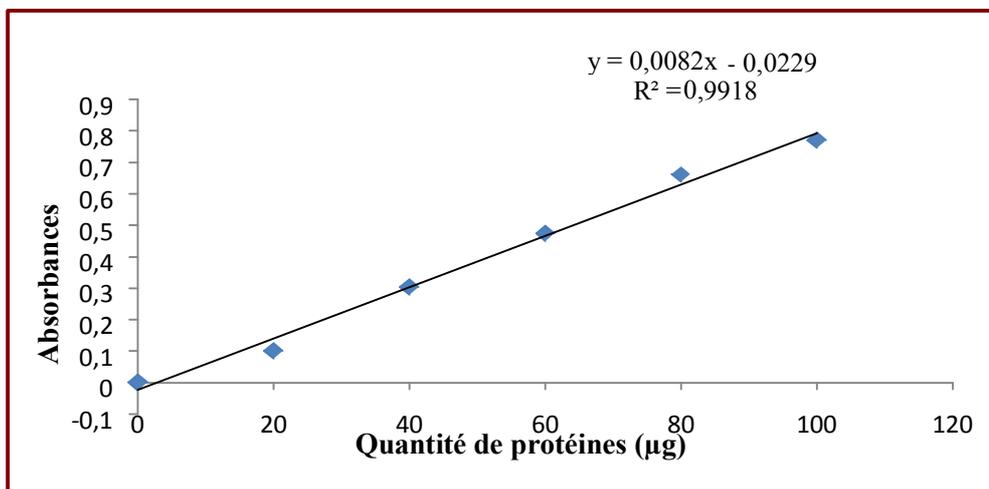


Figure 10. Dosage des protéines ovariennes, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg) (BSA).

L'application du méthoxyfénozide se traduit par une diminution très significative ($p = 0,01$) enregistrée chez les femelles traitées respectivement avec les deux doses (DL50, DL90)

par comparaison avec les témoins. En effet, chez la série des témoins on enregistre un taux protéique de $43,00 \pm 3,46$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$) qui sera réduite à $37,90 \pm 2,60$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les séries traitées (Tab. 12, Fig .11).

Tableau 12 : Effet *in vivo* du méthoxyfénozide (DL50, DL90), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des protéines ovariennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, $n = 5$).

Traitement	Taux des protéines ovariennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
Témoins	$43,004 \pm 3,461$	a
RH-2485 (DL50)	$37,906 \pm 2,605$	b
RH-2485 (DL90)	$37,492 \pm 1,751$	b

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.

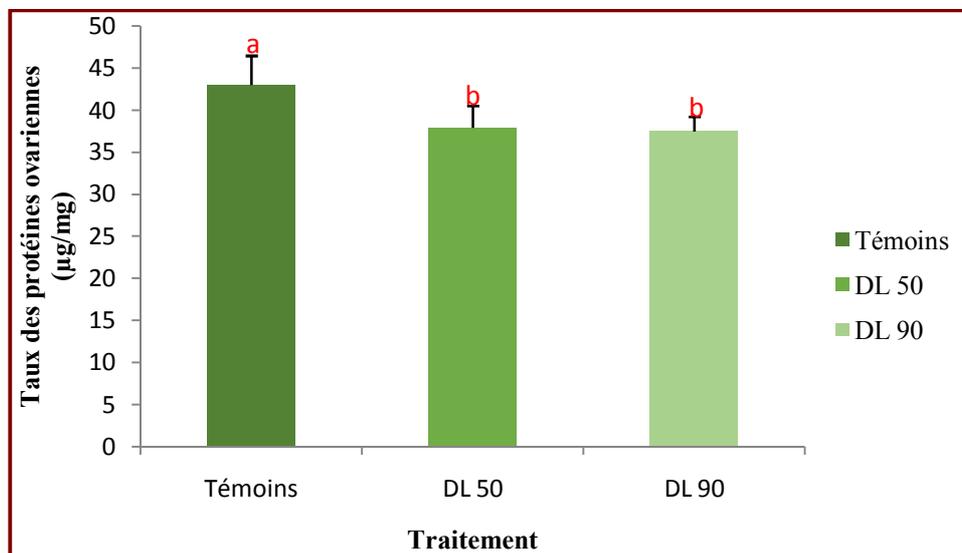


Figure 11. Effet *in vivo* du méthoxyfénozide (DL50, DL90), administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*E. kuehniella* sur le taux des protéines ovariennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$) mesuré à l'émergence adulte (<8h). ($m \pm s$, $n = 5$).

2.2.2. Effet du méthoxyfénozide sur le profil électrophorétique des protéines ovariennes

L'étude électrophorétique sur PAGE-SDS a été menée *in vivo* sur la qualité des protéines ovariennes chez les adultes femelles d'*E. kuehniella* témoins et traitées par le méthoxyfénozide.

La courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (PM) des protéines standards en fonction du rapport frontal (Rf) a été établi avec quatre protéines standards à poids moléculaire connue (Tab .13, Fig .12).

L'étude électrophorétique sur PAGE-SDS (12%), met en évidence 13 fractions protéiques chez les femelles témoins. Ces fractions sont caractérisées par leur mobilité relative (RF) et leur poids moléculaires (PM) qui varient de 25,54 kDa à 183,28 kDa.

La comparaison des profils électrophorétique révèle une différence entre les témoins et les traitées. En effet il y'a une réduction de deux fractions chez les traitées avec la DL50, se sont les fractions 3 et 6 dont les poids moléculaires sont respectivement 136,426 kDa et 93,584 kDa. Chez les traitées avec la DL90 on remarque l'absence de trois fractions ; Ce sont les fractions 3, 5, et 6 dont les poids moléculaires sont respectivement 136,426 kDa, 106,113 kDa et 93,584 kDa (Tab.14, Fig.13).

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

Protéines standards	PM (KDa)	Log (PM)	Rf
Myosin	200,000	2,30103	0,07
B-galactosidase	116,25	2,06539	0,17
Phosphorylase b	97,400	1,98856	0,29
Bovine serum albumin	66,200	1,82086	0,55

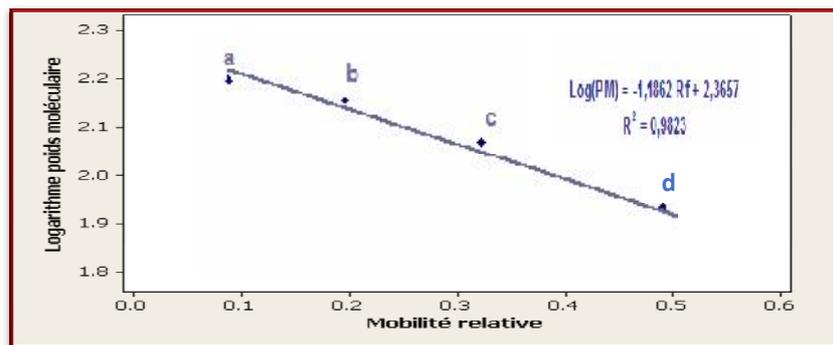


Figure 12. Courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (KDa) des protéines standards en fonctions de leurs mobilités relatives (a : Myosin; b : B Galactosidase; c : Phosphorylase b; d : Bovine serum albumin).

Tableau 14 : Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM Da) des différentes fractions protéiques des ovaires d'*E. Kuehniella* témoins et traitées au RH-2485 (DL50, DL90) par application topique à l'émergence des chrysalides.

Traitement	Témoin		DL50		DL90	
	Rf	PM	Rf	PM	Rf	PM
1	0,02	183,28	0,02	183,28	0,02	183,28
2	0,09	161,30	0,09	161,30	0,09	161,30
3	0,17	136,42	-	-	-	-
4	0,23	120,31	0,23	120,31	0,23	120,31
5	0,29	106,11	0,29	106,11	-	-
6	0,35	93,58	-	-	-	-
7	0,44	77,50	0,44	77,50	0,44	77,50
8	0,58	57,81	0,58	57,81	0,58	57,81
9	0,67	47,88	0,67	47,88	0,67	47,88
10	0,85	32,84	0,85	32,84	0,85	32,84
11	0,88	30,84	0,88	30,84	0,88	30,84
12	0,94	27,20	0,94	27,20	0,94	27,20
13	0,97	25,54	0,97	25,54	0,97	25,54

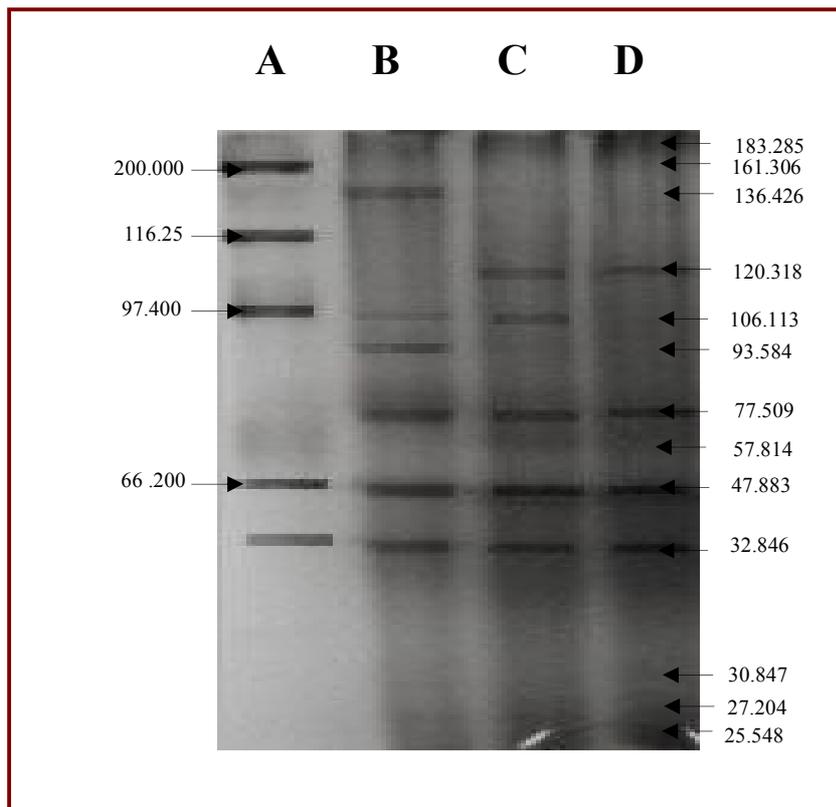


Figure 13. Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines ovariennes des femelles adultes d'*E. kuehniella* témoins et traitées avec le méthoxyfénoside comparée à celle des protéines marqueurs. A : (a : myosine, 200 kDa; b : B Galactosidase, 116,25 kDa, c : phosphorylase b, 97,400 kDa, d : Bovine serum albumin, 66,200 kDa); B : Témoins; C : Traitées avec le RH-2485 (DL50); D : Traitées avec le RH-2485 (DL90) à l'émersion adulte (<8h).

2.3. Effet du méthoxyfénoside sur les vitellogénines et les vitellins dans les ovaires

L'effet *in vivo* du méthoxyfénoside sur le contenu ovarien en vitellogénines et en vitellines a été réalisé par une application topique respectivement aux deux doses DL50 (0,01 μ g /2 μ l d'acétone) et DL90 (0,37 μ g /2 μ l d'acétone) sur des chrysalides femelles nouvellement exuvies d'*E. kuehniella*. Les dissections des femelles dès leur émergence adulte permettent de prélever les ovaires qui seront immédiatement pesés.

2.3.1. Effet du méthoxyfénozide sur les vitellogénines dans les ovaires

D'après les résultats obtenus, on constate que les contenus en vitellogénines ovariens sont approximativement égaux chez les témoins et traitées avec la DL50, ce qui laisse le méthoxyfénozide sans aucun effet significative ($p > 0,05$). Par contre il révèle d'une réduction très significative ($p = 0,004$) de la quantité de vitellogénines dans les ovaires chez les traitées avec la DL90 par rapport aux témoins. (Tab.15, Fig.14).

Tableau 15 : Effet *in vivo* du méthoxyfénozide (DL50, DL90) sur le contenu en vitellogénines dans les ovaires ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu ovarien) chez les adultes d'*E. kuehniella* ($m \pm s$, $n = 5$).

Traitement	Témoin	DL50	DL90
Quantité des vitellogénines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu ovarien)	$83,27 \pm 1,48$ a	$83,22 \pm 1,20$ a	$80,32 \pm 0,533$ b

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.

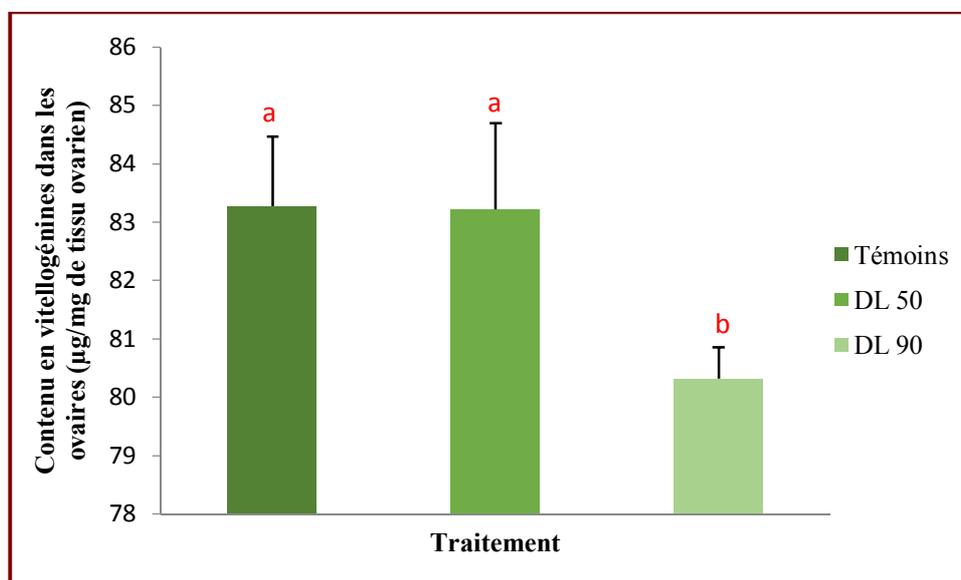


Figure 14. Effet *in vivo* du méthoxyfénozide (DL50, DL90) sur le contenu en vitellogénines dans les ovaires ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu ovarien) chez les adultes d'*E. kuehniella* ($m \pm s$, $n = 5$).

2.3.2. Effet du méthoxyfénozide sur les vitellines dans les ovaires

La comparaison entre les séries témoins et traitées montre que le méthoxyfénozide entraîne une réduction très significative ($p = 0,006$) de la quantité des vitellines dans les ovaires par rapport aux témoins puisqu'il passe de $37,60 \pm 1,11 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les témoins à $34,69 \pm 1,23 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les traités avec la DL50, et une réduction hautement significative ($p = 0,000$) puisqu'il passe de $37,60 \pm 1,11 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les témoins à $31,23 \pm 0,575 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les traités avec la DL90 (Tab.16, Fig.15).

Tableau 16 : Effet *in vivo* du méthoxyfénozide (DL50, DL90) sur le contenu en vitellines dans les ovaires ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus ovarien) chez les adultes d'*E. kuehniella* ($m \pm s$, $n = 5$).

Traitement	Témoin	DL50	DL90
Quantité des vitellines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu ovarien)	$37,60 \pm 1,11$ a	$34,69 \pm 1,23$ b	$31,23 \pm 0,575$ c

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.

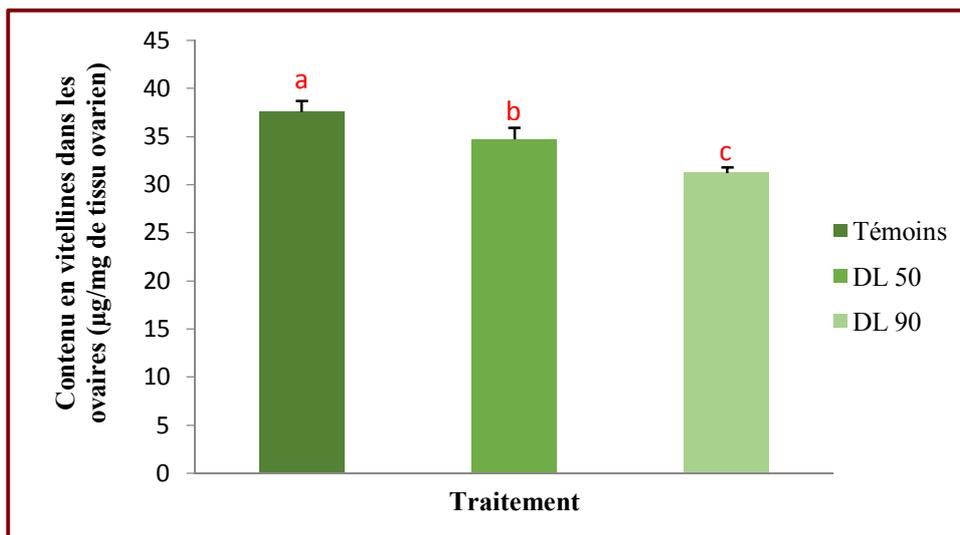


Figure 15. Effet *in vivo* du méthoxyfénozide RH-2485 (DL50, DL90) sur le contenu en vitellines dans les ovaires ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu ovarien) chez les adultes d'*E. kuehniella* ($m \pm s$, $n = 5$).

3. DISCUSSION

3.1. Effet sur la morphométrie des ovaires

Chez les insectes, le développement et la reproduction sont contrôlés par des facteurs externes (température, nutrition, photopériode) mais aussi internes comme les hormones et les neurohormones (Gilbert *et al.*, 2002; Lafont *et al.*, 2005; Gruntenko & Rauschenbach, 2008; Hiruma & Kaneko, 2013). Les deux principales hormones, agissent en coordination dans ces processus physiologiques, sont les ecdystéroïdes et l'HJ.

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

Les œufs des insectes sont volumineux en raison de leur charge en vitellus essentiellement formé par des globules lipidiques et protéiques. La maturation des ovocytes dépend, entre autres, des métabolites prélevés de l'hémolymphe et du matériel synthétisé *in situ* par l'ovaire (Raikhel & Dadialla, 1992).

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

L'étude des ovaires chez les insectes a été beaucoup plus abordée au niveau des étapes terminales du développement qu'au niveau des premières phases (Smagghe & Degheele, 1994 ; Soltani *et al.*, 1998; Farinos *et al.*, 1999; Soltani-Mazouni *et al.*, 2001; Dallaire *et al.*, 2004; Lafont *et al.*, 2005; Sridhara *et al.*, 2013). L'étude de la morphométrie de l'ovaire d'*E. kuehniella* portant sur l'efficacité du méthoxyfénoside a été effectuée au cours du stade nymphale, d'après les données acquises pendant notre expérimentation sur les femelles d'*E. kuehniella*, on constate que la taille de l'ovocyte basal augmente significativement avec l'âge chez la série des témoins (du premier au neuvième jour). L'administration du RH-2485 par application topique (DL50, DL90) à l'émergence des chrysalides, augmente significativement

la taille (longueur, largeur) de l'ovocyte basal à différentes âges au cours de la métamorphose. Des perturbations de la morphométrie de l'ovaire ont été également observées lors du traitement des chrysalides d'*E. kuehniella* avec d'autres mimétiques de l'hormone de mue; en effet le tebufénozide, le halofénozide, et le méthoxyfénozide réduisent la longueur et la largeur de l'ovocyte basal chez les femelles adultes d'*E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005; Khebeb *et al.*, 2008; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

Contrairement à nos résultats, l'application des différents médicaments inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), tel que l'énalapril, le lisinopril et le captopril, réduisent la taille de l'ovocyte basal (longueur, largeur et volume) chez les adultes femelles d'*E. kuehniella* (Bensalem & Soltani-Mazouni, 2013; Yezli-Touiker *et al.*, 2016). Par ailleurs L'halofénozide (RH 0345), affecte la morphométrie des ovaires chez *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001; Taibi, 2007) et chez *Blatella germanica* (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009 ; 2014). Des perturbations de la morphométrie des ovaires avec le RH-5849 et le tébufénozide (RH 5992) sont également observées chez *Plodia interpunctella* (Silhacek *et al.*, 1990; Auzoux-Bordenave, 2005); *S. littoralis* (Smaghe & Degheele, 1992); *S. exempta* (Smaghe & Degheele, 1994 c); *Mamestra brassicae* et *Pieris brassicae* (Darvas *et al.*, 1992) et chez *Choristoneura fumifirana* (Retnakaran *et al.*, 2005). Plusieurs régulateurs de croissance ont été testés sur deux espèces de myriapodes Chilopodes (*Eupolybothrus nudicornis* et *Lithobitus forficatus*) tels que la 20-hydroxyecdysone, le RH-2485, le RH-0345, la JH III et le pyriproxifène; ils entraînent une perturbation de la reproduction en affectant des paramètres morphométrique ainsi que la structure fine de l'ovocyte (Daas *et al.*, 2005 ; 2007).

Le méthoprène, un autre régulateur de croissance, analogue de l'hormone juvénile, appliqué topiquement aux femelles de *B. germanica* réduit le nombre d'ovocytes dans les ovaires, mais augment le volume des ovocytes basaux (Maiza *et al.*, 2004). L'application du KK-42, dérivé de l'imidazole, inhibiteur de la biosynthèse de l'hormone de mue, réduit le nombre d'ovocyte et la longueur de l'ovocyte basal chez *T. molitor* (Amrani *et al.*, 2004). Chez *Blatella orientalis*, l'application topique de l'azadiractine, un antagoniste de l'hormone de mue, a les mêmes effets morphométriques (Tine *et al.*, 2011). Des effets similaires sur la morphométrie ont été obtenus chez *Blatella germanica* avec un insecticide inorganique, l'acide borique, administré par voie orale (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009 b) mais aussi, par injection (Habes *et al.*, 2013).

Ces anomalies morphométriques ont été observées après utilisation d'une autre catégorie de régulateurs de croissance. Ce sont les inhibiteurs de la synthèse de la chitine. Ainsi l'administration du FCX perturbe la morphométrie des ovaires dès le troisième jour de la vie adulte coïncidant avec le début de la sécrétion du chorion au niveau des œufs pondus par les femelles traitées chez *T. molitor* (Taibi, 2000; Hami *et al.*, 2004). De même, des effets sur la morphométrie des ovaires ont été observés après traitement des femelles de *Cydia pomonella* (Soltani & Soltani-Mazouni, 1992) et *Phylloneryctre blancardella* (Marshall *et al.*, 1988) avec le DFB. Une réduction de la taille de l'ovocyte basal chez *Spodoptera litura* (Lépidoptère, Noctuidae) par le Chlorfluazuron a également été rapportée par (Farzana & Tadishi, 2000). L'augmentation de la taille des ovocytes chez les femelles traitées avec le RH-2485, pourrait être expliquée par le fait que le processus de la vitellogénèse chez les insectes est sous le contrôle de la 20E et l'hormone juvénile (Engelmann, 1979; Davis *et al.*, 1990; Cusson *et al.*, 1994; Gäde & Hoffman, 2005). Toute interférence dans l'homéostasie de ces hormones avec des sources exogènes (agonistes ou antagonistes) peuvent entraîner des anomalies dans la croissance des ovocytes, la formation des œufs, et l'embryogenèse (Smagghe *et al.*, 2003), ainsi, les ecdystéroïdes permettent la réinitiation méiotique des ovocytes (Lanot *et al.*, 1987) et l'ovulation (Ruegg *et al.*, 1992) alors que l'HJ contrôle principalement la vitellogénèse mais également la transcription des gènes nécessaire à ce processus (Hoffman & Sorge, 1996; Hoffman *et al.*, 1999).

3.2. Effet sur l'épithélium folliculaire

L'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez les témoins d'*E. kuehniella* au cours de la métamorphose (premier au neuvième jour) augmente significativement avec l'âge pour atteindre son maximum au cinquième jour (vitellogénèse active), puis décroît par la suite (fin de la vitellogénèse). Les mesures de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez les séries traitées, ont montré que l'application du méthoxyfénozide (DL50, DL90), provoque une diminution significative de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire à différents âges par rapport aux témoins. Ceci est en accord avec les résultats obtenus *in vivo* par Taibi *et al.*, (2003) montrant que le RH-0345 réduit l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez les adultes de *T. molitor*.

Par ailleurs, l'application du diflubenzuron réduit l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez *C. pomonella* (Soltani & Soltani-Mazouni, 1992), *T. molitor* (Soltani-Mazouni, 1994).

De même le chlorfuazuron affecte l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez *S. litura* (Farzana & Tadishi, 2000).

Ces effets peuvent être liés à la présence du méthoxyfénozide dans les ovaires d'*E. kuehniella*, ce qui exerce une action agoniste des ecdystéroïdes sur la vitellogenèse et son contrôle endocrine ce qui se traduit par une réduction de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire; cependant chez les Lépidoptères où la vitellogenèse s'effectue au stade nymphale, comme *E. kuehniella*, les ecdystéroïdes stimulent la vitellogenèse, mais à des concentrations bien déterminées, une forte dose ou une concentration élevée de la 20 E inhibe ce processus (Tsuchida *et al.*, 1987). En effet, l'administration de forte dose de la 20 E inhibe la vitellogenèse chez *Lymantria dispar* (Davis *et al.*, 1990).

3.3. Effet sur la structure des ovaires

Chez certains Lépidoptères, notamment *E. kuehniella*, les étapes de la vitellogenèse s'effectuent pendant la vie nymphale. Ainsi, à l'émergence des papillons, la vitellogenèse est terminée et les individus de deux sexes sont matures. L'accouplement et la fécondation ont lieu pendant les 12 premières heures après l'exuviation adulte (Taïbi, 2007; Khebeb *et al.*, 2008; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

Dans les ovaires de type méroïstiques polytrophiques, Les follicules comprennent un ovocyte surmonté de trophocytes, grâce à des liaisons cytoplasmiques, les trophocytes fournissent à l'ovocyte pendant toute la première période de son développement, un apport important de matériaux nutritifs. Ils sont ensuite absorbés par l'ovocyte (Raabe, 1973).

Nos observations microscopiques des lames histologiques, ont permis de montrer, que chez les témoins chaque ovocyte est de forme ovoïde, constitué d'un cytoplasme homogène qui se présente sous forme d'amas de vitellus abondant. L'ovocyte est entouré par des cellules folliculaires, dont l'ensemble forme un follicule, et accompagné par des cellules nourricières de forme cubique.

Après le traitement avec le méthoxyfénozide, les sections des ovarioles sont semblables morphologiquement à celles observées chez les témoins, les ovocytes ont une structure identique à celle décrite précédemment, mais l'application du produit à la DL 50, provoque plusieurs anomalies structurales; représentées par un rétrécissement de certains ovocytes, d'autres sont semi absorbés. L'épithélium folliculaire est devenu mince, en outre les cellules nourricières sont devenues mal formées, réduites en nombre avec des espaces entre eux.

L'application du RH-2485, à la dose la plus forte a provoqué des espaces autour de l'épithélium folliculaire qui devient mince et légèrement vacuolée, des ovocytes semi absorbés. Les cellules nourricières étaient également dégénérées.

Ces observations correspondent à celles menés par (Tripathi & Kumar, 1982) sur *E. kuehniella* montrent que l'administration du méthoxyfénazole affecte la structure des ovarioles causant une dégénérescence au niveau des cellules nourricières, ainsi que l'épithélium folliculaire. Par contre, le traitement avec un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le Diflubenzuron est sans effet sur la structure des cellules folliculaire et les ovocytes basaux chez *T. molitor* (Soltani-Mazouni, 1994).

Plusieurs régulateurs de croissance ont été testés sur plusieurs espèces; Salem *et al.*, (1997) ont rapporté que le RH-5992, affecte la structure fine des ovarioles causant des espaces entre les ovocytes, et enfin la dégénérescence des ovaires chez *Plodia interpunctella*. Le traitement avec le RH-0345 est sans effet significative sur la structure des cellules folliculaires, et des ovocytes basaux chez *T. molitor* (Taibi *et al.*, 2003). L'application d'un antagoniste de l'hormone de mue, l'azadirachtin (CL50, CL90) a causé une malformation des cellules folliculaires et parfois leur dégénérescence totale chez *Nilaparvata lugens* (Homoptères, Delphacidae). (Sengottayan *et al.*, 2007).

Les anomalies structurales observées dans notre expérimentation sont en accord avec ceux trouvés lors du traitement des larves de *S. littoralis* avec le lufenuron (Abdel-Al & Abdel-Wahab, 2007). De plus, trois régulateurs de croissance (chlorfluazuron, tébufénazole et pyriproxifène) semblent affecter la structure de l'ovaire chez les larves de *S. littoralis* (Abdel-Aal & Aziza, 2012). L'application du fénitrothion, un insecticide organophosphoré, aux adultes de *Schistocerca gregaria* (Orthoptère, Acrididae) perturbe l'ovogénèse et atteint la structure fine de l'ovaire des descendants (San-Whouly *et al.*, 2008).

Par ailleurs, le mécanisme d'action sur la reproduction n'est pas encore bien établi et l'impact sur les mâles est peu ou pas abordé. Récemment, Bouzeraa & Soltani-Mazouni, (2014) ont comparé l'activité de deux agonistes de l'hormone de mue; le méthoxyfénazole et le tébufénazole, administrés par application topique sur les chrysalides mâles, ils provoquent des anomalies histologiques telles que la désorganisation cellulaire et l'apparition de cystes de forme sphérique normalement absente chez les adultes. Contrairement à ces travaux, l'administration des différents insecticides (RH-5849, RH-5992, RH-0345 et RH-2485) par

voie topique ne provoque aucune altération des tubes séminifères qui semblent pleins (Meskache, 2014). D'autres études sur le déroulement de la spermatogenèse ont été effectuées sur des orthoptères par Bakr *et al.*, (2010), en traitant les larves du 5^{ème} stade de *S. gregaria* avec deux autres régulateurs d'insectes, tel que l'Héxaflumuron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, et le Fénoxycarbe, un analogue de l'hormone juvénile, ont mis en évidence des anomalies dans les tubes séminifères et dans le déroulement de la spermatogenèse; les mêmes effets ont été observés chez *Earias insulina* (Hussein *et al.*, 1993) et *Heteracris littoralis* (Ghazawi *et al.*, 2007) traités respectivement avec le pyriproxifène, analogue de l'hormone juvénile et un antagoniste de l'hormone de mue, l'azadirachtine. La maturation ovarienne dans son ensemble demeure très complexe puisque de nombreuses interactions synergiques et inhibitrices ont lieu entre ces deux hormones (ecdystéroïdes et l'HJ) et d'autres neurohormones (Bellés, 1995; Hoffmann & Sorge, 1996).

3.4. Effet sur les protéines ovariennes

Le métabolisme intermédiaire est directement impliqué dans plusieurs processus physiologiques (croissance, immunité, mue, reproduction, maturation sexuelle...), qui nécessite un apport quantitatif et qualitatif des divers métabolites à savoir les protéines, les lipides et les glucides (Cole, 2002). Ces constituants biochimiques jouent un rôle métabolique essentiel dans le développement du tractus génital (Kanost *et al.*, 1990).

Chez les femelles adultes d'*E. kuehniella*, une baisse de la quantité des protéines ovariennes a été enregistrée dans les ovaires, après l'application du RH-2485 (DL 50, DL90). Différentes études appuient nos résultats et rapportent l'effet des différents régulateurs de croissance sur ce métabolite; le traitement avec d'autres analogues de l'hormone de mue; le tébufénozide et le halofénozide provoquent une réduction très hautement significative du taux des protéines (Khebeb, 2008; Soltani-Mazouni & Hami, 2010), le même effet réducteur a été enregistré après le traitement des femelles de la même espèce avec un médicament inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; le captopril (Yezli-Touiker *et al.*, 2016). Contrairement à nos résultats une augmentation significative dans le contenu en protéines des ovaires chez *E. kuehniella* a été observée après traitement avec l'énalapril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Bensalem & Soltani-Mazouni, 2013), et le pyriproxifène, un analogue de l'hormone juvénile (Solatni-Mazouni *et al.*, 2012).

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés chez *T. molitor* traité par application topique au captopril (Soltani-Mazouni *et al.*, 2007), chez *Cydia pomonella* traitée au diflubenzuron (Soltani & Soltani-Mazouni, 1992) et au halofénozide chez *B. germanica* (Maiza *et al.*, 2004). Des doses sublétales de chlorfluazuron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, en application topique sur les chenilles du dernier stade de *Spodoptera litura* réduisent significativement les taux des protéines ovarien (Perveen, 2011). Trois régulateurs de croissance; Chlorfluazuron, Tebufénozide et pyriproxifen semblent affecter les protéines ovariennes en réduisant leurs contenus chez *S. littoralis* (Abdel-Aal & Aziza, 2012).

L'étude électrophorétique menée *in vivo* sur les femelles adultes d'*E. kuehniella* a permis de séparer 13 fractions protéiques chez les témoins, dont le poids moléculaires varient de 25,54 KDa à 183,28 KDa. La comparaison des profils électrophorétiques révèle que le méthoxyfénozide utilisé aux deux doses (DL50, DL90) réduit le nombre de fractions protéiques; on note l'absence de 2 fractions chez les traités avec la DL 50, et de 3 fractions chez les traités avec la DL 90. Des résultats similaires ont été trouvé lors du traitement avec la même molécule; en effet le RH-2485 affecte le profil des protéines hémolympatiques et ovariennes chez *Bombyx mori* (Rajathi *et al.*, 2010); *Spodoptera mauritia* (Resmitha *et al.*, 2014). L'application d'autres mimétiques de l'hormone de mue affecte le profile des protéines, tel que le holofénozide, testé sur des femelles adultes de *T. molitor*, qui entraîne l'absence de 2 fractions protéiques (Taibi *et al.*, 2003) et affecte le profil des protéines hémolympatiques chez les nymphes de la même espèce (Lakbar, 1999). Soltani-Mazouni *et al.*, (2004) ont montré que, le holofénozide, le tébufénozide et le méthoxyfénozide affectent le profil électrophorétique en diminuant le nombre de fractions protéiques chez *T. molitor*. Récemment (Yezli-Touiker, 2014) a prouvé que le captopril entraîne l'absence de trois fractions protéiques chez les adultes femelles d'*E. kuehniella*. Le KK-42, un antagoniste de l'hormone de mue, administré *in vivo* (Zerguine, 1998) et *in vitro* (Benlabiod-Boudraa, 1997) chez les femelles de *T. moiltor* réduit aussi le nombre de fractions protéiques ovariennes.

Selon Perveen. (2011), le chlorfluazuron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, diminue la quantité des protéines testiculaires Chez *S. litura*, ce qui suggère une interférence avec la spermatogenèse. Contrairement à nos résultats, le traitement avec le RH-2485 est sans effet significatif chez sur la qualité des protéines testiculaires chez *E. kuehniella* (Bouzeraa & Soltani-Mazouni, 2014).

La chute des taux des protéines ovariennes, et la modification de l'aspect des ces protéines affecte significativement le processus de la reproduction. Ces effets observés après

traitement avec le méthoxyfénozide, peuvent être attribués à son effet perturbateur de croissance des insectes (IGDs) *via* une perturbation de l'équilibre hormonal (HJ-20 E), en effet ce composé est connu pour son effet agoniste de la 20 E, qui miment l'action de l'hormone de mue, et affecte plusieurs paramètres de la reproduction (Seth *et al.*, 2004 ; Smagge *et al.*, 2004, 2012 ; Saenz-de-Cabezón *et al.*, 2005 ; Rodríguez *et al.*, 2010 ; Dhadialla *et al.*, 2005, 2010).

3.5. Effet sur les vitellogénines et les vitellines

Durant la maturation sexuelle, le corps gras libère ces nutriments ou précurseurs; les protéines (nombreuses et variées sont représentées par les vitellines, qui proviennent des vitellogénines), glucides et lipides qui seront captés *via* l'hémolymphe par les gonades pour y être utilisés à des fins énergétiques (Downer, 1985; Stanley-Samuelson *et al.*, 1988; Raikhel & Dhadialla, 1992; Stanley-Samuelson & Pedibothla, 1996; Soulages & Wells, 1994) sous la dépendance d'un contrôle hormonal exercé par les ecdystéroïdes et l'HJ (Bellés, 1995 ; Ramswamy *et al.*, 1997). L'HJ contrôle, sous l'action du cerveau, la transcription des gènes de la vitellogénines et leurs synthèse (Li *et al.*, 2003, 2004).

Le méthoxyfénozide, administré aux doses testées (DL50 et DL90) chez les chrysalides d'*E. kuehniella* affecte la vitellogenèse chez les adultes femelles; en effet, l'évaluation des vitellogénines et des vitellines dans les ovaires, montre une réduction dans leur contenu. Des résultats similaires ont été trouvés lors de l'administration d'un antagoniste de l'hormone de mue; l'azadirachtin, à des pupes de *Drosophila melanogaster* (Boulahbel *et al.*, 2015), En effet, l'application d'analogues de l'hormone juvénile, le methoprène ou encore le pyriproxifène entraînent une réduction dans le contenu en vitellogénines et vitellines chez divers ordres insectes (Pinto *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2010), les mêmes effets sont observés avec les agonistes des ecdystéroïdes (Sridhara & Lee, 2013; Mordue *et al.*, 2005). Par ailleurs, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le teflubenzuron, diminue la synthèse des vitellogénines et leur incorporation par les ovocytes chez *Locusta migratoria* (Acheuk *et al.*, 2012). D'autres pesticides non polluants, comme le spinosad ou l'indoxacarbe, à mode d'action neurotoxique ont le même effet chez *B. germanica* ou *Blattella orientalis* (Tine, 2013; Maiza *et al.*, 2013). Contrairement à nos résultats, l'application de l'insuline et la 20-hydroxyecdysone (20E) augmentent le contenu en vitellogénines et en vitellines dans les ovaires des chrysalides d'*E. kuehniella* (Delhoum *et al.*, 2016). On peut donc penser que ces

effets négatifs observés sur les taux des vitellines et les vitellogénines ovariennes sont probablement liée à l'interférence du méthoxyfénoside avec la synthèse des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires et/ou leur absorption par les ovocytes. En effet une diminution dans le contenu en protéines ovariennes suggérant une inhibition dans la synthèse des vitellogénines et / ou leurs captation par l'ovocyte a été rapportée chez *Spodoptera exempta* (Tranzubil Mc Caffery, 1990) et *D. melanogaster* (Boulahbel *et al.*, 2015).

1. INTRODUCTION

Les Lépidoptères, sont des insectes évolués à métamorphose complète ou Holométaboles, présentent successivement trois phénotypes différents : larve, nymphe et adulte. Trois types de cuticules sont successivement sécrétées par l'épiderme : cuticule larvaire, nymphale et adulte.

Le passage d'un phénotype à un autre est régulé par des hormones de développement (Koolman, 1990; Dhadiella *et al.*, 1998) dont les ecdystéroïdes qui sont responsables du déclenchement de la mue et l'hormone juvénile qui détermine la nature de la mue (Riddiford 1994,1996; Gilbert *et al.*, 1997, 2002) (Fig.17).

Les ecdystéroïdes, sont des stéroïdes polyhydroxylés présents, chez tous les insectes (Li *et al.*, 2006). Ils sont essentiels à chaque mue et à chaque changement morphologique qu'un insecte subit (Svoboda & Feldlaufer, 1991). En effet, ils régulent la mue, la métamorphose, l'ovogenèse et la reproduction (Bloch *et al.*, 2000). Les deux ecdystéroïdes les plus communs chez les insectes sont l'ecdysone (E) et la 20-hydroxyecdysone (20 E). L'ecdysone est le premier ecdysteroïde isolé par Butenandt & Karlson en 1954 (Dinan, 2001). Sa structure chimique a été identifiée par Hoppe & Huber (1965), et sa voie biosynthétique est complexe; le précurseur synthétique est le cholestérol, substance que les insectes ne peuvent pas synthétiser, il dépend d'un apport exogène (Lafont *et al.*, 2002; Neubueser *et al.*, 2005). La plupart des intermédiaires impliqués dans cette synthèse ont été identifiés et les réactions enzymatiques correspondantes sont maintenant bien connues (Gilbert *et al.*, 2002; Gilbert & Rewitz, 2009).

Au moins 9 étapes sont nécessaires à cette transformation (Li *et al.*, 2006). Elle commence par une réduction en 7 β et 8 β du cholestérol grâce à une 7,8-déshydrogénase non identifiée présente dans la glande prothoracique. Le 7-déshydrocholestérol ainsi obtenu serait, semble-t-il, convertit en 2,22,25-tridésoxyecdysone (Kétodiol). Arrive ensuite une série d'hydroxylation menant au 2,22-didésoxyecdysone (Kétotriol) puis au 2-désoxyecdysone, pour terminer par l'ecdysone et le 20-hydroxyecdysone (Gilbert *et al.*, 2002) (Fig. 16).

Ces ecdystéroïdes agissent en modifiant la transcription de gènes spécifiques. La 20E entre dans les cellules cibles et migre jusqu'au noyau où elle se lie à une molécule réceptrice, le récepteur d'ecdysone (EcR). Pour agir, le récepteur a besoin de former un

hétérodimère avec la protéine ultraspiracle (USP) (Yao *et al.*, 1992; Bonneton *et al.*, 2003; Henrich, 2005) (Fig.18). Le complexe EcR-USP et 20E interagit soit avec une séquence palindromique (Cherbas *et al.*, 1991) ou une répétition directe (Antoniewski *et al.*, 1996) dans la région du promoteur d'un gène pour induire de nouveaux transcrits d'ARN (Koolman, 1990). Durant la phase ascendante du pic, la fixation de la molécule 20E sur le complexe EcR-USP entraîne l'expression d'une cascade de gènes appelés « up regulated genes » il s'agit de BR-C (Broad complexe), E74, E75 (Kokoza *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007) qui code pour la division des cellules épidermiques, la sécrétion du fluide exuvial, la digestion cuticulaire, la synthèse de la cuticuline et l'épicuticule. Au cours de la phase descendante du pic de la 20 E, est en conséquence de la faible concentration ou l'absence de l'hormone, une autre série de gènes «down regulated genes » s'expriment, permettant la mélanisation, la libération de l'hormone d'éclosion et la sclérotisation (Retnakaran *et al.*, 2003). La régulation de l'action des ecdystéroïdes se ferait principalement par les niveaux de l'hormone elle même.

En effet, les fluctuations dans les niveaux de récepteur correspondent aux fluctuations des titres d'ecdystéroïdes. Le nombre de récepteurs à tout moment durant le développement serait donc régulé par les titres de l'hormone (Deak & Lauter, 1995). Les ecdystéroïdes de l'hémolymphe peuvent aussi jouer un rôle de régulation de la biosynthèse d'ecdysone à certaines périodes de développement, *via* la régulation par rétroaction de l'axe de PTTH et *via* l'action directe sur les glandes productrices d'ecdystéroïdes (Beydon & Lafont, 1983). L'HJ est aussi reconnue pour moduler les niveaux d'ecdystéroïdes (Riddiford, 2008).

Le cycle cuticulaire débute par l'apolyse de l'ancienne cuticule, qui sera digérée partiellement par les enzymes protéolytiques et chitinolytiques du liquide de mue. Après la synthèse de l'épicuticule et des assises pré-exuviales, la synthèse se poursuit par le dépôt des assises post- exuviales (Hadeley, 1986).

La cuticule d'un stade déterminé, devenue trop étroite, est remplacée par celle plus vaste du stade suivant, ainsi que la métamorphose des Lépidoptères implique un stade nymphal, pendant lequel les structures adultes sont élaborées à partir des structures larvaires. A la fin de la période nymphale se produit l'émergence des adultes capables de se reproduire (Evans, 1984; Gullan & Cranston, 2005).

Les changements morphologiques, physiologiques et comportementaux de l'organisme durant la métamorphose des insectes résultent de la régulation de l'expression des gènes par l'hormone de mue (20E), en l'absence ou en présence de l'hormone juvénile (JH) (Riddiford, 1996; Gilbert *et al.*, 2002; Lafont *et al.*, 2005). Aussi il existe des neuropeptides qui sont directement ou indirectement impliqués dans le processus de l'exuviation et d'éclosion telle que l'hormone de d'éclosion (HE), l'hormone de déclenchement de la pré-exuviation (PETH), l'hormone de déclenchement de l'exuviation (ETH), le bursicon qu'est un peptide activant la biosynthèse des phéromones (PBAN) (Gäde & Hoffmann, 2005).

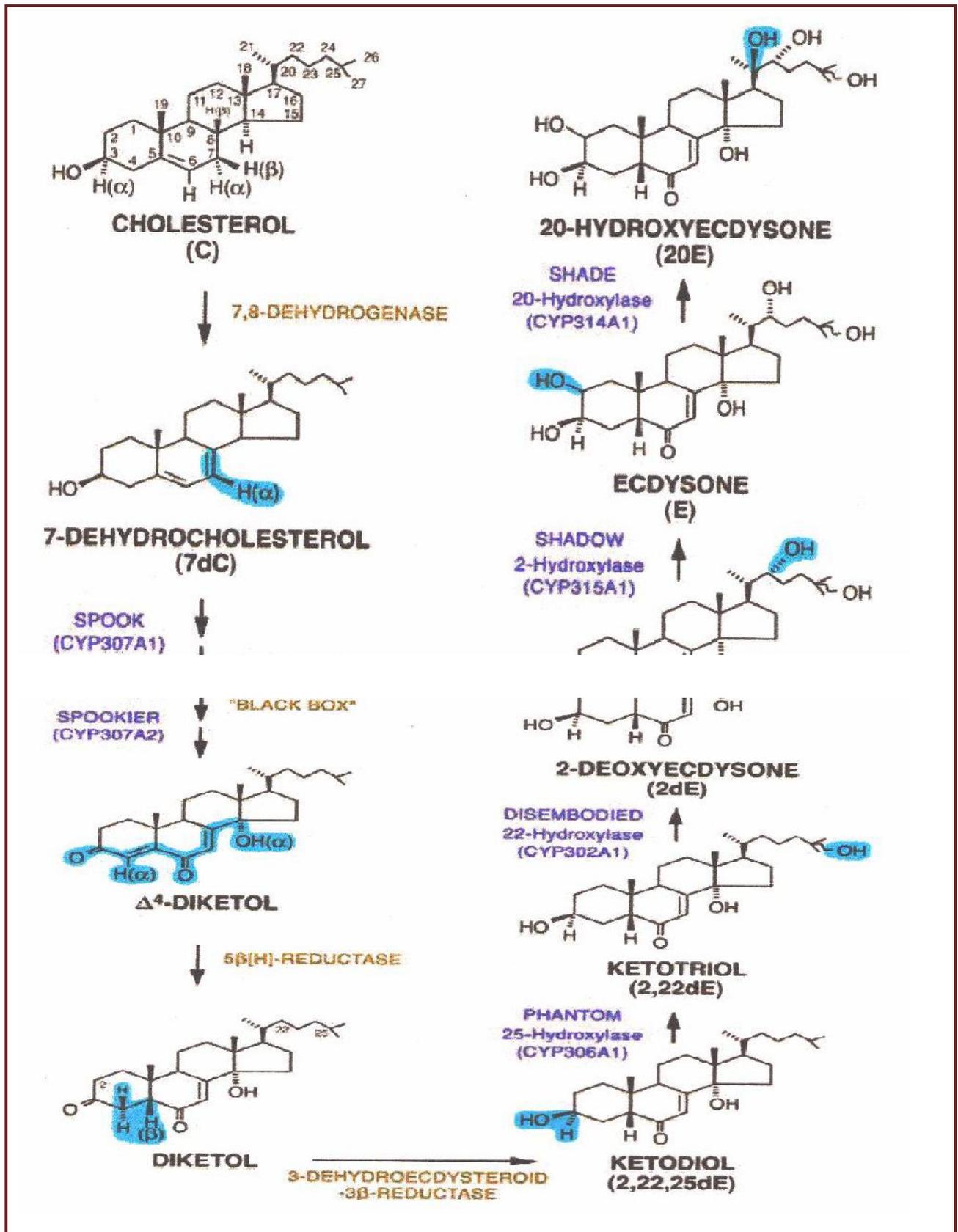


Figure 16. La biosynthèse de l'ecdysone (Gilbert & Rewitz, 2009).

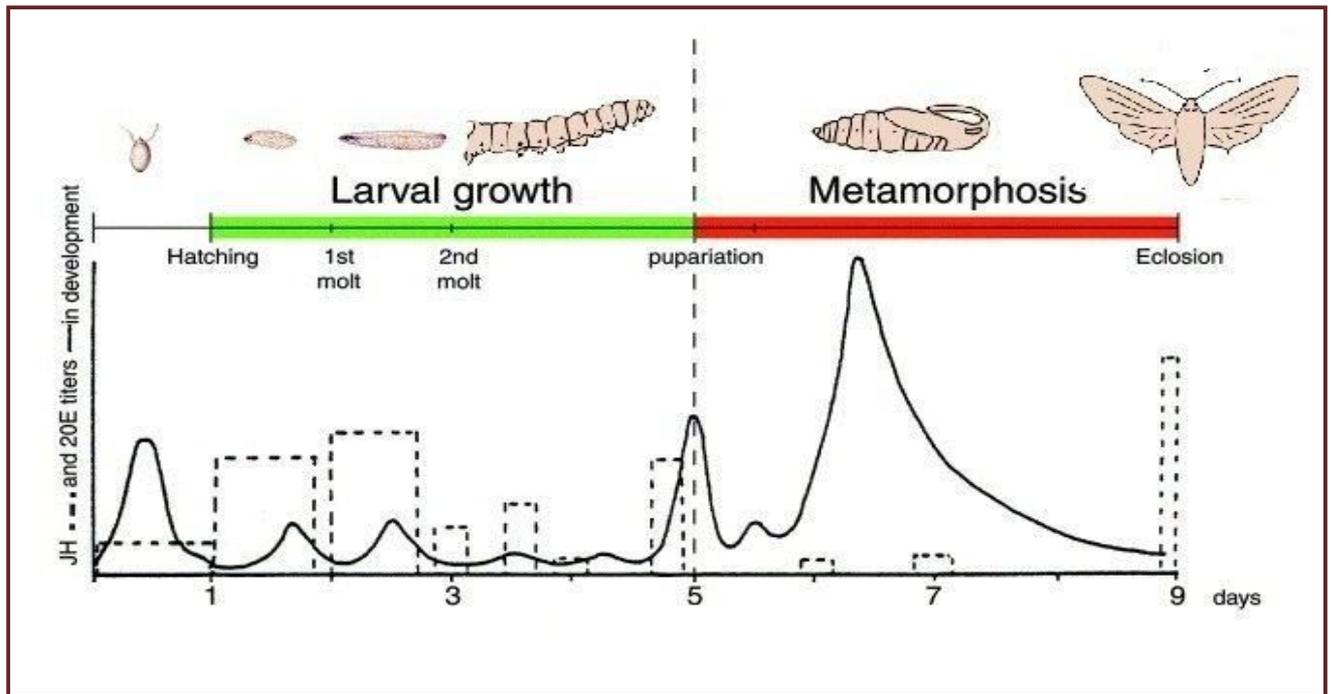


Figure 17. Contrôle hormonal des différents types de mue chez les insectes (Truman & Riddiford, 1999).

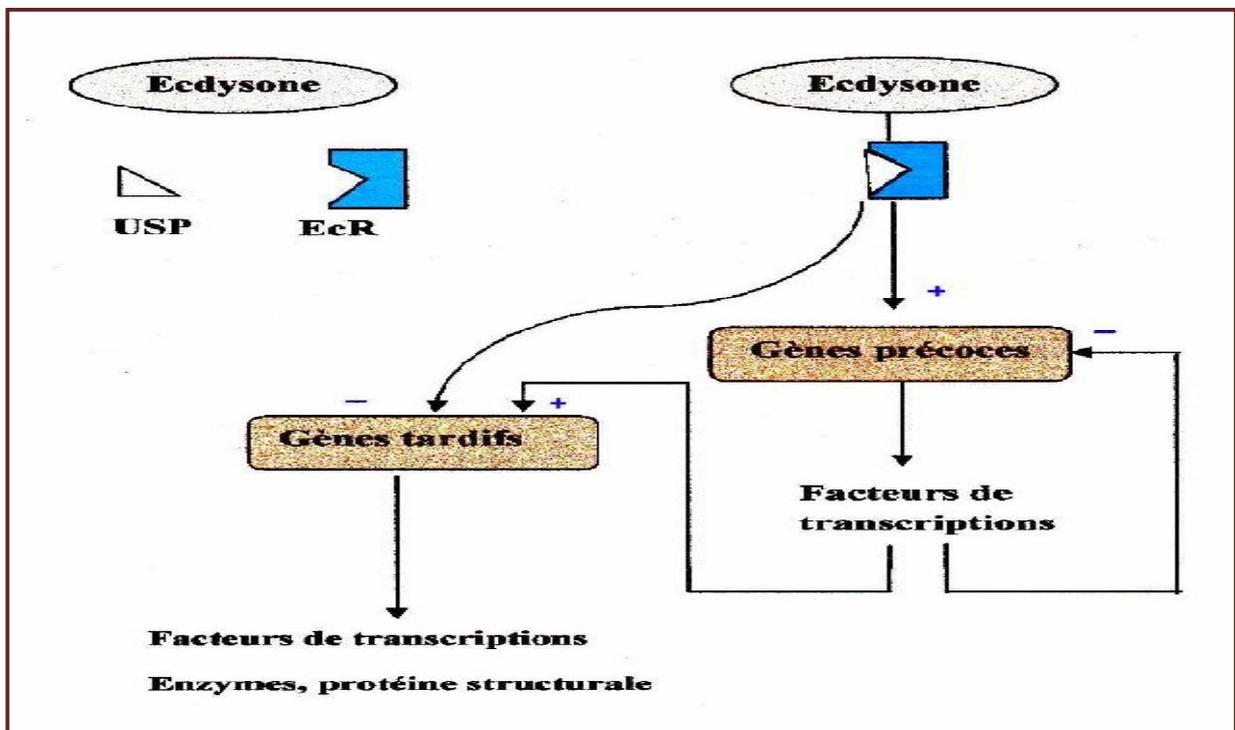


Figure 18. Mode d'action des ecdystéroïdes (Klowden, 2010).

2. RESULTATS

2.1. Effet du méthoxyfénoside sur la sécrétion cuticulaire

Les épaisseurs de la cuticule totale nymphale (ancienne cuticule) et de la nouvelle cuticule (cuticule pré-exuviale adulte) ont été estimées sur des coupes histologiques du tégument périphérique à différents âges au cours du stade nymphal (de 0 à 9 jours). Les résultats sont représentés dans les (Tableaux 17, 18) et les (Figures 19, 20).

2.1.1. Effet du méthoxyfénoside sur l'épaisseur de la cuticule nymphale

L'épaisseur de la cuticule nymphale augmente significativement avec l'âge pour atteindre un maximum de $13,792 \pm 0,99 \mu\text{m}$ au troisième jour pour la série des témoins. Le même profil a été enregistré chez les séries traitées, avec une augmentation de $15,96 \pm 0,80 \mu\text{m}$ pour la DL50, et de $17,42 \pm 0,99 \mu\text{m}$, pour les traités avec la DL90, puis elle décroît significativement par la suite en raison de la digestion des couches profondes de l'ancienne cuticule.

L'analyse statistique montre que le méthoxyfénoside entraîne une augmentation hautement significative au premier jour ($p = 0,000$) chez les traités avec la DL90.

La comparaison entre les séries témoins et traités au troisième jour montre que le RH-2485 induit, une augmentation très significative ($p = 0,007$) de l'épaisseur de la cuticule nymphale chez les chrysalides traités avec la DL50, une augmentation hautement significative ($p = 0,000$) a été enregistré chez les chrysalides traités avec la DL90 par rapport aux témoins.

Au cinquième jour, le traitement avec le méthoxyfénoside révèle d'une augmentation hautement significative ($p = 0,000$) seulement chez les traités avec la dose la plus forte par rapport aux témoins.

Par ailleurs au septième jour de la vie nymphale, l'analyse statistique des données, révèle comparativement aux témoins une augmentation très significative ($p = 0,007$) chez les traités avec la DL50, et une augmentation hautement significative ($p = 0,000$) chez les traités avec la DL90.

De plus, au neuvième jour de la vie nymphale, le traitement avec le RH-2485, a induit une augmentation très significative ($p = 0,001$) seulement chez les traités avec la DL90 par rapport aux témoins.

2.1.2. Effet du méthoxyfénoside sur l'épaisseur de la nouvelle cuticule

La nouvelle cuticule ou cuticule pré-exuviale adulte est secrétée immédiatement après l'apolyse (troisième jour), l'épaisseur de la nouvelle cuticule augmente progressivement pour atteindre un maximum de $7,62 \pm 0,50 \mu\text{m}$ au neuvième jour pour la série de témoins. Le même profil a été enregistré chez les séries traitées avec une augmentation de $8,63 \pm 0,40 \mu\text{m}$ pour les traités avec la DL50, et de $9,50 \pm 0,30 \mu\text{m}$ pour la DL 90 au neuvième jour de la vie nymphale (la veille de l'exuviation adulte).

L'administration du méthoxyfénoside à des chrysalides de 0 jour aux deux doses testées montre une augmentation significative au cinquième ($p = 0,026$) et au septième ($p = 0,024$) jour de la vie nymphale, seulement chez les traitées avec la DL90 par rapport aux témoins.

Au neuvième jour, la comparaison entre les séries, témoins et traités montre que le méthoxyfénoside a induit, une augmentation très significative de l'épaisseur de la nouvelle cuticule ($p = 0,010$) chez les traitées avec la DL50, et une augmentation hautement significative chez les traités avec la DL90 ($p = 0,000$).

Tableau 17 : Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de la cuticule nymphal d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 6).

Ages (jours)	Témoins	RH-2485 DL50	RH-2485 DL90
0J	8,34 ± 0,99 A	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1J	10,16 ± 0,99 a B	11,25 ± 0,80 a	13,79 ± 0,99 b
3J	13,79 ± 0,99 a C	15,96 ± 0,80 b	17,42 ± 0,99 c
5J	12,33 ± 0,80 a C	13,42 ± 0,99 a	16,69 ± 0,81 b
7J	11,25 ± 0,80 a B	13,42 ± 0,99 b	16,69 ± 0,81 c
9J	8,34 ± 0,99 a A	9,79 ± 0,99 a	11,61 ± 0,99 b

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.
- Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à différents temps pour une même série.

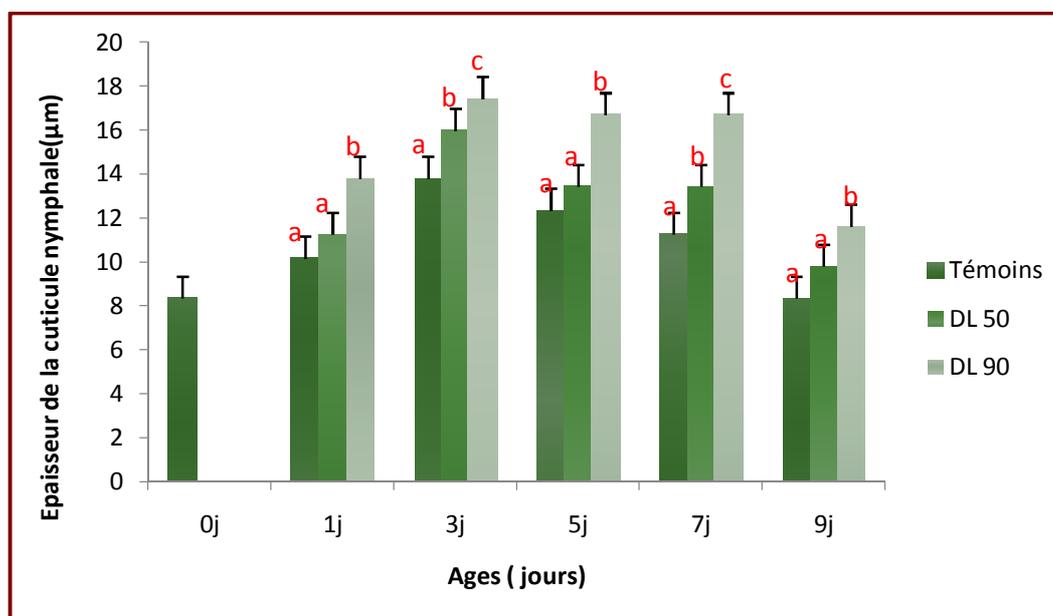


Figure 19. Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de la cuticule nymphal d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 6).

Tableau 18 : Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de la nouvelle cuticule d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 6).

Ages (jours)	Témoins	RH-2485 DL50	RH-2485 DL90
3J	00,00 ± 0,00		
5J	5,58 ± 0,32 a A	5,73 ± 0,30 a	6,09 ± 0,16 b
7J	6,67 ± 0,55 a A	6,96 ± 0,30 a	7,54 ± 0,39 b
9J	7,62 ± 0,50 a B	8,63 ± 0,40 b	9,50 ± 0,30 c

- Les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre différentes séries durant le même temps.
- Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à différents temps pour une même série.

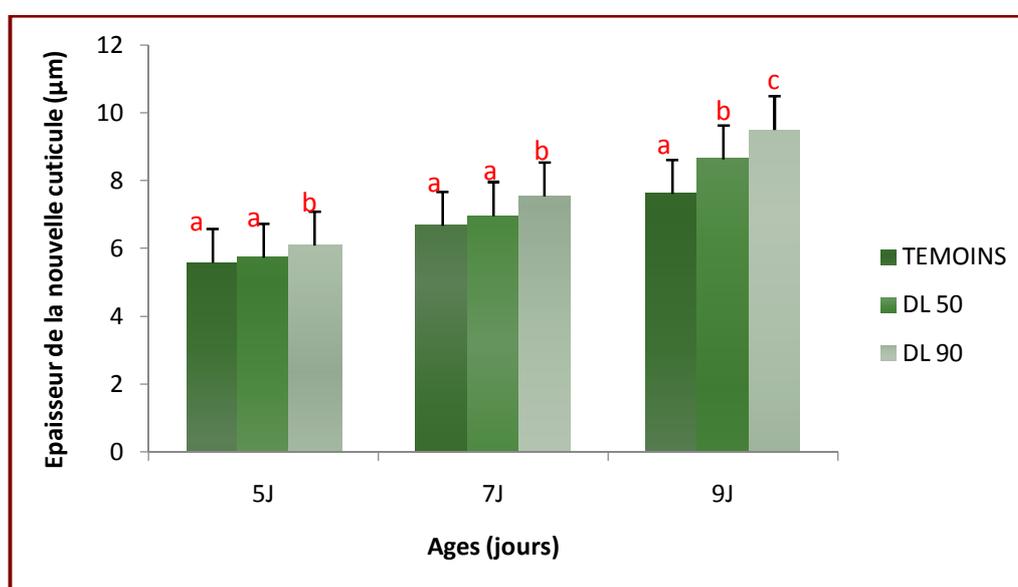


Figure 20. Effet *in vivo* d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-2485 (0,01µg, 0,37µg / 2µl) sur l'épaisseur (µm) de la nouvelle cuticule d'*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± s, n = 6).

2.2. Effet du méthoxyfénoside sur la structure du tégument sternal abdominal

Les observations au microscope photonique des lames à différents âges au cours de la métamorphose nous montrent que chez les témoins à l'exuviation nymphale, la cuticule pré-exuviale est déjà sécrétée et mesure aux environs de 8,34 μm . La cuticule post-exuviale nymphale est mise en place durant les trois premiers jours de la vie nymphale. A l'apolyse (3 jours), elle mesure aux environs de 13,79 μm (Fig.21 D). La sécrétion de la cuticule adulte commence au quatrième jour de la vie nymphale et présente son maximum à la veille de l'exuviation imaginal ou elle mesure aux environs de 7,62 μm . Elle se prolonge jusqu'à trois à quatre jours après l'exuviation imaginale (Fig.21 G, J).

Chez les séries traitées avec le méthoxyfénoside aux deux doses testées, le traitement *in vivo*, à provoquer des augmentations significatives aux niveaux des épaisseurs de l'ancienne et de la nouvelle cuticule à différents âges au cours de la métamorphose (Fig. 21 B, C, E, F, H, I, K, L).

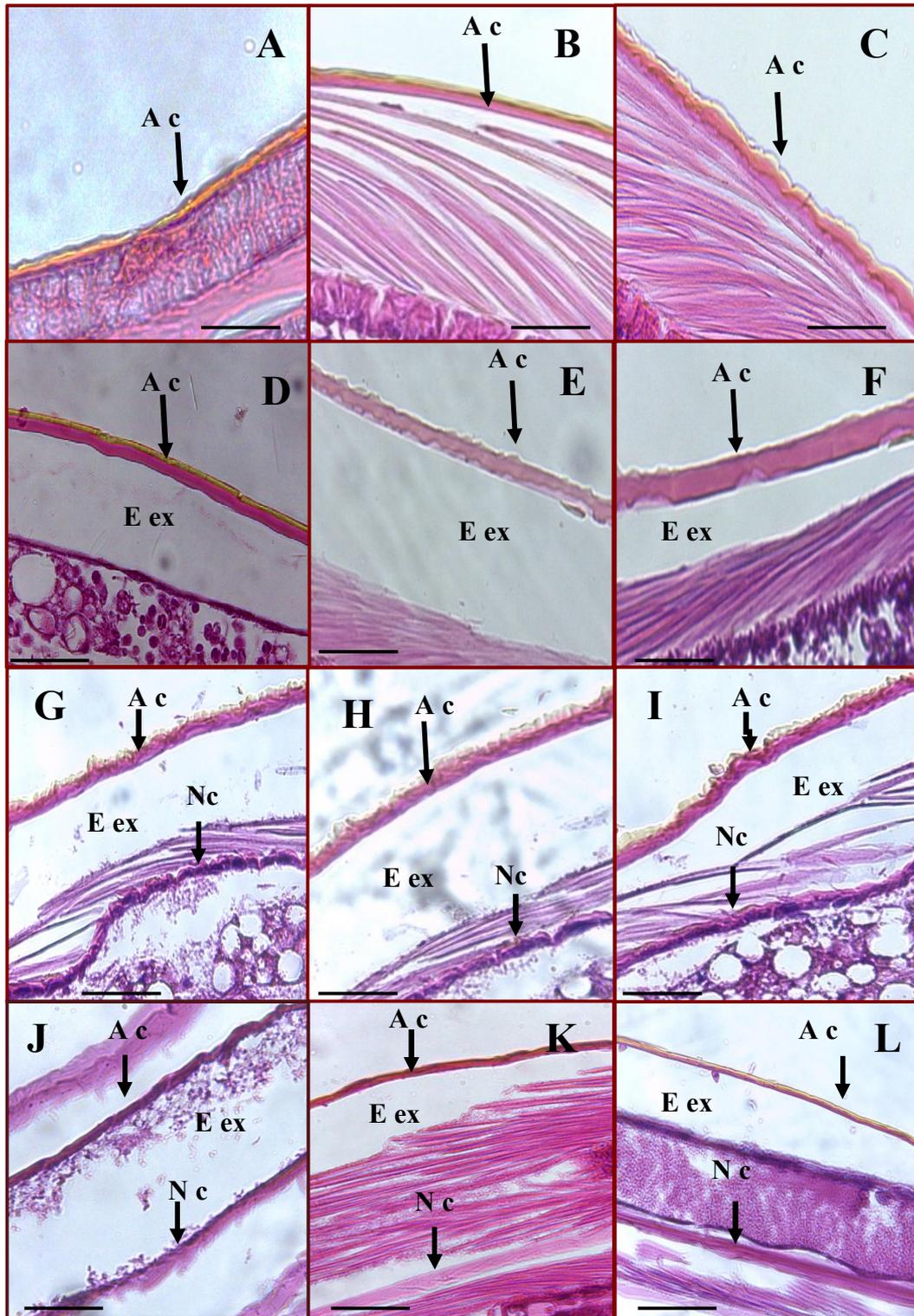


Figure 21. Coupes histologiques montrant le tégument sternal abdominal prélevés sur des chrysalides femelles d'*E. kuehneilla* à différentes âges au cours de la métamorphose (A; B; C; J; K; L x 10), (D; E; F; G; H; I x 40). (A) : Témoin 1 jour ; (B) : Traité avec la DL50 1 jour; (C) : Traité avec la DL90 1 jour; (D) : Témoin 3 jour; (E) : Traité avec la DL50 3 jour; (F) : Traité avec la DL90 3 jour ; (G) : Témoin 5 jour ; (H) : Traité avec la DL50 5 jour; (I) : Traité avec la DL90 5 ;(J) : Témoin 9 jour ; (K) : Traité avec la DL50 9 jour ; (L) : Traité avec la DL90 9 jour. Ac : Ancienne cuticule ; E ex : Espace exuvial ; Nc : Nouvelle cuticule. La barre d'échelle correspond à 30 μ m (A, B, C, D, K, L); 50 μ m (E, F, G, H, I, J).

3. DISCUSSION

3.1. Effet du méthoxyfénazole sur la sécrétion cuticulaire

Le tégument des insectes est composé d'un exosquelette ou cuticule qui constitue une acquisition fondamentale dans l'évolution des Arthropodes. Cette cuticule est composée d'une couche fine externe, ou épicuticule, riche en lipides cuticulaires (Vincent & Wegst, 2004) qui assure aux insectes une protection contre la déshydratation, une régulation de la perméabilité cuticulaire et une protection contre les microorganismes et les champignons entomopathogènes et une couche interne, la procuticule (exocuticule et endocuticule) plus épaisse, composée de protéines et essentiellement de chitine qui assure son intégrité structurale (Nation, 2002). La cuticule est entièrement renouvelée au cours du développement lors des phases de mues qui permettent la croissance de l'animal.

La mue est un processus complexe qui implique des changements hormonaux et comportementaux ainsi que des changements aux niveaux de l'épiderme et de la cuticule (Gullan & Cranston, 2005). Ce phénomène se produit en deux étapes principales : l'apolyse et l'ecdysis. A l'apolyse, l'épiderme se sépare de la cuticule du stade précédent. Entre l'apolyse et l'ecdysis, l'insecte « nouveau » est à l'état pharate, caché sous sa vieille cuticule. C'est cette étape, parfois difficile à observer, qui sert à identifier le début et la fin de chaque stade. L'ecdysis est l'étape où l'insecte se débarrasse de son ancienne cuticule, ou exuvie (Fig. 22). A chaque mue, la région profonde de la cuticule est digérée, ce qui amincit cette enveloppe et permet sa déchirure. Les muscles vont pouvoir se détacher, autorisant le rejet des parties les plus superficielles de la cuticule (exuvie) (Retnakaran *et al.*, 1997; Dhadialla *et al.*, 2005).

Les ecdystéroïdes sont des activateurs primaires du développement des insectes et leurs rôles dans la régulation de la mue et la métamorphose sont bien caractérisés (Spindler *et al.*, 2009). En effet la 20E initie le processus de mue, tandis que l'HJ détermine la nature du phénotype (Truman & Riddiford, 2007). L'apolyse larvo-nymphale se produit et se termine avant le pic larvaire de la 20E, par contre, l'apolyse nympho-adulte commence au début de l'augmentation du taux de la 20E nymphale. En effet la production hormonale, notamment, des ecdystéroïdes et la cuticulogénèse sont deux processus qui apparaissent intimement liés au cours du développement des insectes (Quenmedey *et al.*, 1995).

Une analyse quantitative des ecdystéroïdes au cours du stade nymphale dans le corps entier des chrysalides d'*E. kuehniella*, révèle que les taux hormonaux augmentent significativement dès le troisième jour de la vie nymphale pour atteindre un pic localisé au cinquième jour (Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011). Ce pic est responsable du développement imaginal puisqu' il coïncide avec la synthèse de la cuticule pré-éxuviale adulte qui débute au quatrième jour et se poursuit jusqu'à la veille de l'exuviation adulte (Maamcha, 1997, Yezli-Touiker & Soltani-Mazouni, 2011), ce pic est retrouvé également chez les mâles d'*E. kuehniella* (El Ouar *et al.*, 2010). Il est également l'équivalent du pic unique retrouvé chez *T.molitor* (Aribi *et al.*, 2006; Soltani *et al.*, 2002; Berghiche *et al.*, 2007) et *Zophabas atratus* (Aribi *et al.*, 1999). Le deuxième pic d'ecdystéroïdes détecté chez la plupart des insectes est localisé au troisième jour et paraît d'origine ovarienne (Zimowski *et al.*, 1991); chez les chrysalides femelles de *C. pomonella* le deuxième pic est étroitement corrélé avec l'évolution de la taille de l'ovocyte basal et de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire (Soltani, 1986), alors que celui du cinquième jour est d'origine prothoracique. Les variations des taux des ecdystéroïdes au cours de la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sont avec les événements épidermo- cuticulaires; l'augmentation des taux serait responsable de l'induction d'un nouveau cycle cuticulaire, l'exuviation adulte s'effectue sous des taux d'ecdystéroïdes relativement bas confirmant les travaux antérieurs (Dhadialla *et al.*, 2005). L'administration du méthoxyfénoside (0,01µg, 0,37µg), n'affecte pas la cinétique et la séquence des principaux événements épidermo- cuticulaires qui se déroulent normalement comme chez les séries témoins, en outre le RH-2485, augmente significativement l'épaisseur de la cuticule totale et de la nouvelle cuticule à différentes âges au cours de la métamorphose. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés récemment par (Tazir *et al.*, 2016) où il est noté que le traitement avec deux mimétiques de l'hormone de mue, le RH-5849 et le tébufénoside affectent la sécrétion cuticulaire; avec une augmentation de la cuticule nymphale et la cuticule adulte au cours de la métamorphose chez *E. kuehniella*.

Les mensurations des cuticules sécrétées par le tégument sternal abdominal nymphal indiquent que l'épaisseur de la nouvelle cuticule augmente à différents temps chez *T. molitor* lors du traitement *in vitro* avec un agoniste des ecdystéroïdes le halofénoside, (Soltani *et al.*, 2002). Le captoprile (médicament inhibiteur de l'enzyme de conversion de conversion de l'angiotensine) appliqué topiquement aux femelles d'*E. kuehniella* augmente

significativement l'épaisseur de la cuticule totale à différentes âges au cours de la métamorphose (Yezli-Touiker, 2014). Il a été démontrée que le RH-0345, appliqué sur des larves du quatrième stade des moustiques *C. pipiens* augmente l'épaisseur de l'ancienne et de la nouvelle cuticule (Boudjelida *et al.*, 2002, 2005), contrairement a nos résultats, l'addition du pyriproxifène (un analogue de l'HJ) au milieu de culture des explants tégumentaires nymphaux de *T. molitor* aux deux doses testées, 1 et 10 μM , réduit significativement l'épaisseur de la nouvelle cuticule sécrétée *in vitro* (Aribi *et al.*, 2006). Aussi, l'injection des inhibiteurs de la synthèse de la chitine tels que le FCX et le TFM, aux nymphes de *T. molitor* nouvellement exuviées a causé une diminution de l'épaisseur de la cuticule (Soltani *et al.*, 1993, 1996). Ainsi, le traitement par le halofénozide, induit *in vitro* la sécrétion d'une nouvelle cuticule de manière similaire à celle de la 20 E chez *T. molitor* (Berghiche *et al.*, 2007). Le flucycloxuron, un inhibiteur de la synthèse la chitine, administré à des chrysalides d'*E. kuehniella* perturbe la sécrétion cuticulaire, réduit l'épaisseur de la cuticule et retarde légèrement l'apolyse (Bendjedou *et al.*, 1998). Récemment, le pyriproxifène, un analogue de l'hormone juvénile, semble affecter la sécrétion cuticulaire en augmentant l'épaisseur de la nouvelle cuticule, après son application sur les larves de *D. melanogaster* (Bensebaa *et al.*, 2015).

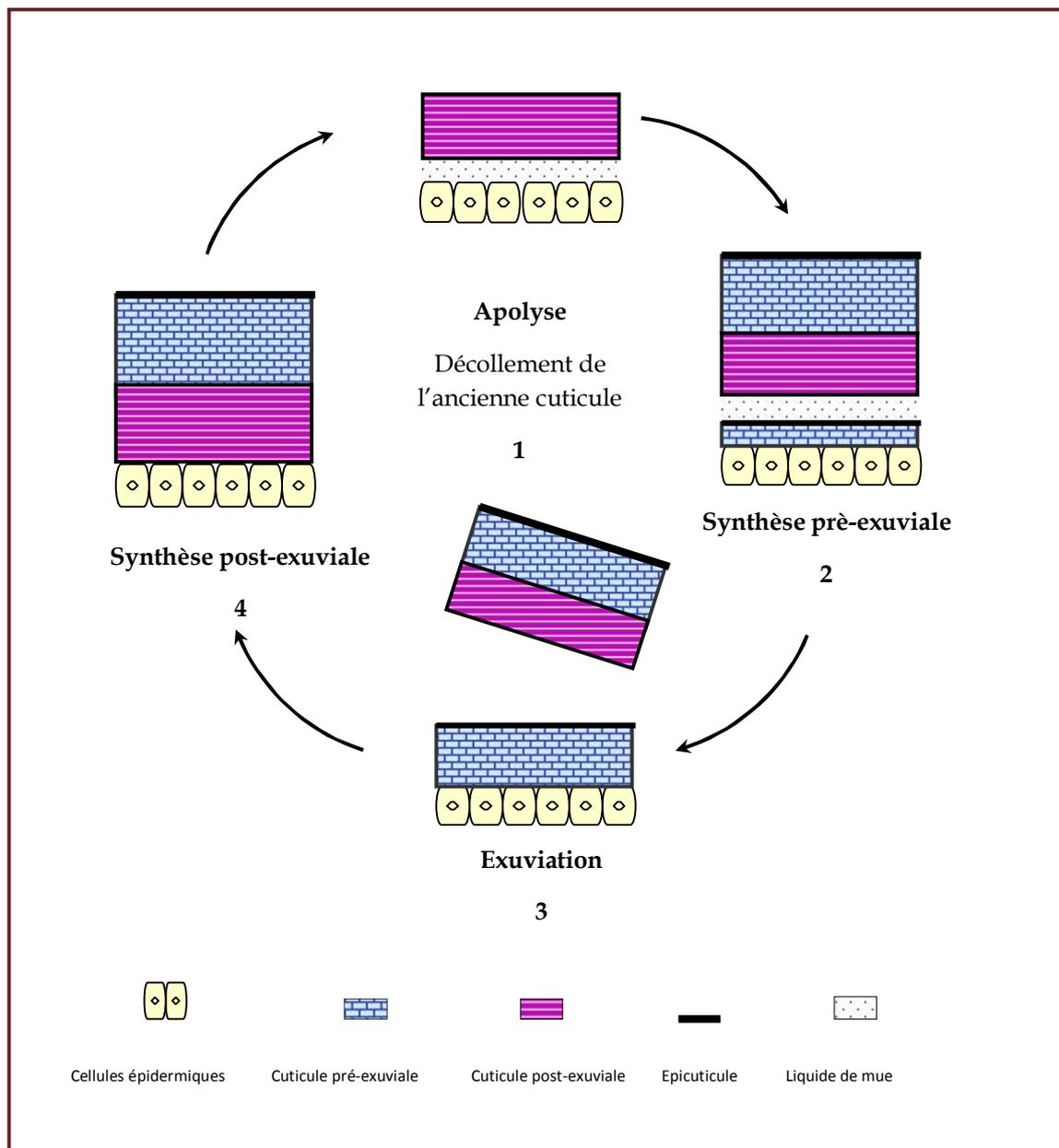


Figure 22. Représentation schématique des événements se produisant au niveau du tégument pendant le cycle de mue (d'après Hadley, 1986).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'application du méthoxyfénozide (0,01 µg, 0,37µg) a démontré l'énorme potentiel de ce régulateur de croissance, agoniste de l'hormone de mue sur différents paramètres de la reproduction et du développement chez *E. kuheniella*.

Les résultats sur l'aspect morphométriques, montrent que le RH-2485, affecte la taille de l'ovocyte basale qui se traduit par l'augmentation de la longueur, la largeur et la diminution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et ca à différentes âges au cours du stade nymphale. Il provoque des anomalies structurales au niveau des ovaires, notée par un rétrécissement de certain ovocytes, vacuolisation de l'épithélium folliculaire, réduction du nombre de cellules nourricières et par fois leur dégénérescence avec la dose la plus forte, ceci pourraient contribuer à la réduction de la fécondité des femelles et par conséquent à un meilleur contrôle de ce ravageur des denrées.

Le RH-2485, agit sur le profil électrophorétique des protéines ovariennes chez les adultes, marquée par la réduction du nombre de fractions protéiques avec les deux doses testées. Parallèlement, la quantité des protéines ovariennes aussi diminue chez les adultes traitées.

Le méthoxyfénozide réduit d'une manière significative le contenus en vitellines et vitellogénines dans les ovaires; ce-ci peut s'expliquer par l'effet agoniste de l'hormone de mue impliquée dans la synthèse des vitellogénines.

Les résultats concernant l'effet du RH-2485, sur la sécrétion cuticulaire après observation au microscope photonique, révèlent que cet agoniste de l'hormone de mue n'a pas perturbé les événements épidermo-cuticulaires; la cuticule poste exuviale nymphale est mis en place dès le premier jour de la vie nymphale et présente son maximum au troisième jour, il y a aussi la sécrétion de la cuticule adulte dès le quatrième jour de la vie nymphale qui présente son maximum à la veille de l'exuviation, seulement le traitement aux deux doses testées, a induit des augmentations significatives aux niveaux des épaisseurs de l'ancienne et de la nouvelle cuticule à différentes temps.

D'après nos résultats le méthoxyfénozide, interfère avec le développement, la reproduction et notamment le processus de la vitellogénèse chez *E. kuehniella*. A l'issu de cette étude, les résultats obtenus sont en accord avec des résultats antérieurs. Ils confirment

largement l'utilité de ces agonistes de l'hormone de mue dans le programme de lutte contre les insectes nuisibles notamment chez *E. kuheniella* et chez différents ordres d'insectes.

Des futures investigations sont nécessaires pour bien comprendre le mécanisme d'action des régulateurs de croissance sur la reproduction et le développement chez *E. kuheniella* :

- la structure ultra fines des gonades mâles et femelles, après traitement.
- Le développement nymphal en quantifiant les taux des ecdystéroïdes.
- Le potentiel reproducteur des femelles en traitant les mâles.
- Une analyse qualitative et quantitative des protéines testiculaires.