



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

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat, en Biologie Animale Environnementale. Option: Reproduction et Développement.

Effets d'un analogue de l'hormone juvénile (pyriproxyfène)

sur le développement d'un modèle biologique, Drosophila

melanogaster : toxicité, croissance, cuticule et chitine.

Présentée par : M. Fethi BENSEBAA

JURY :

Président: Mme. Wahida AYAD-LOUCIF	Professeur, Université d'Annaba
Directeur de thèse: Mme. Samira KILANI-MORAKCHI	Professeur, Université d'Annaba
Examinateur: Mme. Hinda BENTOUBAL-BERGHICHE	MCA, Université d'Annaba
Examinateur: Mme. Fouzia TINE-DJEBBAR	MCA, Université de Tébessa
Examinateur: Mme. Nejoud GRARA	MCA, Université de Guelma

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016 / 2017

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude à mes parents.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Noureddine SOLTANI, Directeur de Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (Université d'Annaba) pour avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire; je lui exprime, également, ma profonde reconnaissance pour son aide et ses encouragements durant toutes mes études.

Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adressent à mon directeur de thèse Mme **Samira KILANI-MORAKCHI** (Professeur, Université d'Annaba) pour l'excellent encadrement fourni, son soutien, sa disponibilité et sa patience. Grâce à ses conseils judicieux et son enthousiasme motivant, j'ai pu réaliser ce travail et j'espère avoir été à la hauteur de ses attentes. Merci d'avoir en toutes occasions pris le temps de m'écouter et de me comprendre. Pour tout cela mais aussi pour votre humanisme, votre bonté et votre gentillesse.

Je remercie infiniment Mme Wahida AYAD-LOUCIF (Professeur, Université d'Annaba) pour avoir accepté de présider ce jury, mes remerciements s'adressent aussi aux membres de mon jury, Mme Hinda BENTOUBAL-BERGHICHE (MCA, Université d'Annaba), Mme Fouzia TINE-DJEBBAR (MCA, Université de Tébessa) et Mme Nedjoud GRARA (MCA, Université de Guelma) qui ont accepté de juger mon travail.

Enfin, mes remerciements vont à tous ceux et celles qui ont contribué de loin ou de près à l'aboutissement de ce travail, particulièrement à Mme **Nadia ARIBI** (Professeur, Université d'Annaba) pour son aide, sa présence et ses encouragements durant la réalisation de cette thèse.

SOMMAIRE

Sommaire

1. INTR	ODUCTION	1
2. MATI	ERIEL ET METHODES	7
2.1.	La drosophile: organisme modèle	7
2.2.	Taxonomie	7
2.3.	Principales caractéristiques de Drosophila melanogaster	9
2.4.	Cycle de vie de <i>D. melanogaster</i> .	12
2.5.	Elevage au laboratoire	13
2.6.	Présentation de l'insecticide et traitement	14
2.	6.1. Présentation de l'insecticide	14
2.	6.2. Traitement des insectes	15
2.7.	Essais toxicologiques	15
2.8.	Suivi du développement de <i>D. melanogaster</i>	16
2.	8.1. Suivi de la croissance (poids et taille)	16
2.	8.2. Durée du développement du stade pupal	16
2.	8.3. Longévité des adultes	16
2.9.	Dosage enzymo-immunologique des ecdystéroïdes	17
2.10	. Quantification de la chitine	20
2.11	. Histologie de la cuticule	22
2.12	. Analyse statistique	23
3. RESU	LTATS	24
3.1.	Toxicité du pyriproxyfène à l'égard de <i>D. melanogaster</i>	24
3.2. mela	Effets du pyriproxyfène sur la croissance des pupes (poids/ taille) de mogaster	D. 27
3.	2.1. Effets du pyriproxyfène sur le poids des pupes	27
3.	2.2. Effets du pyriproxyfène sur la taille des pupes	38

3.3. Effets du pyriproxyfène sur la croissance des adultes (poids/ taille) de <i>D. melanogaster</i>
3.3.1. Effets du pyriproxyfène sur le poids des adultes
3.3.2. Effets du pyriproxyfène sur la taille des adultes
3.4. Effets du pyriproxyfène sur la durée de développement du stade pupal32
3.5. Effets du pyriproxyfène sur la longévité des adultes
3.6. Effets du pyriproxyfène sur le taux d'ecdystéroides chez les pupes de D.melanogaster
3.7. Effets du pyriproxyfène sur le contenu en chitine durant le stade pupal38
3.8. Effets du pyriproxyfène sur l'épaisseur de la cuticule durant le stade pupal 41
3.9. Effets du pyriproxyfène sur la structure de la nouvelle cuticul42
4. DISCUSSION
4.1. Effets du pyriproxyfène sur le taux d'inhibition de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i>
4.2. Effets du pyriproxyfène sur la croissance des pupes et des adultes (poids/taille)47
4.3. Effets du pyriproxyfène sur la durée de développement49
4.4. Effets du pyriproxyfène sur la longévité des adultes49
4.5. Effets du pyriproxyfène sur les taux d'ecdystéroïdes chez les pupes de <i>D. melanogaster</i>
4.6. Effets du pyriproxyfène sur les taux en chitine du stade pupal et sur l'histologie de la cuticule
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 56
RESUMES
Français58
Anglais
Arabe
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE (production scientifique)

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau 1: Effets du pyriproxyfène, administré par application topique à différentes doses (ng) chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium). Inhibition corrigée (%) de la mue adulte. (m \pm SEM, n = 3 répétitions de 15 individus chacune).

Tableau 2: Effets du pyriproxyfène, administré par application topique à 25 différentes doses (ng) chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le pourcentage d'inhibition corrigé de la mue adulte. (m \pm SEM, n = 3 répétitions de 15 individus chacune): Analyse de la variance à un critère de classification.

Tableau 3: Toxicité du pyriproxyfène (ng/larve), administré par application26topique aux larves L3 de D. melanogaster 12h avant la formation du
puparium: Détermination des doses d'inhibition de l'émergence adulte et
leurs intervalles de confiance (95%).

Tableau 4: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application 27 topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le poids des pupes (mg). (m ± SEM, n = 26-32): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Tableau 5: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application28topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du28puparium), sur le poids des pupes (mg). (m ± SEM, n = 26-32): Comparaison des28moyennes à différents âges pour une même série (lettres majuscules) et pour un même âge28entre les différentes séries (lettres minuscules).28

Tableau 6: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application 29 topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la taille des pupes (mm). (m ± SEM, n = 26-31): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Tableau 7: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application 29 topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la taille des pupes (mm). (m ± SEM, n = 26-31): Comparaison des moyennes à différents âges pour une même série (lettres majuscules) et pour un même âge entre les différentes séries (lettres minuscules).

Tableau 8: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application30topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du30puparium), sur le poids des adultes (mg). (m ± SEM, n = 26-30): Analyse de30la variance à deux critères de classification.30

Tableau 9: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application 31 topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le poids des adultes (mg). (m ± SEM, n = 26-30): Comparaison des moyennes à différents traitements pour un même sexe (lettres minuscules) et pour un même traitement entre les deux sexes (lettres majuscules).

Tableau 10: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application32topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du
puparium), sur la taille des adultes (mm). (m ± SEM, n = 26-30): Analyse de
la variance à deux critères de classification.32

Tableau 11: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application32topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du32puparium), sur la taille des adultes (mm). (m ± SEM, n = 26-30): Comparaison32des moyennes à différents traitements pour un même sexe (lettres minuscules) et pour un32même traitement entre les deux sexes (lettres majuscules).

Tableau 12: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application33topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du39puparium), sur la durée de développement du stade pupal (h). (m ± SEM, n = 7-8): Analyse de la variance à un critère de classification.33

Tableau 13: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application34topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du34puparium), sur la longévité des adultes (jours). (m ± SEM, n = 26-30):34Analyse de la variance à deux critères de classification.34

Tableau 14: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application37topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du37puparium), sur le taux d'ecdystéroïdes pupal (pg 20E/mg). (m ± SEM, n = 3-5): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Tableau 15: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application 39 topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la quantité en chitine du stade pupal (µg glucosamine/ mg pupe). (m ± SEM, n = 8-12): Analyse de la variance à deux critères de classification.

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1. Position systématique de Drosophila melanogaster.	8
Figure 2. Arbre phylogénique de <i>Drosophila melanogaster</i> d'après O'Grady & Markow. (2009).	9
Figure 3. Anatomie de <i>Drosophila melanogaster</i> : T1-T3: Segments thoraciques, A1-A8: Segments abdominaux (Source: <u>http://www.biopsychology.com</u>).	10
Figure 4. Principales caractéristiques de <i>Drosophila melanogaster</i> (A \bigcirc : Femelle, B \bigcirc : Mâle, C: plaque vaginale, D: pénis, E: patte antérieure de drosophile femelle, F: patte antérieure de drosophile mâle avec les peignes sexuels). (Source : http/www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/dros-elv.htm).	11
Figure 5. Cycle de vie de <i>D. melanogaster</i> (Weigmann <i>et al.,</i> 2003).	13
Figure 6. Elevage au laboratoire de D. melanogaster (photo personnelle).	14
Figure 7. Structure chimique du pyriproxyfène (Sullivan, 2000).	15
Figure 8. Procédure expérimentale pour l'évaluation de la longévité de <i>D. melanogaster</i> selon Linford <i>et al.</i> (2013).	17
Figure 9. Principe du dosage EIA d'après Porcheron et al. (1989).	29
Figure 10. Quantification de la chitine (Fortwendel <i>et al.</i> , 2008; Farnesi <i>et al.</i> , 2012).	21
Figure 11 . Inhibition corrigée (%) de l'émergence adulte après application topique du pyriproxyfène (ng/insecte) chez les larves (L3) de <i>D. melanogaster</i> 12h avant la formation du puparium. (m \pm SEM; n = 3 répétions de 15 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.	25
Figure 12. Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée de l'émergence adulte en fonction du logarithme de la dose du pyriproxyfène, administré par application topique aux larves L 3 de <i>D. melanogaster</i> 12h avant la formation du puparium. $\mathbf{R}^2 = 0, 99$. $\mathbf{Y} = \mathbf{100/1+10}^{(\log EC50 - X)*Hill Slope}$	26
Figure 13. Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de <i>D. melanogaster</i> (12 h avant la formation du puparium) sur la durée de développement du stade pupal (h) (m + SEM:	33

puparium), sur la durée de développement du stade pupal (h). (m \pm SEM; n=7-8): Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de p < 0,05.

Figure 14. Effets du pyriproxyfène (DI₂₅ et DI₅₀), administré par application 35 topique chez les larves L3 de D. melanogaster (12 h avant la formation du puparium), sur la longévité des adultes (jours). (m \pm SEM; n = 49-54): Comparaison des moyennes à différents traitements pour un même sexe (lettres majuscules) et pour un même traitement entre les deux sexes (lettres minuscules), F: Femelle, M: Mâle.

Figure 15. Dosage EIA des ecdystéroïdes: courbe dose-réponse établie avec 36 un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant le rapport B/B_0 en fonction des quantités en pg 20E/puits.

Figure 16. Effets du pyriproxyfène (DI₂₅ et DI₅₀), administré par application 37 topique chez les larves L3 de D. melanogaster (12h avant la formation du puparium), sur le taux d'ecdystéroïdes pupal (pg 20E/mg). (m \pm SEM; n = 3-5): Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de (p < 0.05).

Figure 17. Courbe étalon exprimant les densités optiques en fonction des 38 quantités de glucosamine (μ g).

Figure 18. Effets du pyriproxyfène (DI₂₅ et DI₅₀), administré par application 40 topique chez les larves L3 de D. melanogaster (12h avant la formation du puparium), sur la quantité en chitine du stade pupal (µg glucosamine/mg pupe). (m \pm SEM; n = 8-12): Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de (p < 0.05).

Figure 19. Taux d'ecdystéroïdes et le contenu en chitine au cours de 40 développement pupal chez D. melanogaster.

Figure 20. Effets du pyriproxyfène (DI₅₀), administré par application 41 topique chez les larves L3 de D. melanogaster (12h avant la formation du puparium), sur l'épaisseur de la cuticule (um), (m \pm SEM; n = 8-12); Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de (p < 0,05).

Figure 21. Effets du pyriproxyfène (DI₅₀), administré par application 42 topique chez les larves L3 de D. melanogaster (12h avant la formation du puparium), sur la structure de la nouvelle cuticule ; A : la nouvelle cuticule avec des soies (témoin); B: la nouvelle cuticule sans les soies (traitée); Ct - Cuticule, Ep -Epiderme, **S** – Soies.

45 Figure 22. Taux d'hormone juvénile (JH) et de 20-hydroxyecdysone (20E) au cours du développement de D. melanogaster (Dubrovsky, 2005). La 20E initie toutes les transitions de développement, tels que de la larve à la larve, de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte tandis que l'HJ détermine le type de transition et la nature de mue; Pp: prépupes.

Figure 23. Différents facteurs intervenant dans la régulation de la croissance 48 chez D. melanogaster (Mirth & Shingleton, 2012). E: ecdysone: CNS: système nerveux central; PG: glande prothoracique; FDS: signal dérivé du corps gras; dILPs: insulin-like peptides.

Figure 24. Les différentes phases du processus de mue au niveau de la 53 cuticule (Jurenka, 2007).

[INTRODUCTION]

1. INTRODUCTION

Les étapes du cycle de vie des insectes sont, à la différence de l'Homme, extrêmement complexes. Si l'Homme croît en conservant la physionomie et la physiologie de ces parents (Panchout, 2007), la croissance des insectes, en raison de la présence d'un exosquelette rigide, est ponctuée d'une série de mues séparant les différents stades larvaires (Lafont *et al.*, 2005). Chez les insectes holométaboles, la fin de la période larvaire coïncide avec un changement morphologique drastique aboutissant au stade pupal: c'est la métamorphose (Truman & Riddiford, 1999; Dubrovsky, 2005). Les hormones d'insectes, particulièrement les ecdystéroïdes et les hormones juvéniles (HJ), ont fait l'objet de nombreuses études, et leur rôle central dans la régulation des processus de développement est à présent bien établi (Gäde *et al.*, 1997; Dhadialla *et al.*, 1998, 2005).

Les ecdystéroïdes sont les hormones de mue des arthropodes (Chang et al., 1993). L'ecdysone, premier ecdystéroïde isolé, est un stéroïde issu du métabolisme du cholestérol (Dinan, 2001). Sa biosynthèse et sa sécrétion sont assurées par les glandes prothoraciques au cours des stades post-embryonnaires sous le control d'une neurohormone prothoracicotrope (PTTH) (Gäde & Hoffmann, 2005). Si la PTTH reste le signal majeur de l'ecdystériogenèse, l'implication direct d'autres facteurs tels que l'insuline et l'oxyde nitrique a été rapportée (McBrayer et al., 2007; Cranna & Quinn, 2009; Yamanaka et al., 2013). La synthèse de l'ecdysone (E), qui est une pro-hormone, est effectuée via l'action de plusieurs cytochromes P450 codées par une famille de gènes nommée Halloween (Petryk et al., 2003; Ono et al., 2006; Yoshiyama et al., 2006; Iga & Smagghe, 2010). L'ecdysone (E) libérée dans l'hémolymphe est rapidement convertie en une hormone active, la 20-hydroxyecdysone (20E), grâce à une ecdysone 20-monooxygénase et ce dans les différents organes périphériques notamment le corps gras, les tubes de Malpighi et l'intestin moyen (Toivonen & Partridge, 2009; Marchal et al., 2010; Yamanaka et al., 2013). Les ecdystéroïdes sont impliqués dans le contrôle de plusieurs processus vitaux chez les insectes tels que l'embryogenèse mais aussi le développement post-embryonnaire et ce en initiant les différentes mues et en induisant la production de la nouvelle cuticule (Koslova & Thummel, 2003; Cranna & Quinn, 2009; Yamanaka et al., 2013, Ou et al., 2016). En effet, la 20E également appelée hormone de mue se fixe sur des récepteurs nucléaires spécifiques (EcR) et initie l'expression de différents gènes impliqués dans les changements physiologiques, morphologiques et comportementaux associés à la mue et la métamorphose (Koslova &

Thummel, 2003; Cranna & Quinn, 2009; Yamanaka *et al.*, 2013). De plus, les ecdystéroïdes jouent également un rôle très important dans la régulation des activités reproductives chez les insectes (Baltaev & Shangaraeva, 2000; Toivonen & Partridge, 2009).

Si les ecdystéroïdes sont considérés comme l'hormone de mue des arthropodes en contrôlant les événements épidermo-cuticulaire, l'hormone juvénile joue un rôle primordial dans la coordination du développement en initiant la nature des mues (Hiruma & Kaneko, 2013; Nijhout *et al.*, 2014; Smykal *et al.*, 2014). En effet, l'hormone juvénile (HJ), un dérivé terpénoïde est l'un des grands orchestrateurs du développement de l'insecte (Riddiford, 1996; Dhadialla *et al.*, 1998, 2005). Les corps allates (glande située en arrière du cerveau) sont à l'origine de la biosynthèse de l'HJ dont la sécrétion est régulée par des neuropeptides (activateurs et inhibiteurs) secrétés par le cerveau: les allatotropines qui stimulent la sécrétion de l'HJ et les allatostatines qui l'inhibent (Miyamoto *et al.*, 1993; Hoffmann *et al.*, 1999; Gäde, 2002; Bellés & Maestro, 2005; Toivonen & Partridge, 2009). Après sa libération dans l'hémolymphe, l'HJ est transportée vers les tissus cibles grâce à des protéines vectrices spécifiques appelées JH-binding proteins, qui jouent aussi un rôle protecteur contre l'action des hydrolases (Cassier *et al.*, 1997). Des taux élevés d'HJ chez les insectes immatures (larves) assurent le maintien des caractères juvéniles et préviennent le déclenchement de la métamorphose (Dubrovsky, 2005; Edgar, 2006; Cheng *et al.*, 2014).

En effet, les taux d'HJ restent élevés tout au long du développement larvaire et chutent au dernier stade larvaire pour permettre aux ecdystéroïdes d'induire la métamorphose (Truman & Riddiford, 1999; Nijhout *et al.*, 2014). Cette dernière, permet le passage de l'insecte du stade larvaire au stade adulte grâce à une succession d'histolyse et d'histogénèse (Dubrovsky, 2005). Les ecdystéroïdes initient donc la métamorphose en début du stade pupal puis chutent à la fin de ce même stade pour permettre l'action de l'hormone d'éclosion, neuropeptide responsable de l'exuviation, du tannage et du durcissement de la nouvelle exocuticule (Dhadialla *et al.*, 2005).

Les taux d'HJ vont de nouveau augmenter à l'âge adulte, où elle commande la plupart des mécanismes physiologiques liés à la reproduction comme la gamétogenèse, la vitellogenèse ou encore le comportement sexuel (Schal & Ching, 1995; Waytt & Davey, 1996; Koslova & Thummel, 2000; Wang *et al.*, 2004; Raikhel *et al.*, 2005; Swevers *et al.*, 2005; Ganter *et al.*, 2007; Tufail *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016).

INTRODUCTION

Les processus physiologiques et biochimiques liés à la mue et la métamorphose des insectes restent à l'heure actuelle moins détaillés dans la littérature en comparaison avec d'autres aspects physiologiques de l'insecte telle que la reproduction (De Loof *et al.*, 2015). En effet, si les mécanismes d'action de la 20E ont été largement décrits, les connaissances acquises sur le mode d'action de l'HJ et son implication dans le contrôle du développement des insectes restent à nos jours insuffisantes (Dhadialla *et al.*, 2010). En effet, les récepteurs moléculaires, les voies de signalisation et les interactions possibles avec les différentes hormones et neurohormones contrôlant la croissance et le développement sont très peu documentés (Dubrovsky, 2005). Actuellement, les nouvelles recherches dans ce domaine, sont fortement liées à l'utilisation de *Drosophila melanogaster* comme système modèle (Riddiford *et al.*, 2010; Mirth *et al.*, 2012; Quinn *et al.*, 2012; Rewitz *et al.*, 2013; Yamanaka *et al.*, 2013).

La 20E et l'HJ agissent donc en synergie et les différentes fluctuations des taux de chacune de ces deux hormones sont étroitement associées à des évènements importants au cours du développement et vont définir par conséquent la transition de chaque stade de développement (Harshman *et al.*, 1999; Truman & Riddiford, 1999, 2002; Dubrovsky, 2005). Toute la finesse du système tient donc dans l'équilibre entre ces deux hormones (Dubrovsky, 2005). Il est donc admis que toute interférence avec une source exogène d'hormone ou encore par des agonistes ou antagonistes de synthèse perturbe l'homéostasie de ces deux hormones et peut ainsi représenter une cible potentielle spécifique dans le contrôle sélectif des insectes nuisibles (Dhadialla *et al.*, 2005, 2010; Cheng *et al.*, 2014).

Dans ce sens, les différentes connaissances acquises en endocrinologie et en physiologie des insectes ont permis a l'industrie phytosanitaire de développer des nouvelles molécules insecticides plus spécifique et à moindre impact environnemental (Gäde *et al.*, 1997). Ces molécules de troisième génération sont les régulateurs de croissance des insectes (Insect Growth Rugulator: IGRs). Récemment, rebaptisés IGDs (Insect Growth Disruptors) pour perturbateurs de croissance des insectes, ils-agissent de manière sélective et interfèrent notamment sur les mues, la métamorphose, la reproduction et leur conditionnement endocrinologique (Dhadialla *et al.*, 2005, 2010; Pener & Dhadialla, 2012).

Les IGDs sont répartis en 3 groupes: les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, composé majeur de la cuticule, les agonistes et antagonistes des ecdystéroïdes et enfin les

agonistes et antagonistes de l'hormone juvénile (HJ) (Dhadialla et al., 2005; Pener & Dhadialla, 2012).

Les dérivés de la benzoylphenylurée (BPUs) sont des inhibiteurs de la synthèse de la chitine, essentiellement représentés par le diflubenzuron (DFB). Ces composés ont pour effet l'inhibition de la synthèse de la chitine (Ishaaya, 1990; Soltani *et al.*, 1993, 1996), perturbant ainsi le dépôt de la nouvelle cuticule et, conduisant à la mise en place d'une cuticule anormale et à la mort de l'insecte pendant ou après la prochaine mue (Pener & Dhadialla, 2012). Ils agissent également sur la sécrétion cuticulaire en réduisant l'épaisseur de la cuticule (Ishaaya, 1990; Soltani *et al.*, 1993, 1996) et perturbent les événements de la reproduction (Soltani *et al.*, 1996). Les analogues du diflubenzuron comme, le chlorfluazuron, le flucycloxuron (FCX) et l'héxaflumuron (Sheets *et al.*, 2000) ou encore le lufenuron, le teflubenzuron et le triflumuron (TFM) (Sheets *et al.*, 2000; Tomlin, 2000; Karr *et al.*, 2004) sont très efficaces à l'égard des différents insectes nuisibles mais avec une activité plus importante contre les lépidoptères (Tomlin, 2000; Ishaaya, 2001). Le novaluron, un autre inhibiteur de la synthèse de la chitine, affecte la mue par le dépôt d'une endocuticule anormale; il inhibe l'émergence adulte, affecte le contenu en chitine et la durée du développement larvaire (Farnesi *et al.*, 2012).

En ce qui concerne les agonistes de l'ecdysone (ex. RH-5849, tébufénozide et méthoxyfénozide), ils sont connus pour leur capacité à induire une mue prématurée (Wing *et al.*, 1988). De ce fait, ils sont considérés comme des accélérateurs de mue ou MACs (Molting Accelerating Compounds) qui se fixent aux récepteurs (EcR) spécifiques des ecdystéroïdes (Dhadialla *et al.*, 1998, 2005). Les agonistes des ecdystéroïdes affectent également la reproduction et les taux d'ecdystéroïdes chez plusieurs espèces d'insectes (Berghiche *et al.*, 2008; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009, 2014). Les antagonistes, le KK-22 et le KK-42 sont des dérivés de l'imidazole (Kadano-Okuda *et al.*, 1987), qui inhibent le processus de biosynthèse des ecdystéroïdes (Lorenz *et al.*, 1995; Berghiche *et al.*, 2003). Ces composés inhibent aussi la synthèse de l'HJ et sont considérés également comme des anti-HJs (Tunaz & Uygun, 2004). De plus, il a été rapporté que le KK-42 peut affecter le développement des ovaires en agissant au niveau de l'épithélium folliculaire, site de synthèse d'ADN et source d'ecdystéroïdes ovariens (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001).

Enfin, les analogues de l'hormone juvénile tels que le pyriproxyfène, le méthoprène, le kinoprène et le fénoxycarbe agissent sur le développement et la croissance des insectes en

INTRODUCTION

interférant avec les mues et la métamorphose (Dhadialla *et al.*, 2005; Minakuchi & Riddiford, 2006; Palli, 2009; Ogihara *et al.*, 2015), ces composés perturbent la sécrétion cuticulaire, induisent des mues larvaires surnuméraires et peuvent aussi prolonger la durée de développement (Kiguchi *et al.*, 1984; Gadenne *et al.*, 1990; Quennedey *et al.*, 1995; Hoffmann & Lorenz, 1998; Elbert & Nauem, 2000; Aribi *et al.*, 2000; Gorman *et al.*, 2002; Bouhsira *et al.*, 2012). Ces produits peuvent agir également sur le stade adulte en perturbant la reproduction de l'insecte (Maiza *et al.*, 2004; Aribi *et al.*, 2000, 2006; Kavallieratos *et al.*, 2012). Quant aux antagonistes de l'HJ (précocène I et II) ils exercent une action cytotoxique sur les corps allates (glandes endocrine secrétant l'hormone juvénile) (Brooks & McCaffery, 1990), entraînant des métamorphoses prématurées (Masner *et al.*, 1979; Darvas *et al.*, 1990; Aribi *et al.*, 1999) mais aussi la stérilisation des adultes de plusieurs ordres d'insectes (Bitsch *et al.*, 1986).

En plus de leur utilisation dans la gestion rationnelle des insectes nuisibles, les JHAs (Juvenile Hormone Analog) représentent un excellent outil pour l'étude des mécanismes endocrinologiques régulant le développement des insectes (Ramaseshadri *et al.*, 2012).

Le pyriproxyfène est un analogue de l'hormone juvénile classé comme produit à risque réduit à cause de sa faible toxicité pour les mammifères (Miyamoto et al., 1993; Tomlin, 2000). Le pyriproxyfène est considéré comme un régulateur de croissance à large spectre avec une excellente activité insecticide vis-à-vis d'un grand nombre d'insectes à intérêt agronomique et médical (Who, 2008). Il est en effet, utilisé avec succès dans le contrôle de plusieurs ravageurs des cultures à travers le monde (Sazo et al., 2008; Moadeli et al., 2014). Aujourd'hui le pyriproxyfène est probablement le JHA le plus efficace disponible sur le marché (Hatakoshi, 2012). Il agit en provoquant un déséquilibre profond du système hormonal de l'insecte qui se traduit par une inhibition de l'embryogenèse, du développement et de la métamorphose (Estrada & Mulla, 1986; Kawada et al., 1989; Koehler & Peterson, 1991; Ishaaya & Horowitz, 1992; Ishaaya et al., 1994; Aribi et al., 2006; Chen et al., 2016; Truong et al., 2016). De plus, le pyriproxyfène affecte la reproduction des insectes en réduisant la fécondité des femelles et la viabilité des œufs (Boina et al., 2009; Ghasemi et al., 2010; Ohba et al., 2013; Singh & Kumar, 2015). Le pyriproxyfène peut également affecter certains processus physiologique et biochimique en influençant l'activité enzymatique des chitinases au cours de la mue des insectes (Nasr et al., 2010).

INTRODUCTION

Si l'impact du pyriproxyfène en tant qu'insecticide sur les processus de développement des insectes a été largement documenté (Pener & Dhadialla, 2012), son utilisation comme alternative à l'hormone juvénile a ouvert une nouvelle voie de recherche permettant de mieux comprendre les mécanismes endocrinologiques intervenant dans la régulation du développement chez les insectes (Riddiford *et al.*, 2010). Dans cette optique, cette thèse s'intéresse à l'influence de l'HJ sur la 20E et l'interaction possible entre ces deux hormones au cours du développement, en utilisant le pyriproxyfène comme source d'HJ et *D. melanogaster* comme modèle biologique de référence. Les objectifs de cette étude sont les suivants:

- Evaluer la toxicité du pyriproxyfène par application topique sur les larves de dernier stade (L3). Les tests toxicologiques permettront de déterminer les doses d'inhibition de la mue adulte (DI₂₅ et DI₅₀) et leurs intervalles de confiance.
- Evaluer les effets de l'analogue de l'HJ (DI₂₅ et DI₅₀) sur plusieurs paramètres de développement (croissance des pupes et des adultes, durée de développement du stade pupal, longévité des adultes).
- Déterminer les effets du pyriproxyfène sur le profil hormonal en écdystéroïdes chez les pupes grâce à un dosage enzymo-immunologique.
- 4) Examiner les effets du pyriproxyfène sur le taux de chitine durant le stade pupal.
- 5) Réaliser une étude histologique de la cuticule afin de déterminer les effets de l'analogue de l'HJ sur son épaisseur et sa structure.

MATERIEL ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. La drosophile: organisme modèle

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830) plus connue sous le nom de «mouche du vinaigre» est l'un des organismes les plus étudiés en laboratoire par les biologistes. C'est un organisme modèle de premier choix dans de nombreux axes de recherche. A l'origine, cet organisme était principalement étudié en génétique pour comprendre les règles de l'hérédité des caractères. Après Thomas Hunt Morgan en 1933 pour ces travaux sur le rôle des chromosomes dans l'hérédité, ce sont trois drosophilistes (E.B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard et E. Wieschaus) qui furent récompensés en 1995 du prix Nobel de Médecine pour le contrôle génétique du développement embryonnaire précoce chez la drosophile. Récemment, un autre prix Nobel a été décerné à J.A. Hoffman pour ses recherches en immunologie. Aujourd'hui, la drosophile est essentiellement utilisée en biologie du développement (Gilbert et al., 2013), pour comprendre comment un organisme complexe se forme à partir d'un œuf fertilisé mais également en neurogénétique de l'apprentissage (Dukas, 2008). En plus de l'importance de la drosophile dans les différents domaines de la biologie, elle représente un cobaye exceptionnel en raison de son élevage facile en laboratoire et de sa petite taille qui permet le stockage de centaines de lignées différentes dans les étuves. Les femelles peuvent pondre jusqu'à 500 œufs en 10 jours, ce qui permet d'avoir largement d'individus et donc de matériel pour pouvoir travailler. La présence de chromosomes polythènes géants permet également des analyses aisées.

2.2. Taxonomie

Les drosophiles appartiennent à l'ordre de Diptera (une seule paire d'ailes), caractérisé par la présence d'haltères (balanciers) sur le troisième segment thoracique indispensables à la stabilisation du vol (Dudley, 2002), et à la famille de Drosophilidae (**Fig. 1**). Cette dernière regroupe environ 60 genres et 3000 espèces dont 2000 espèces décrites (Markow & O'Grady, 2005; O'Grady & Markow, 2009). La majorité des espèces appartiennent au deux sous-genre: *Drosophila* (1450 espèces) et *Sophophora* (350 espèces) (**Fig. 2**).

MATERIEL ET METHODES

Récemment des études ont démontré que *D. melanogaster* été plus proche phylogénétiquement du genre *Sophophora* que de celui de *Drosophila* conduisant à la proposition d'une réorganisation majeure du genre *Drosophila* (Dalton, 2010). Cette proposition a néanmoins été rejetée par la commission internationale de nomenclature zoologique, suite à un long débat et un mécontentement de beaucoup de drosophilistes qui considèrent *D. melangaster* comme un «label» étant l'espèce la plus célèbre après l'*Homo sapiens* (Dalton, 2010).

Règne	Animalia
Phylum	Arthropoda
Superclasse	Hexapoda
Classe	Insecta
Sous-classe	Neoptera
Infra-classe	Endopterygota (holométabole)
Ordre	Diptera
Sous-ordre	Brachycera
Infra-ordre	Muscomorpha
Super famille	Ephydroidea
Famille	Drosophilidae
Genre	Drosophila
Meigen, 1830 Espèce	Drosophila melanogaster

Figure 1. Position systématique de Drosophila melanogaster.



Figure 2. Arbre phylogénique de *Drosophila melanogaster* d'après O'Grady & Markow. (2009).

2.3. Principales caractéristiques de Drosophila melanogaster

Comme tous les insectes, le corps de la drosophile ce compose de trois parties distinctes: la tête (région céphalique), la région thoracique et la région abdominale. Les trois paires de pattes sont localisées sur la partie ventrale des différents segments thoraciques. La drosophile n'a qu'une seule paire d'ailes fonctionnelles (les ailes antérieures) localisée sur la partie dorsale du second segment thoracique (notum); les ailes postérieures sont atrophiées sous la forme d'un balancier minuscule (**Fig. 3**). Ces mouches sont de couleur brun jaunâtre, avec des anneaux transversaux noirs au travers de l'abdomen. Elles ont des yeux rouges vif et des antennes courtes possédant une extrémité plumeuse (**Fig. 3**).

MATERIEL ET METHODES



Figure 3. Anatomie de *Drosophila melanogaster*: T1-T3: Segments thoraciques, A1-A8: Segments abdominaux (Source: <u>http://www.biopsychology.com</u>).

Les drosophiles présentent un dimorphisme sexuel (Parvathi *et al.*, 2009): les femelles mesurent environ 3 à 4 millimètres de long; les mâles sont un peu plus petits. L'abdomen de la femelle est de forme pointue, avec des segments terminaux de couleur claire. L'abdomen du mâle est plus arrondi, avec des segments terminaux très foncés (**Fig. 4: A, B**). Lorsque la mouche est sur le dos, on peut observer chez le mâle le pénis très coloré situé à l'extrémité de l'abdomen alors que la plaque vaginale située au même endroit chez la femelle n'est pas colorée (**Fig. 4: C, D**). Les mâles possèdent des peignes sexuels représentés par une petite touffe de soies noires située au niveau du premier article du tarse de la patte antérieure (**Fig. 4: E, F**).

MATERIEL ET METHODES



Figure 4. Principales caractéristiques de Drosophila melanogaster (A \bigcirc : Femelle, B \bigcirc : Mâle,C: plaque vaginale, D: pénis, E: patte antérieure de drosophile femelle, F: patte antérieure dedrosophilemâleaveclespeignessexuels).(Source :http/www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/dros-elv.htm).

2.4. Cycle de vie de *D. melanogaster*

La drosophile est un insecte à développement holométabole, caractérisé par trois phénotypes post-embryonnaires: les larves, les pupes et les adultes (Gilbert & Epel, 2009). La femelle pond directement ses œufs sur un milieu qui servira de substrat alimentaire aux larves qui en sortiront. La femelle peut pondre plusieurs centaines d'œufs au cours de sa vie et suivant la qualité du substrat alimentaire et surtout de la température ambiante, la durée du développement sera plus ou moins importante: environ 10 jours à 25°C et près de 50 jours à 12°C (Ashburner & Thompson, 1978; Ashburner & Bergman, 2005). Environ 24 h après la ponte, l'éclosion de l'œuf donne naissance à des larves du 1^{er} stade initialement transparentes qui deviennent blanches lors de la première journée après l'éclosion. L'animal croît en passant par deux autres stades larvaires séparés par des mues qui s'opèrent respectivement 48 et 72 h après la ponte de l'œuf. Chaque stade suivant est caractérisé par l'augmentation de la taille des larves. Cette augmentation de la taille des larves au cours du développement à travers les trois stades, est principalement due à une augmentation significative de la taille des cellules plutôt que de leur nombre. Les cellules des larves deviennent polyploïdes par la réplication répétée de l'ADN sans division (Panagopoulos, 2012).

Les trois stades larvaires durent environ 4 jours (à 25° C). Pendant les deux premiers stades qui ont chacun une durée d'un jour, les larves se trouvent dans le milieu nutritif, à la fin du troisième stade (fin du 4^e jour), les larves cessent de s'alimenter, sortent du milieu nutritif et entament une phase d'errance. A son terme, les larves déploient leurs spiracles antérieurs, secrètent une glu et se fixent sur un support (Dubrovsky, 2005; Panagopoulos, 2012). L'éversion des spiracles, 120 h après la ponte, définit le début de la période prépupale qui durera 12 h. La dernière cuticule larvaire (L3) se tanne rapidement et devient le puparium, dans lequel la métamorphose va se dérouler. Les cellules imaginales et larvaires commencent à synthétiser une nouvelle cuticule et les disques imaginaux entament une phase de prolifération rapide. L'épiderme se décolle du puparium. L'achèvement de cette apolyse larvo-pupale, ainsi que l'éversion de la tête du futur insecte adulte marque la fin de la période prépupale (Dubrovsky, 2005). La métamorphose se poursuit pendant les 3 jours et demi que dure la période pupale (**Fig. 5**). Durant les dernières heures avant l'émergence, les pupes deviennent plus foncées et la couleur rouge des yeux de l'insecte adulte nouvellement éclos va

doucement déplier ses ailes et les laisser durcir à l'air quelques minutes avant de pouvoir les utiliser (Bainbridge & Bownes, 1981; Quinn *et al.*, 2012).



Figure 5. Cycle de vie de D. melanogaster (Weigmann et al., 2003).

2.5. Elevage au laboratoire

L'élevage des drosophiles (souche canton S: souche de référence gracieusement fournie par C. Wickers Thomas, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, Université de Paris Sud) en laboratoire est réalisé à une température de 25°C, une hygrométrie de 70% et une scotophase de 12 h. Les mouches sont élevées dans des flacons en plastique bouchés par un tampon de mousse contenant un milieu nutritif artificiel (**Fig. 6**) composé essentiellement de: farine de maïs (33,3 g), de levure de bière (33,3 g), d'agar-agar (4,8 g) et d'antifongique (20 ml méthyl-hydroxy-4-benzoate à 10% dans de l'éthanol à 95%). Les mouches sont transférées tous les 3-4 jours dans de nouveaux tubes afin d'éviter les problèmes de compétition larvaire et fournir une progéniture suffisante.



Figure 6. Elevage au laboratoire de D. melanogaster (photo personnelle).

2.6. Présentation de l'insecticide et traitement

2.6.1. Présentation de l'insecticide

Le pyriproxyfène ($\geq 95\%$, Sumitomo Chemical Co. Ltd., Osaka, Japan) est un analogue de l'hormone juvénile dérivée de la pyridine. Son nom chimique est le 2-{1-methyl-2-(4-phenoxy-phenoxy) ethyl} pyridine et sa formule brute est C₂₀H₁₉NO₃ (**Fig. 7**). Le pyriproxyfène possède un poids moléculaire de 321,37 g/mol et une solubilité dans l'eau de 0,367 ppm (Sullivan, 2000). Cette molécule a été gracieusement fournie par le Pr G. Smagghe (Laboratoire d'Agrozoologie, Université de Ghent, Belgique).



Figure 7. Structure chimique du pyriproxyfène (Sullivan, 2000).

2.6.2. Traitement des insectes

L'insecticide a été dissous dans l'acétone et administré par application topique $(1\mu)/\text{insecte})$, à l'aide d'une micro-seringue (Hamilton), sur les larves du troisième stade à un moment où les taux d'HJ sont relativement faibles (12h avant la formation du puparium de *D. melanogaster*). Afin de standardiser l'élevage et d'obtenir des L3 de même âge, des adultes mâles et femelles, âgés de 4 à 5 jours, sont prélevés dans l'élevage de masse puis mis à pondre dans un tube contenant du milieu frais pendant 4 heures. Les adultes sont alors retirés et les tubes sont maintenus dans les conditions standards (citées plus haut). Après 5 jours les larves obtenues seront alors à la fin du dernier stade larvaire (L3) (Fougeron, 2011).

2.7. Essais toxicologiques

Après un screening préalable, le pyriproxyfène a été testé à différentes doses (0,01, 0,1, 0,5, 1 et 2 ng) sur les larves de dernier stade (L3: 12h avant la formation du puparium). Les tests de toxicité ont été réalisés dans des boites de Pétri en verre comportant chacune 15 individus; trois répétitions ont été réalisées pour chaque dose. Une série témoin est conduite en parallèle et les individus reçoivent uniquement le solvant (1µl d'acétone). Les larves des séries témoins et traitées sont maintenues dans les conditions standard citées plus haut. Les pourcentages d'inhibition de l'émergence adulte ont été calculés pour les différentes séries à partir de la mortalité des pupes, des mues imaginales incomplètes et des adultes malformés. Les pourcentages d'inhibition observée sont corrigés selon Abbott (1925) puis font l'objet d'une transformation angulaire selon Bliss *in* Fisher & Yates (1957). Les données ainsi normalisées subissent une analyse de la variance à un critère de classification suivi d'un

classement des doses par le test HSD de Tukey. Une régression non linéaire exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose a permis d'estimer les doses d'inhibition (DI) de l'émergence adulte ainsi que leurs intervalles de confiance (95% IC).

2.8. Suivi du développement de D. melanogaster

Pour apprécier l'effet du pyriproxyfène sur le développement de *D. melanogaster* différents paramètres ont été étudiés: la croissance (poids et taille) des pupes et des adultes, la durée de développement du stade pupal et la longévité. Les DI_{25} (0,108 ng) et DI_{50} (0,29 ng) correspondant respectivement aux doses d'inhibition 25% et 50% de l'émergence des adultes ont été testées sur les larves de dernier stade (L3: 12h avant la formation du puparium).

2.8.1. Suivi de la croissance (poids et taille)

La croissance de *D. melanogaster* des séries témoins et traitées au pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}) a été évaluée par la mesure du poids (balance de précision: Sartorius AG Gottinger, Germany) et de la taille (papier millimétrique) des pupes durant toute la durée du stade pupal (0, 1, 2 et 3 jours) ainsi que des adultes mâles et femelles le jour de l'émergence (0 jour). 26 à 33 insectes ont été utilisés pour chaque série d'expériences.

2.8.2. Durée du développement du stade pupal

Afin d'évaluer la durée de développement du stade pupal des séries témoins et traitées $(DI_{25} \text{ et } DI_{50})$, une observation des pupes toutes les 4 h a été réalisée et ce jusqu'à l'émergence des adultes. Pour chaque série, 7 à 8 répétitions de 20 insectes chacune ont été réalisées et maintenues dans les conditions d'élevage citées précédemment.

2.8.3. Longévité des adultes

Les effets du pyriproxyfène sur la longévité des adultes de *D. melanogaster*, survivant au traitement, ont été évalués en suivant le protocole décrit par Linford *et al.* (2013) (**Fig. 8**). Des pools de 5 mâles et 5 femelles nouvellement émergés issus des séries témoin et traitées $(DI_{25} \text{ et } DI_{50})$ ont été placés séparément dans des tubes contenant du milieu nutritif (10 à 11 répétitions de 5 individus chacune pour chaque sexe et pour chaque série d'expériences ont été réalisées). Le transfert des adultes dans des nouveaux tubes contenants de la nourriture fraîche a été effectué périodiquement (chaque 2 jours). La mortalité des adultes mâles et femelles a été enregistrée quotidiennement jusqu'a ce que le dernier adulte meurt.



Figure 8. Procédure expérimentale pour l'évaluation de la longévité de *D. melanogaster* selon Linford *et al.* (2013).

2.9. Dosage enzymo-immunologique des ecdystéroïdes

La quantification des ecdystéroïdes a été réalisée sur des pupes de *D. melanogaster* (12, 36, 48, 60 et 84h après la formation du puparium: AFP), issues d'un traitement (pyriproxyfène: DI_{25} et DI_{50}) préalable des larves à la fin du dernier stade larvaire. Pour l'extraction des ecdystéroïdes, les pupes ont été broyées aux ultra-sons (2-3 min) dans 500 µl de méthanol. Après centrifugation des échantillons à 5000 g pendant 10 min, les surnageants sont récupérés et évaporés dans un bain à sec à 60°C. Chaque extrait est ensuite repris dans

500 μl de tampon EIA (100 ml tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4; 23,4 g NaCl; 0,37 g EDTA; 1 g BSA, q.s.p 1 L d'eau distillée) et analysé par un dosage enzymo-immunologique (EIA) (**Fig. 9**).

Le dosage EIA est une technique qui a été adaptée aux ecdystéroïdes par Porcheron *et al.* (1989) puis modifiée par De Reggi *et al.* (1992). Cette technique utilise comme traceur enzymatique la péroxydase couplée à la 2-succinyl 20- hydroxyecdysone (Aribi, 1997). Le traceur enzymatique est mis en compétition avec les écdystéroïdes des extraits biologiques pour les sites d'anticorps anti-ecdystéroïdes de lapin (anticorps primaire). Les complexes sont alors fixés par un second anticorps polyclonal, anticorps anti-immunoglobulines de lapin (Sigma) retenu, préalablement, au cours d'un coating, sur une microplaque à 96 puits (NUNC immunoplate Maxisorp F96, Danemark). La distribution de ses différents composés a été réalisée à l'aide d'une micropipette multicanaux (Scorex, Suisse) dans l'ordre suivant :

50 µl du traceur enzymatique dans tous les puits.

50 μ l de tampon EIA dans les puits de blanc (B₀) et 100 μ l dans le puit témoin (T).

50 µl des différentes concentrations de solutions standard dans les puits réservés à cet effet.

50 µl des différents échantillons dans les puits réservés à cet effet.

50 µl d'anticorps dans tous les puits excepté dans le puit témoin.

Au bout de 3 heures d'incubation, à température ambiante, les éléments non retenus seront éliminés au cours d'un rinçage des plaques (Tampon de lavage: 5 ml de tampon phosphate 1M, 250 μ l Tween 20, q.s.p 500 ml d'eau distillée). Les anticorps polyclonaux utilisés sont fournis gracieusement par le Dr. J.P. Delbecque (Laboratoire de Neuroendocrinologie, Université de Bordeaux I, France) et le traceur enzymatique (péroxydase) par C. Blaise (Université de Pierre et Marie Curie, Paris, France). Un réactif de révélation de la péroxydase, la tétraméthylbenzidine ou TMB (Sigma, France) est utilisé pour la coloration. Celle ci se fait sous agitation pendant 15 à 30 min, à température ambiante et les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (Labsystem, Finlande) à 630 nm. La mesure de la quantité de peroxydase fixée permet de déterminer la quantité d'écdystéroïdes contenue dans les échantillons biologiques par comparaison avec une courbe de référence obtenue avec des solutions standard de 20-hydroxyecdysone (10⁻¹³ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M). Les résultats sont exprimés en picogrammes de 20E par mg de tissu.

Le signal colorimétrique (exprimé par les absorbances) sera inversement proportionnel à la quantité d'ecdystéroïdes contenus dans les échantillons et exprimée selon la formule suivante:

$$B/B_0$$
 (%) = (B-T)/(B_0-T) x 100

B: absorbance de l'échantillon ou du standard.

B₀: absorbance en absence d'hormone.

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



Figure 9. Principe du dosage EIA d'après Porcheron et al. (1989).

2.10. Quantification de la chitine.

Pour ce qui est de l'appréciation de l'effet du pyriproxyfène sur le contenu en chitine durant le stade pupal, deux doses d'inhibition de l'émergence adulte ($DI_{25} = 0,108$ et $DI_{50} = 0,29$ ng) sont utilisées sur les larves de dernier stade (L3) de *D. melanogaster*.

La quantification de la chitine a été réalisée, chez les séries témoins et traitées (DI₂₅ et DI₅₀), selon le protocole décrit ci-après d'après Lehmann & White. (1975) adapté par Fortwendel *et al.* (2009) et Farnesi *et al.* (2012). Le contenu en chitine des pupes de *D. melanogaster* échantillonnées à différents âges au cours du stade pupal (12, 36, 48, 60 et 84 heures AFP) est évalué par la quantification du glucosamine obtenue par la désacétylation, la dépolymérisation et la désamination des polymères de N-acetylglucosamine (chitine) (**Fig. 10**).

La désacétylation de la chitine est effectuée grâce à une digestion alcaline par l'hydroxyde de potassium KOH (14M), à une température de 130°C pendant 1 h, formant ainsi la chitosane (un polymère de glucosamine). La solution de chitosane va ensuite subir une dépolymérisation en présence de NaNO₂ (nitrite de sodium) (10%) et KHSO₄ (hydrogénosulfate de potassium) (10%) conduisant à la libération des résidus amine du glucosamine, formant un aldéhyde soluble. Cet aldéhyde en présence de NH₄SO₃NH₂ (sulfamate d'ammonium) (12,5%), MBTH (3-méthyl-2-benzothiazolinone) et FeCl₃ (trichlorure de fer) (0,83%) génère une coloration bleue. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 650 nm et les quantités de chitine sont estimées à partir d'une gamme étalon de glucosamine (50-1000 µg de glucosamine).

Avant la quantification de la chitine, les poids des pupes ont été déterminés afin de normaliser les résultats.



Figure 10. Quantification de la chitine (Fortwendel et al., 2009; Farnesi et al., 2012).

2.11. Histologie de la cuticule

Le protocole histologique est réalisé selon Martoja & Martoja-Pierson (1967) sur des pupes issues d'un traitement préalable des larves L3 à la DI_{50} (0,29 ng) et âgées de 60 et 84 h AFP.

La fixation des échantillons est effectuée immédiatement après le prélèvement, par l'immersion totale des pupes dans un liquide fixateur (Formol 10%, pendant 48h). Les échantillons (pupes) sont ensuite rincés plusieurs fois à l'eau distillée. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine: de part son caractère hydrophobe, les échantillons doivent donc subir une déshydratation par immersion successives dans des bains d'alcool (Ethanol) à degré croissant. Un dernier bain de xylène est réalisé avant l'inclusion qui commence par une imprégnation à l'étuve dans un bain de paraffine liquide. Après une nuit, les échantillons sont inclus dans la paraffine à l'aide de moules: pour former des blocs de paraffine durs, à l'intérieur desquels se trouvent les échantillons inclus et orientés selon le plan de coupe choisi. Des coupes de 4 µm d'épaisseur, sont réalisées par un microtome de type Leica RM2125T et sont montées sur des lames de verre grâce à de l'eau albumineuse. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les lames doivent être déparaffinées avant de pouvoir être réhydratées. Le déparaffinage consiste à chauffer les lames, jusqu'à fusion de la paraffine, avant de les immerger dans trois bains successifs de xylène. Les lames sont ensuite plongées dans des bains d'alcool à degré décroissant puis colorées à l'hématoxyline-éosine.

L'observation des différentes coupes est effectuée à l'aide d'un microscope photonique de type Leica DM500 équipé d'une caméra (Leica ICC50 HD) et l'épaisseur de la cuticule a été déterminée en utilisant un programme spécialisé (Las EZ Leica software).
2.12. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm SEM. L'égalité des variances a été vérifiée par le test de Bartlett et le test de Brown-Forsythe avant l'utilisation de l'analyse de la variance. La régression non linéaire utilisant une courbe dose-réponse sigmoïdale exprimant les pourcentages d'inhibition corrigée en fonction des logarithmes des doses ainsi que le rapport d'absorbances (B/B₀) en fonction des quantités de la 20E (pg 20E/puits), a permis d'estimer respectivement les doses d'inhibition de l'émergence adulte (DI) et les taux d'ecdystérïodes pupal. Les résultats concernant le suivi du développement (croissance des pupes et des adultes, durée de développement du stade pupal et longévité), dosage EIA et la quantification de la chitine ont fait l'objet d'une analyse de la variance à un ou deux critères de classification suivis d'un classement des différents groupes par le test HSD de Tukey. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour traiter les résultats concernant l'épaisseur de la cuticule. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism d'analyse et de traitement statistique des données version 6.01 pour Windows. (GraphPad Software Inc, www.graphpad.com).

RESULTATS

3. RESULTATS

3.1. Toxicité du pyriproxyfène à l'égard de D. melanogaster

Le pyriproxyfène a été testé par application topique sur les larves de dernier stade (L3: 12h avant la formation du puparium) à des doses variant de 0,01 à 2 ng/larve. Les pourcentages d'inhibition de l'émergence adulte ont été calculés pour les différentes séries à partir de la mortalité des pupes, des mues imaginales incomplètes et des adultes malformés.

Les pourcentages d'inhibition corrigée enregistrés au cours de nos tests varient de $8,12 \pm 1,55\%$ à la dose la plus faible (0,01 ng) à $89,69 \pm 1,47\%$ à la dose la plus élevée (2 ng) (**Tableau 1**). Un taux d'inhibition de l'émergence adulte de $11,66 \pm 1,66\%$ est enregistré chez les séries témoins.

Tableau 1: Effets du pyriproxyfène, administré par application topique à différentes doses (ng) chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium). Inhibition corrigée (%) de la mue adulte. (m \pm SEM, n = 3 répétitions de 15 individus chacune).

Doses (ng)	0,01	0,1	0,5	1	2
R ₁	7,40	25,92	70,86	85,17	92,42
R ₂	11,11	22,22	62,62	77,77	87,32
R ₃	5,87	17,64	61,12	78,42	89,33
$m \pm SEM$	8,12 ± 1,55	21,93±2,39	64,87±3,02	80,45±2,36	89,69±1,47

L'analyse de la variance à un critère de classification réalisée après transformation angulaire des pourcentages de l'émergence adulte révèle des différences hautement significatives entre les différentes doses testées (p < 0,001) (**Tableau 2**). Le test HSD de Tukey a permis le classement des différentes doses en quatre groupes (**Fig. 11**).

Tableau 2: Effets du pyriproxyfène, administré par application topique à différentes doses (ng) chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le pourcentage d'inhibition corrigé de la mue adulte. (m \pm SEM, n = 3 répétitions de 15 individus chacune): Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	15660	4	3915	261,4	0,0001***
Erreur résiduelle	149,8	10	14,98		
Total	15810	14			

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



Figure 11. Inhibition corrigée (%) de l'émergence adulte après application topique du pyriproxyfène (ng/insecte) chez les larves (L3) de *D. melanogaster* 12h avant la formation du puparium. (m \pm SEM, n = 3 répétions de 15 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.

RESULTATS

Une courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose appliquée (**Fig. 12**) a permis d'estimer les valeurs des différentes doses d'inhibition de l'émergence adulte (DI) mentionnées dans le **tableau 3** ainsi que leurs intervalles de confiance (95%) et le Hill Slope.



Figure 12. Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée de l'émergence adulte en fonction du logarithme de la dose du pyriproxyfène, administré par application topique aux larves L3 de *D. melanogaster* 12h avant la formation du puparium. $\mathbf{R}^2 = \mathbf{0}, \mathbf{99}. \mathbf{Y} = \mathbf{100/1+10^{(log EC50-X)*Hill Slope}}$

Tableau	3:	Toxicité	du	pyriproxyfène	(ng/larve),	administré	par	application	topique	aux
larves L3	de	D. melar	ioge	ster 12h avant	la formatio	n du pupari	um:	Déterminati	on des d	loses
d'inhibiti	on c	le l'émerg	genc	e adulte et leur	s intervalles	de confian	ce (9	5%).		

	Valeur (ng)	Intervalle de Confiance	Erreur Standard
DI_{10}	0,040	[0,019-0,084]	
DI ₂₅	0,108	[0,066 - 0,175]	
DI ₅₀	0,290	[0,213 - 0,393]	
DI ₉₀	2,087	[1,196-3,643]	
Hill Slope	1,113	[0,787 - 1,439]	0,102

3.2. Effets du pyriproxyfène sur la croissance des pupes (poids/taille) de D. melanogaster

Les résultats concernant le poids (mg) et la taille (mm) des pupes de *D. melanogaster* des séries témoins et traitées (DI_{25} et DI_{50}) au pyriproxyfène et âgées de 0, 1, 2 et 3 jours sont représentés dans les **tableaux 4** à 7.

3.2.1. Effets du pyriproxyfène sur le poids des pupes

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur le poids des pupes des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement (p < 0,001), et un effet non significatif de l'âge (p = 0,96) et de l'interaction traitement-âge (p = 0,96) (**Tableau 4**).

Chez les séries témoins le poids moyen des pupes est de $1,32 \pm 0,013$ mg à 0 jour. Ce poids reste stable durant toute la durée du stade pupal soit à 1, 2 et 3 jours (p > 0,05) (**Tableau 5**).

L'évolution du poids des pupes chez les séries traitées (DI_{25} et DI_{50}) suit la même tendance que celle des témoins au cours du développement pupal (0, 1, 2 et 3 jours). Le pyriproxyfène réduit de manière significative le poids des pupes (p < 0,05) et ce sans effet dose (p > 0,05) (**Tableau 5**).

Tableau 4: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le poids des pupes (mg). (m ± SEM, n = 26-32): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	3,598	2	1,799	104,5	0,0001***
Age	0,004	3	0,001	0,085	0,96
Interaction	0,024	6	0,004	0,235	0,96
Erreur résiduelle	5,733	333	0,017		

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

Tableau 5: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le poids des pupes (mg). (m ± SEM, n = 26-32): Comparaison des moyennes à différents âges pour une même série (lettres majuscules) et pour un même âge entre les différentes séries (lettres minuscules).

Ages (jours)	Témoins	DI ₂₅	DI ₅₀
0	1,32±0,013 a	1,14±0,033 b	1,11±0,029 b
	А	А	А
1	1,32± 0,011 a	1,12±0,033 b	1,10±0,025 b
	А	А	А
2	1,34± 0,017 <mark>a</mark>	1,12±0,031 b	1,11±0,027 b
	А	А	А
3	1,34± 0,015 a	1,12±0,021 b	1,10±0,027 b
	А	А	А

Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de p < 0.05.

3.2.2. Effets du pyriproxyfène sur la taille des pupes

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur la taille des pupes des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement et de l'âge (p < 0,001), et un effet non significatif de l'interaction traitement-âge (p = 0,064) (**Tableau 6**).

La taille des pupes de *D. melanogaster* des séries témoins est de l'ordre de $3,14 \pm 0,025 \text{ mm} \text{ à } 0 \text{ jour, décroit pour atteindre une valeur de } 3,02 \pm 0,017 \text{ mm} \text{ à } 2 \text{ jours}$ (p < 0,001) et reste stable au dernier jour du stade pupal (3 jours) (**Tableau 7**).

Chez les séries traitées au pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}) la taille des pupes est stable pendant toute la durée du stade pupal (p > 0,05) (**Tableau 7**). Une réduction de la taille des pupes est enregistrée à 0 et 1 jour et ce sans effet dose (p > 0,05) (**Tableau 7**).

Tableau 6: Effets du pyriproxyfène (DI ₂₅ et DI ₅₀), administré par application topique chez les
larves L3 de D. melanogaster (12h avant la formation du puparium), sur la taille des pupes
(mm). (m \pm SEM, n = 26-31): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	0,239	2	0,119	11,38	0,0001***
Age	0,451	3	0,150	14,49	0,0001***
Interaction	0,126	6	0,021	2,003	0,064
Erreur résiduelle	3,448	327	0,010		

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

Tableau 7: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la taille des pupes (mm). (m ± SEM, n = 26-31): Comparaison des moyennes à différents âges pour une même série (lettres majuscules) et pour un même âge entre les différentes séries (lettres minuscules).

Ages (jours)	Témoins	DI ₂₅	DI ₅₀
0	3,14±0,025 a	$3,08 \pm 0,007$ b	$3,03 \pm 0,017$ b
v	А	А	А
1	3,13±0,023 <mark>a</mark>	$3,03 \pm 0,007$ b	$2,98 \pm 0,011$ b
1	А	А	А
2	3,02±0,017 a	$2,99 \pm 0,027$ a	2,99 ± 0,015 a
Z	В	Α	А
2	3,02±0,019 <mark>a</mark>	$3,02 \pm 0,017$ a	$2,95 \pm 0,023$ a
3	В	Α	Α

Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de p < 0,05.

3.3. Effets du pyriproxyfène sur la croissance des adultes (poids/taille) de D. melanogaster

Les résultats concernant les effets du pyriproxyfène sur le poids (mg) et la taille (mm) des adultes (mâles et femelles) nouvellement émergés (0 jour) sont représentés dans les **tableaux 8** à **11**.

3.3.1. Effets du pyriproxyfène sur le poids des adultes

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur le poids des adultes des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement (p < 0,001), du sexe (p < 0,001), et un effet significatif de l'interaction traitement-sexe (p = 0,01) (**Tableau 8**).

Chez les séries témoins le poids moyen est estimé à 0.92 ± 0.02 mg chez les adultes mâles, et à 1.37 ± 0.04 mg chez les adultes femelles (**Tableau 9**).

Chez les séries traitées au pyriproxyfène (DI₂₅ et DI₅₀) le poids des adultes diminue significativement pour les deux sexes (p < 0,001) et ce sans effets dose (p > 0,05). De plus, nos résultats montrent aussi que le poids moyen des femelles est supérieur à celui des mâles (Test *t*: p < 0,001).

Tableau 8: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le poids des adultes (mg). (m ± SEM, n = 26-30): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	2,92	2	1,46	36,35	0,0001***
Sexe	5,51	1	5,51	136,9	0,0001***
Interaction	0,37	2	0,18	4,61	P = 0,01*
Erreur résiduelle	7,007	147	0,040		

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

Tableau 9: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le poids des adultes (mg). (m ± SEM, n = 26-30): Comparaison des moyennes à différents traitements pour un même sexe (lettres minuscules) et pour un même traitement entre les deux sexes (lettres majuscules).

Poids (mg)	Mâle	Femelle
Témoins	$0,92 \pm 0,02$ A	$1,37 \pm 0,04$ B
	a	a
DI ₂₅	$0,70 \pm 0,02$ A	$1,07 \pm 0,05$ B
	b	b
DI_{50}	$0,75 \pm 0,03$ A	$0,98\pm0,04~\mathrm{B}$
	b	b

Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de p < 0.05.

3.3.2. Effets du pyriproxyfène sur la taille des adultes

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur la taille des adultes des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement (p < 0,001), du sexe (p < 0,001), et aucun effet significatif de l'interaction traitement-sexe (p = 0,92) (**Tableau 10**).

Concernant la taille des adultes des séries témoins, elle est de $2,96 \pm 0,01$ mm chez les mâles et de $3,29 \pm 0,01$ mm chez les femelles (**Tableau 11**).

Chez les séries traitées au pyriproxyfène (DI₂₅ et DI₅₀), la taille des adultes diminue d'une manière significative pour les deux sexes (p < 0,001) et ce sans effets dose (p > 0,05). Nos résultats montrent aussi que la taille moyenne des femelles est supérieure à celle des mâles (Test *t*: p < 0,001).

Tableau 10: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la taille des adultes (mm). (m ± SEM, n = 26-30): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	1,117	2	0,55	29,83	0,0001***
Sexe	4,608	1	4,608	246,10	0,0001***
Interaction	0,003	2	0,001	0,08	P = 0,92
Erreur résiduelle	2,258	147	0,018		

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

Tableau 11: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la taille des adultes (mm). (m ± SEM, n = 26-30): Comparaison des moyennes à différents traitements pour un même sexe (lettres minuscules) et pour un même traitement entre les deux sexes (lettres majuscules).

	1	
Taille (mm)	Mâle	Femelle
Témoins	$2,96 \pm 0,01$ A	$3,29 \pm 0,01$ B
	a	a
DI ₂₅	$2,83 \pm 0,03$ A	$3,14 \pm 0,02$ B
	b	b
DI ₅₀	$2,78 \pm 0,02$ A	$3,10 \pm 0,02$ B
	b	b

Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de p < 0,05.

3.4. Effets du pyriproxyfène sur la durée de développement du stade pupal

L'analyse de la variance à un critère de classification effectuée sur la durée de développement du stade pupal des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement (p = 0,0021) (**Tableau 12**).

Le pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique sur les larves L3 de *D. melanogaster*, 12 h avant la formation du puparium, augmente significativement (p = 0,0021) (**Tableau 12**) la durée de développement du stade pupal et ce seulement à la plus forte dose (**Fig. 13**).

RESULTATS

En effet, la valeur moyenne de la durée de développement du stade pupal enregistrée chez les séries traitées (DI₅₀) est de 102,57 \pm 1,71 h contre des valeurs témoins de 88,25 \pm 3,01 h. Le pyriproxyfène induit donc un prolongement du stade pupal d'environ 14 h et ce uniquement avec la dose la plus élevée (DI₅₀) (**Fig. 13**).

Tableau 12: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la durée de développement du stade pupal (h). (m ± SEM, n = 7-8): Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	1159	2	579,6	8,925	0,0021**
Erreur résiduelle	1299	20	64,94		
Total	2458	22			

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



Figure 13. Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la durée de développement du stade pupal (h). (m ± SEM, n = 7-8): Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de p < 0,05.

3.5. Effets du pyriproxyfène sur la longévité des adultes

Les effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique sur les larves (L3) de *D. melanogaster* 12 h avant la formation du puparium ont été évalués sur la longévité des adultes (mâles et femelles).

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur la longévité des adultes des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement (p < 0,001), du sexe (p < 0,001), et de l'interaction traitement-sexe (p=0,0069) (**Tableau 13**).

Chez les séries témoins, la longévité enregistrée chez les femelles est de $61,69 \pm 1,2$ jours et de $51,73 \pm 1,03$ jours pour les mâles. Ces résultats montrent que les femelles témoins vivent plus longtemps comparativement aux mâles (p < 0,05).

Chez les séries traitées au pyriproxyfène (DI_{25} , DI_{50}), la longévité des adultes mâles et femelles diminue d'une manière significative (p < 0,001) et ce sans effet dose (p > 0,05).

Tableau 13: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la longévité des adultes (jours). (m ± SEM, n = 26-30): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	9099	2	4550	88,20	0,0001***
Sexe	5158	1	5158	100	0,0001***
Interaction	521,8	2	260,9	5,05	P = 0,0069
Erreur résiduelle	15164	294	51,5		

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



Figure 14. Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la longévité des adultes (jours). (m ± SEM, n = 49-54): Comparaison des moyennes à différents traitements pour un même sexe (lettres majuscules) et pour un même traitement entre les deux sexes (lettres minuscules), F: Femelle, M: Mâle.

3.6. Effets du pyriproxyfène sur le taux d'ecdystéroïdes chez les pupes de *D. melanogaster*

Le dosage enzymo-immunlogique (EIA) des ecdystéroïdes chez *D. melanogaster* a été réalisé sur des pupes issues des larves témoins et traitées (DI_{25} et DI_{50}) au pyriproxyfène (12h avant la formation du puparium) et âgées de 12, 36, 48, 60 et 84 h.

Les quantités d'ecdystéroïdes ont été déterminées à partir d'une courbe dose-réponse en utilisant différentes concentrations de 20 E (**Fig. 15**).

Les valeurs des ecdystéroïdes chez les séries témoins sont de l'ordre de 264,89 \pm 7,68 pg 20E/mg à 12 h AFP; ces valeurs augmentent significativement pour atteindre un pic de 414,24 \pm 2,71 pg 20E/mg à 36 h AFP (p < 0,001). Une nette diminution est ensuite enregistrée à 48 h AFP (p < 0,001) pour atteindre des valeurs minimales de 86,74 \pm 1,04 pg 20E/mg vers la fin du stade pupal (p < 0,001) (**Fig. 16**).



Figure 15. Dosage EIA des ecdystéroïdes: courbe dose-réponse établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant le rapport B/B_0 en fonction des quantités en pg 20E/puits.

Le profil hormonal enregistré chez les séries traitées au pyriproxyfène suit la même tendance que les témoins avec un pic à 36 h respectivement de $337,11 \pm 1,01$ pg 20E/mg pour la DI₂₅ et 284,73 ± 8,96 pg 20E/mg pour la DI₅₀ (p < 0,001). Ces valeurs diminuent significativement à 48 et 60 h (p < 0,001).

La comparaison entre les séries témoins et les séries traitées révèle que le pyriproxyfène réduit de manière significative les taux d'ecdystéroïdes chez les pupes à 12 et 36 h AFP et ce avec un effet dose-dépendant (p < 0,001).

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur le profil hormonal des pupes des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement, de l'âge et de l'interaction traitement-âge (p < 0,001) (**Tableau 14**).

Tableau 14: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le taux d'ecdystéroïdes pupal (pg 20E/mg). (m ± SEM, n = 3-5): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	11385	2	5692	22,25	0,0001***
Age	209860	4	52465	205	0,0001***
Interaction	106282	8	13285	51,92	0,0001***
Erreur résiduelle	9212	38	255,9		

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



Figure 16. Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur le taux d'ecdystéroïdes pupal (pg 20E/mg). (m ± SEM, n = 3-5): Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de (p < 0,05).

3.7. Effets du pyriproxyfène sur le contenu en chitine durant le stade pupal

Le contenu en chitine chez *D. melanogaster* a été estimé sur des pupes (12, 36, 48, 60 et 84 h) issues des larves témoins et traitées (DI_{25} et DI_{50}) au pyriproxyfène (12h avant la formation du puparium). Les quantités de chitine ont été déterminées à partir d'une gamme d'étalonnage utilisant différentes concentrations (50-1000 µg) de glucosamine (**Fig. 17**).



Figure 17. Courbe étalon exprimant les densités optiques en fonction des quantités de glucosamine (μ g).

Chez les séries témoins, le contenu en chitine varie au cours du stade pupal. Les valeurs enregistrées sont de 249,87 \pm 7,91 µg/mg à 12 h AFP; ces valeurs augmentent significativement pour atteindre un pic de 424,53 \pm 3,37 µg/mg à 36 h AFP (p < 0,001) puis diminuent d'une manière significative à 60 et 84 h AFP (p < 0,001).

Chez les séries traitées au pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), les variations dans les quantités de chitine durant le stade pupal suivent la même tendance que les témoins avec un pic à 36 h AFP puis une diminution à 60 et 84 h AFP (p < 0,001) (**Fig. 18**).

La comparaison entre les séries témoins et les séries traitées révèle que le pyriproxyfène induit une augmentation significative des quantités en chitine du stade pupal uniquement avec la DI_{50} et ce pour tous les âges testés (p < 0,001).

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur les quantités en chitine du stade pupal des séries témoins et traitées révèle un effet hautement significatif du traitement, de l'âge et de l'interaction traitement-âge (p < 0,001) (**Tableau 15**).

Tableau 15: Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la quantité en chitine du stade pupal (µg glucosamine/mg pupe). (m ± SEM, n = 8-12): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	СМ	Fobs	Р
Traitement	103939	2	51970	108,2	0,0001***
Age	1,345	4	336195	700,0	0,0001***
Interaction	23379	8	2922	6,085	0,0001***
Erreur résiduelle	57154	119	480,3		

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

Les variations des quantités en chitine enregistrées au cours de nos expérimentations semblent être étroitement liées au pic d'ecdystéroïdes rapporté précédemment au cours du stade pupal (Fig. 19).



Figure 18. Effets du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la quantité en chitine du stade pupal (µg glucosamine/mg pupe). (m ± SEM, n = 8-12): Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de (p < 0,05).



Figure 19. Taux d'ecdystéroïdes et contenu en chitine au cours de développement pupal chez *D. melanogaster.*

3.8. Effets du pyriproxyfène sur l'épaisseur de la cuticule durant le stade pupal

L'observation microscopique des coupes des séries témoins et traitées (DI_{50}), a permis de mesurer l'épaisseur de la cuticule des pupes (60 et 84 h AFP) de *D. melanogaster*. L'épaisseur de la nouvelle cuticule est représentée sur la **Figure 20**.

Chez les séries témoins, l'épaisseur de la cuticule est de $0.55 \pm 0.02 \ \mu\text{m}$ à 60 h AFP, cette valeur augmente significativement pour atteindre $0.64 \pm 0.01 \ \mu\text{m}$ à 84 h AFP (p < 0.01).

L'épaisseur de la cuticule chez les séries traitées au pyriproxyfène (DI₅₀) suit la même tendance que les témoins avec une valeur de $1,17 \pm 0,14 \ \mu\text{m}$ à 60 h AFP qui augmente pour atteindre une valeur moyenne de $1,45 \pm 0,01 \ \mu\text{m}$ à 84 h AFP (p < 0,01).

La comparaison entre les séries témoins et les séries traitées indique que le pyriproxyfène induit une augmentation significative de la nouvelle cuticule à 60 et 84 h AFP (*Mann-Whitney*: p = 0,0079) (Fig. 20).



Figure 20. Effets du pyriproxyfène (DI₅₀), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur l'épaisseur de la cuticule (μ m). (m ± SEM, n = 8-12): Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de (p < 0,05).

3.9. Effet du pyriproxyfène sur la structure de la nouvelle cuticule

Les coupes histologiques de la nouvelle cuticule réalisées sur des pupes issues des larves témoins et traitées (DI₅₀) au pyriproxyfène (12h avant la formation du puparium) sont représentées dans la **figure 21**. La cuticule témoin présente un développement normal et sans anomalies structurales où l'on observe l'apparition des soies au niveau de l'abdomen (**Fig. 21A**). La cuticule chez les séries traitées au pyriproxyfène se caractérise par une épaisseur plus importante et une absence de soies (**Fig. 21B**).



Figure 21. Effets du pyriproxyfène (DI₅₀), administré par application topique chez les larves L3 de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium), sur la structure de la nouvelle cuticule; **A**: la nouvelle cuticule avec des soies (témoin); **B**: la nouvelle cuticule sans les soies (traitée); **Ct** – Cuticule, **Ep** – Epiderme, **S** – Soies.

DISCUSSION

4. DISCUSSION

Chez les insectes, la succession des événements (mues, métamorphoses) au cours du développement est contrôlée et coordonnée par le système neuroendocrinien qui secrète les hormones nécessaires dont les ecdystéroïdes et l'hormone juvénile (Gilbert *et al.*, 2002; Lafont *et al.*, 2005; Gruntenko & Rauschenbach, 2009; Hiruma & Kaneko, 2013). Si la 20E est responsable du déclenchement des mues, l'HJ prévient la métamorphose grâce à son action *statu quo* (Riddiford *et al.*, 2010).

Le mécanisme d'action à l'échelle moléculaire utilisé par l'HJ pour maintenir ce *statu quo* et diriger les différents événements au cours du développement demeure peu clair à l'heure actuelle (Harshman *et al.*, 2010; Riddiford *et al.*, 2010). En effet, la nature et le nombre de récepteurs de l'HJ reste très controversés (Riddiford, 2008).

Parmi les candidats potentiels à ces récepteurs, le produit du gène *Methoprene-tolerant* (Met) est sans doute le plus populaire (Riddiford *et al.*, 2010). Le Met fut identifié comme un facteur de transcription de la famille bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix-PAS) chez une souche mutante de *Drosophila* résistante au méthoprène (JHAs) (Ashok *et al.*, 1998; Wilson & Ashok, 1998; Pursley *et al.*, 2000). En effet, il a été démontré que la protéine Met se lie avec une grande affinité à l'HJ (Miura *et al.*, 2005; Charles *et al.*, 2011). Un second candidat est la protéine Ultraspiracle (USP), un homologue structural et fonctionnel du récepteur RXR de l'acide 9-cis rétinoïque chez les humains, qui forme un hétérodimère avec le récepteur de l'ecdysone (EcR) (Yao *et al.*, 1992, 1993; Thomas *et al.*, 1993; Jones & Sharp, 1997). En effet, l'application de l'HJ III sur une lignée cellulaire exprimant la protéine USP chez *D. melanogaster* induit l'activation de transcription du promoteur des gènes suggérant une liaison de l'HJ à la protéine USP (Xu *et al.*, 2002; Wozniak *et al.*, 2004). Cette dernière semble avoir la capacité de se lier non seulement à l'HJ, mais aussi à ses précurseurs, farnesol, acide farnésoique et méthyl farnesoate (MF) (Jones *et al.*, 2006).

L'USP est avant tout connu comme étant un partenaire du récepteur de l'ecdysone (EcR) (Yamanaka *et al.*, 2013). La liaison de la 20E à l'EcR induit l'hétérodimèrisation entre l'USP et l'EcR et le complexe ainsi obtenu se fixe sur l'ADN pour contrôler la transcription et l'expression d'un petit groupe de gènes précoces appelés BR-C (Broad complexe), E74 et E75 (Kokoza *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007), les protéines produites par ces gènes précoces activent un plus grand groupe de gènes tardifs (**Fig. 22**) jouant un rôle

important dans la régulation de la croissance, du développement, de la métamorphose et de la reproduction des insectes (Kozlova & Thummel, 2003; Dubrovsky, 2005; Yamanaka *et al.*, 2013).

Chez *D. melanogaster*, des pics de sécrétion de faible amplitude d'ecdysone (20E) couplés à la PTTH (Prothoracicotropic hormone) induisent les mues larvaires en présence de taux relativement élevés d'HJ. Passé un poids critique, l'HJ n'est plus sécrétée et un pic de sécrétion de haute amplitude d'ecdysone et de PTTH induit la formation du puparium et le début de la phase prépupale (**Fig. 22**). Douze heures plus tard, un pic d'hormone (20E) plus modeste met fin au stade prépupal et déclenche la pupaison. La phase pupale se caractérise par le pic d'hormone (20E) le plus important, corrélé au développement des structures adultes (Quinn *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014) (**Fig. 22**).

L'équilibre entre ces deux hormones est donc essentiel au bon déroulement du développement des insectes. D'une façon générale, un apport exogène de 20E au cours du développement larvaire induit une métamorphose précoce, tandis que, l'application de l'HJ à la fin du développement larvaire engendrerait l'apparition des stades surnuméraires et/ou des intermédiaires larve-pupe (Riddiford, 1994; Gilbert, 2010; Ramaseshadri *et al.*, 2012; Ono, 2014).

DISCUSSION



Figure 22. Taux d'hormone juvénile (JH) et de 20-hydroxyecdysone (20E) au cours du développement de *D. melanogaster* (Dubrovsky, 2005). La 20E initie toutes les transitions de développement, tels que de la larve à la larve, de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte tandis que l'HJ détermine le type de transition et la nature de mue; Pp: prépupes. 20E _____

НЈ -----

4.1. Effets du pyriproxyfène sur le taux d'inhibition de l'émergence adulte chez *D. melanogaster*

Dans la présente étude, le pyriproxyfène, un analogue de l'hormone juvénile a été testé par application topique sur les larves de dernier stade (L3) de *D. melanogaster* (12h avant la formation du puparium). Le traitement au pyriproxyfène n'induit aucune mortalité chez les larves de dernier stade et n'affecte pas la transition larve-pupe. Cependant, l'insecticide provoque une inhibition dose-dépendante de l'émergence des adultes et l'apparition de plusieurs anomalies morphologiques chez les adules nouvellement exuviés (adultes malformés, mues partielles et mues bloquées). Les doses d'inhibition de l'émergence adulte, sont respectivement de l'ordre de 0,108 ng et 0,29 ng pour la DI_{25} et la DI_{50} .

Contrairement aux lépidoptères et la majorité des insectes holométaboles, certains diptères comme *D. melanogaster* ont perdu leur sensibilité à l'HJ (Zhou & Riddiford, 2008). En effet, l'application topique de l'HJ ou de ses analogues (JHA) n'affecte pas la transition larve-pupe et ne joue aucun rôle dans l'initiation de la métamorphose (Ashburner, 1970; Riddiford & Ashburner, 1991; Riddiford *et al.*, 2003). De plus, chez la drosophile, les pupes sont formées à partir de disques imaginaux, à l'exception de la cuticule abdominale qui est d'origine larvaire (cellules épidermique et histoblastes), ce qui pourrait contribuer à l'incapacité de l'HJ ou de ses analogues à empêcher la transition larve-pupe (Zhou & Riddiford, 2002). Toutefois un apport exogène d'HJ ou de JHA quelques heures avant ou au moment de la pupaison prévient le développement normal des adules (Zhou & Riddiford, 2002).

Le pyriproxyfène est connu pour être un puissant inhibiteur de la métamorphose et de la formation des adultes (Ishaaya & Horowitz, 1992; Dhadialla *et al.*, 2005; Hatakoshi, 2012). En effet, l'application topique du pyriproxyfène sur les larves de dernier stade de *Blattella germanica* (L.) induit une suppression de l'émergence adule et aussi l'apparition d'anomalies morphologiques (Kawada *et al.*, 1989).

Boina *et al.* (2009) ont également rapporté une suppression de l'émergence des adultes chez l'hémiptère *Diaphorina citri* sous l'effet du pyriproxyfène. Des résultats similaires ont été rapportés chez *Aedes aegypti* (Sihuincha *et al.*, 2005; Harburger *et al.*, 2011), *Anopheles culicifacies, Anopheles subpictus* (Yapabandara & Curtis, 2004), *Anopheles gambiae* (Mbare

et al., 2013), *Bradysia coprophila* (Ludwig & Oetting, 2001), *Lycoriella ingenua* (Erler *et al.*, 2011) et chez *Culex pipiens* (Al-Sarar *et al.*, 2011).

De plus, Singh & Kumar (2015) ont également rapporté une réduction des taux de l'émergence des adultes, la formation de mosaïque pupe-adulte et d'adultes malformés à la première génération de *Sarcophaga ruficornis* et ce après application topique du pyriproxyfène chez la génération parentale.

4.2. Effets du pyriproxyfène sur la croissance des pupes et des adultes (poids/taille)

Chez la drosophile, comme chez tous les insectes, la croissance et la taille finale du corps sont définies principalement par l'alimentation durant les stades larvaires et ce sous la dépendance de l'insuline (Mirth & Shingleton, 2012; Nijhout et al., 2014). La taille finale du corps est donc déterminée principalement par la taille de la larve à la fin du dernier stade larvaire quand elle cesse de s'alimenter et entame la métamorphose (Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007). Par conséquent, les mécanismes qui contrôlent la taille finale des adultes sont étroitement reliés aux mécanismes de contrôle de la métamorphose (Nijhout et al., 2014). Une grande partie de ces mécanismes de contrôle dépend de l'interaction entre l'hormone juvénile et l'ecdysone (Nijhout, 1994; Truman & Riddiford, 2007). En effet, la transition du stade larvaire au stade pupal se fait en réponse à la production de l'hormone de mue et de l'hormone juvénile à condition que la taille et le poids de l'insecte atteignent un niveau suffisant pour lui permettre cette transition (Rewitz et al., 2013; Nijhout et al., 2014). Ce poids critique est atteint à des taux bas d'HJ qui stimule la production de la PTTH et donc la synthèse de l'hormone de mue. Cette dernière stimule la continuation de la croissance et joue un rôle crucial dans l'acquisition du poids critique et du poids final chez la drosophile (Mirth & Shingleton, 2012). De plus, l'acquisition de la taille finale des insectes est également soumise à des facteurs environnementaux, physiologiques, génétiques et de coordination de développement des différents organes (Fig. 23) (Mirth & Shingleton, 2012).



Figure 23. Différents facteurs intervenant dans la régulation de la croissance chez *D. melanogaster* (Mirth & Shingleton, 2012). E: ecdysone; CNS: système nerveux central; PG: glande prothoracique; FDS: signal dérivé du corps gras; dILPs: insulin-like peptides.

L'application du pyriproxyfène aux doses d'inhibition de l'émergence adulte (DI₂₅ et DI₅₀) perturbe la croissance de *D. melanogaster* en réduisant la taille et le poids des pupes et des adultes. Des résultats similaires ont été rapportés par Nasr *et al.* (2010) chez *Spodoptera littoralis* traitée au pyriproxyfène. Chez *D. melanogaster* l'HJ semble jouer un rôle primordial dans l'acquisition de la taille finale de l'insecte (Riddiford *et al.*, 2010). De plus, la réduction des taux d'ecdystéroïdes enregistrée au cours de nos expérimentations sous l'effet du pyriporxyfène pourrait expliquer également l'inhibition de la croissance obtenue. En effet, le statut nutritionnel de l'insecte agit sur la sécrétion de l'insuline qui régule la croissance et la production d'ecdystéroïdes (Mirth & Shingleton, 2012).

4.3. Effets du pyriproxyfène sur la durée de développement

Nos résultats ont démontré que l'application d'un analogue de l'hormone juvénile, le pyriproxyfène à la fin du dernier stade larvaire (L3) de *D. melanogaster* induit un prolongement de la durée du stade pupal comparativement aux témoins. Le prolongement de la durée de développement des stades immatures sous l'effet des analogues de l'hormone juvénile a été rapporté chez de nombreuses espèces d'insectes. En effet, Singh & Kumar (2011) ont mis en évidence un prolongement de la durée du stade larvaire ainsi qu'un décalage dans les transitions larve-larve et larve-pupe après application topique du pyriproxyfène chez le lépidoptère *Papilio demoleus*. Alizadeh *et al.* (2012) ont rapporté un prolongement de la durée de développement chez les larves et les pupes de *Pluttela xylostella* traitées au pyriproxyfène. Des effets similaires ont été également enregistrés sous l'effet du méthoprène chez *Bombyx mori* (Miranda *et al.*, 2002), du kinoprène chez *Culex pipiens* (Hamaidia & Soltani, 2014) et du fénoxycarbe chez *Corcyra cephalonica* (Singh & Tiwari, 2014).

Chez *D. melanogaster*, le début du stade pupal (prépupe) est une période très sensible à l'JH. En effet, à ce stade l'HJ doit être absente dans les cellules de l'épiderme pour permettre le bon déroulement du développement (Nijhout, 1994). La présence du pyriproxyfène à ce moment critique du développement, conduit à un prolongement de la durée du développement du stade pupal, des anomalies morphologiques chez les adultes et une inhibition de l'émergence adulte.

4.4. Effets du pyriproxyfène sur la longévité des adultes

Au cours de nos expérimentations, l'application topique du pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}) sur les larves de dernier stade de *D. melanogaster* affecte la survie des adultes. En effet, le pyriproxyfène réduit significativement la longévité des mâles et femelles survivants au traitement. Nos résultats montrent également que les femelles de *D. melanogaster* vivent plus longtemps que les mâles. De nombreuses études ont rapporté la réduction de la longévité chez les insectes suite au traitement par le pyriproxyfène (Liu, 2003; Steigenga *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2012).

Selon Simon *et al.* (2003) les ecdystéroïdes seraient directement impliqués dans le contrôle de la longévité chez *D. melanogaster*. En effet, les ecdystéroïdes se lient à un récepteur nucléaire qui va activer l'expression de plusieurs gènes par l'intermédiaire

DISCUSSION

d'histones acétyltransférases (Moras & Gronemeyer, 1998; Riddiford *et al.*, 2000). Parmi ces gènes, plusieurs codent pour des protéines qui sont impliquées dans les processus de vieillissement comme les protéines chaperonnes (Luo *et al.*, 1991), la catalase (Radyuk *et al.*, 2000), les facteurs de transcription (Thummel, 1996) et les régulateurs de l'apoptose (Baehrecke, 2000).

Des études récentes ont également démontré l'implication de l'hormone juvénile dans la régulation de la longévité chez les insectes (Flatt & Kawecki, 2007; Yamamoto *et al.*, 2013). En effet, l'ablation des corps allates (lieu de synthèse de l'HJ) prolonge la longévité des adultes de *D. melanogaster* (Yamamoto *et al.*, 2013). De plus, il a été mis en évidence que le produit du gène *takeout* (synthétisé et secrété par le corps gras) dont la surexpression prolonge la longévité chez les insectes, était sous l'influence de l'HJ (Bauer *et al.*, 2010; Chamseddin *et al.*, 2012). En effet, l'application de l'HJ réprime la surexpression de ce gène chez *D. melangaster* (Chamseddin *et al.*, 2012).

L'interférence entre les hormones (20E et HJ) au cours du développement pourrait également expliquer les effets négatifs du pyriproxyfène sur la survie des adultes.

4.5. Effets du pyriproxyfène sur les taux d'ecdystéroïdes chez les pupes de D. melanogaster

Chez la drosophile, la métamorphose est associée à des augmentations significatives des titres d'ecdystéroïdes. En effet, les titres de 20E augmentent avant l'apolyse (environ 12 heures après la formation de puparium), atteignent un maximum à l'apolyse (pic de 20E le plus important 30 heures après la formation de puparium) et ce en absence totale de l'hormone juvénile (Handler, 1982; Riddiford & Truman, 1993) puis chutent à un niveau très faible voir indétectable à l'ecdysie (Walgraeve & Verhaert, 1988; Dubrovsky, 2005).

Nos résultats montrent que l'application d'un analogue de l'hormone juvénile, le pyriproxyfène, à un moment où les taux en HJ sont relativement faibles (fin du dernier stade larvaire) affecte les taux d'ecdystéroïdes avec un effet dose-dépendant. En effet, l'insecticide réduit les quantités de 20E sans affecter la tendance générale du profil hormonal. La réduction des taux en ecdystéroïdes sous l'effet des analogues de l'hormone juvénile a été rapportée chez de nombreuses espèces d'insectes. En effet, Aribi *et al.* (2006) ont mis en évidence une diminution des taux en ecdystéroïdes hémolymphatiques et pupales chez *Tenebrio molitor* traitée au pyriproxyfène. Des effets similaires ont également été enregistrés avec d'autres

analogues de l'HJ comme le méthoprène et le fénoxycarbe chez *Tribolium freemani* (Hirashima *et al.*, 1995), *Zophobas atratus* (Aribi *et al.*, 1999), *Bombyx mori* (Monconduit & Mauchamp, 1998), *Omphisa fuscidentalis* (Singtripop *et al.*, 2002), *Spodoptera litura* (Hatakoshi *et al.*, 1986) et *D. melanogaster* (Handler, 1982). Zufelato *et al.* (2000) ont rapporté une réduction et un décalage du pic d'ecdystéroïdes chez les pupes d'*Apis mellifera* traitées au pyriproxyfène.

Les effets du pyriproxyfène, observés au niveau du profil hormonal des ecdystéroïdes chez les pupes de *D. melanogaster* pourraient s'expliquer par les interactions possibles de cet analogue avec la régulation de la synthèse et/ou de la libération de la 20E. En effet, l'HJ est connue pour moduler les niveaux d'ecdystéroïdes (Riddiford, 2008). De plus, Yamanaka *et al.* (2007) ont démontré l'effet direct de l'HJ sur la glande prothoracique au cours de l'ecdystéroïdogénèse.

4.6. Effets du pyriproxyfène sur les taux en chitine du stade pupal et sur l'histologie de la cuticule

La chitine est le second polymère biologique le plus représenté dans la nature après la cellulose (Kramer & Muthukrishnan, 2005; Merzendorfer, 2006). Elle fut isolée et décrite pour la première fois en 1823 par Odier à partir de la cuticule de l'exosquelette d'un coléoptère (Desbrières, 2002). La chitine est un homopolysaccharide composé d'unités N-acétyl- β -D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques (β -1, 4) (Muthukrishnan *et al.*, 2012). Elle est similaire à celle de la cellulose, mais diffère par la présence des groupements N-acétylés sur les carbones 2 des glucoses. Absente du règne végétal, on la retrouve dans différents organismes, l'exosquelette des arthropodes, les mollusques, les œufs et les parois internes de l'intestin des nématodes, dans les membranes et spores d'une variété de microorganismes y compris les champignons et dans les diatomées (Sharp, 2013).

Chez les insectes, la chitine est le composant majeur de la cuticule (Arakane *et al.*, 2008), ainsi la croissance et le développement des insectes dépendent strictement de la capacité à remodeler les structures chitineuses (Merzendorfer & Zimoch, 2003; Zhang & Yan-Zhu, 2013). La synthèse de la chitine a lieu durant les stades embryonnaire, larvaire, pupal et adulte. Deux groupes d'enzymes interviennent principalement dans le métabolisme de la chitine chez les insectes: les CHS (Chitin Synthase) enzymes responsables de sa synthèse et

DISCUSSION

les CHI (chitinases) responsables de sa dégradation (Kramer & Muthukrishnan, 2005). Les enzymes chitinolytiques sont impliquées dans le déroulement de certaines fonctions vitales telles que les processus de morphogenèse, de développement et de digestion et participent également au remodelage des structures cuticulaires (Merzendorfer & Zimoch, 2003; Muthukrishnan *et al.*, 2012). La chitine n'étant pas synthétisée chez les plantes et les vertébrés, les mécanismes de perturbation de sa synthèse constituent un bon moyen pour la lutte contre les insectes nuisibles (Merzendorfer, 2013).

Les cuticules d'insectes sont composées d'un empilement de plusieurs couches protéiques et chitineuses. L'épicuticule, la couche la plus externe, est dépourvue de chitine mais composée d'une lipoprotéine, la cuticuline et de cire (Merzendorfer & Zimoch, 2003). L'épicuticule recouvre une épaisse procuticule, elle-même constituée d'une exocuticule rigide et d'une endocuticule principalement composées de chitine et de protéines (Anderson, 1979), laquelle repose sur les cellules tégumentaires (Jurenka, 2007). Le processus de mue est associé à de profondes modifications physiologiques et morphologiques. Avant chaque mue, les cellules tégumentaires subissent de nombreuses mitoses permettant l'accroissement de la surface corporelle. Il se produit alors un processus de décollement de l'ancienne cuticule nommé apolyse. L'épiderme se détache de la cuticule créant un espace exuvial (Jeuniaux, 1963) dans lequel sont sécrétées de l'eau et des enzymes protéasiques et chitinolytiques permettant de dégradation (acides aminés et acétylglucosamine) sont en grande partie réabsorbés par l'épiderme et recyclés pour produire la nouvelle cuticule (Kaznowski *et al.*, 1986; Reynolds & Samuels, 1996).



Figure 24. Les différentes phases du processus de mue au niveau de la cuticule (Jurenka, 2007).

Les processus de mue sont sous le contrôle d'un dispositif hormonal complexe, et dépendent notamment de deux hormones principales: les hormones juvéniles et l'ecdysone qui permettent de réguler la synthèse et la dégradation de la chitine (Takahashi *et al.*, 2002; Malausa *et al.*, 2006).

Chez *D. melanogaster*, 6 heures après la pupaison, une diminution des taux d'ecdysone est enregistrée, c'est le début de l'apolyse, les cellules imaginales et larvaires commencent à sécréter la nouvelle cuticule (Fechtel *et al.*, 1989). Approximativement 9 heures après le pupaison, les disques imaginaux deviennent visibles au niveau du thorax. 12 heures après la pupaison les taux d'ecdysone augmentent de nouveau pour induire l'éversion de la tête marquant ainsi la transition prépupe-pupe, une heure après l'éversion de la tête, les disques imaginaux s'invaginent. 24 heures après la pupaison, la cuticule pupale commence à se séparer, et environ 48 à 50 heures après la pupaison, la cuticule adulte se forme (Chihara *et al.*, 1982), cette dernière continue son processus de formation durant les deux jours qui suivent. A la fin de la métamorphose, tous les organes larvaires sont histolysés et les structures adultes formées (Gilbert, 2010).

DISCUSSION

Nos résultats montrent que chez les séries témoins, le contenu en chitine est faible au début du stade pupal, augmente à 36 heures (AFP) puis diminue de nouveau. L'augmentation des quantités en chitine est étroitement liée au pic d'ecdystéroïdes rapporté précédemment dans nos expérimentations. Il a été rapporté que l'hormone de mue (20E) est le facteur principal dans la régulation du métabolisme de la chitine en stimulant la sécrétion et l'activation des enzymes (Mezendorfer & Zimoch, 2003; Gu *et al.*, 2013). Selon Reynolds & Samuels (1996) la sécrétion et l'activation des enzymes chitinoloytiques sont clairement sous le contrôle des ecdystéroïdes.

Chez les séries traitées aux pyriproxyfène, le même profil en chitine est enregistré; cependant les quantités de chitine sont plus importantes comparativement aux séries témoins. Kimura (1973), a mis en évidence que l'activité des enzymes dans le fluide exuvial pourrait être stimulée par l'injection des ecdystéroïdes. Plus récemment, Nasr *et al.* (2010) rapportent une forte diminution de l'activité des chitinases chez les larves de *Spodoptera littoralis* suite à un traitement au pyriproxyfène ce qui pourrait également expliquer l'augmentation du contenu en chitine chez les séries traitées au cours de notre expérimentation. Par ailleurs, l'expression des gènes déterminant la production des enzymes chitinoloytiques (qui est normalement induite par les ecdystéroïdes) est supprimée par l'hormone juvénile (Cohen, 2010). En effet, l'expression des gènes déterminant la sécrétion des chitinases chez *Manduca sexta* est supprimée par une application topique d'un autre analogue de l'hormone juvénile, le fénoxycarde (Kramer *et al.*, 1993; Zen *et al.*, 1996).

L'augmentation des quantités en chitine observée au cours de nos expériences pourrait donc être expliquée d'une part, par une diminution de la mobilisation de la chitine dans la formation de la nouvelle cuticule et d'autre part, par l'inhibition de l'activité des chitinases sous l'effet de la diminution des taux d'ecdystéroïdes enregistrée au cours de nos expérimentations précédentes.

L'étude histologique réalisée sur les pupes de *D. melanogaster* indique que le pyriproxyfène affecte la sécrétion cuticulaire en entrainant une augmentation de l'épaisseur de la nouvelle cuticule et une suppression de la formation des soies au niveau de l'abdomen. Dedos & Fugo (2001) ont rapporté la stimulation de la sécrétion de la cuticule adulte chez *Bombyx mori* traitée au fénoxycarbe (JHA). L'augmentation de l'épaisseur de la cuticule enregistrée lors de nos expérimentations semble être corrélée avec l'augmentation du contenu en chitine qui représente le constituant majeur de la cuticule. De plus, il a été rapporté que

DISCUSSION

l'application de l'HJ ou de ses analogues sur les larves de dernier stade et sur les prépupes de *D. melanogaster* entraîne la formation de mosaïque pupe-adulte avec un abdomen recouvert d'une cuticule pupale transparente renfermant peu ou pas de soies (Zhou & Riddifrod, 2002). En effet, l'action *statu quo* de l'HJ sur la transformation pupe-adulte est basée sur la capacité de l'HJ à induire une réexpression des gènes broad (br) au cours de la différentiation adulte causant ainsi la formation d'une seconde cuticule pupale (Zhou & Riddifrod, 2002; Jindra *et al.*, 2013).

Broad (Br) peut à la fois activer les gènes pupales et supprimer les gènes adultes (Jindra *et al.*, 2013). Au cours de la période cruciale de la différentiation adulte, l'ecdysone en absence de l'HJ bloque l'expression des gènes Br permettant la mise en place du programme de différentiation adulte (Goodman & Granger, 2005). La présence de l'HJ ou de l'un de ses analogues (ici le pyriproxyfène) durant cette période critique peut interférer avec l'ecdysone entraînant la formation d'anomalies structurales et de l'inhibition de l'émergence adulte observées au cours de notre étude.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos expérimentations ont été menées chez les larves de dernier stade (L3) de *D. melanogaster* dans le but d'évaluer les effets d'un analogue de l'hormone juvénile, le pyriproxyfène, administré par application topique (1 μ l/larve) sur le développement et la croissance de l'insecte. Après avoir déterminé les doses d'inhibition de l'émergence adulte (DI₂₅ et DI₅₀), les effets du pyriproxyfène ont été d'abord évalués sur plusieurs paramètres de croissance et de développement de l'insecte (poids et taille des pupes et des adultes, durée de développement du stade pupal et longévité des adultes). Les effets de l'analogue de l'HJ ont ensuite été recherchés sur le profil des écdystéroïdes et ce en évaluant les quantités de 20E au cours du stade pupal. Enfin, les effets du pyriproxyfène ont été évalués sur le profil en chitine au cours du stade pupal ainsi que sur l'histologie de la cuticule.

Les essais toxicologiques révèlent que le pyriproxyfène entraîne une inhibition de l'émergence adulte qui augmente significativement en fonction de la dose. Les doses sublétales et létales (DI_{25} et DI_{50}), déterminées à partir d'une courbe dose-réponse sont respectivement de 0,108 ng et 0,29 ng.

Le pyriproxyfène affecte la croissance et le développement de l'insecte en réduisant, sans effets dose, le poids et la taille des pupes et des adultes. L'insecticide prolonge également de manière significative la durée de développement du stade pupal et ce uniquement avec la dose la plus élevée. De plus, l'insecticide réduit significativement, toujours sans effets dose, la longévité des adultes des deux sexes.

Le traitement au pyriproxyfène affecte également le profil hormonal de l'insecte en réduisant significativement les quantités des écdystéroïdes au cours du stade pupal et ce avec une relation dose-réponse.

Enfin, le pyriproxyfène augmente significativement les quantités en chitine au cours du stade pupal et affecte la structure cuticulaire en induisant la formation d'une nouvelle cuticule épaisse et dépourvue de soies.

Nos expérimentations indiquent donc que le pyriproxyfène affecte négativement l'équilibre hormonal de *D. melanogaster* causant ainsi une perturbation de plusieurs paramètres de développement et de la métamorphose. L'ensemble de ces effets négatifs peuvent être expliqués par l'interaction entre les deux hormones de développement chez la drosophile, l'hormone juvénile et la 20E. Néanmoins, la manière dont l'ecdysone interfère

avec l'HJ (pyriproxyfène) exige d'avantage une étude approfondie afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

A l'avenir il serait intéressant de compléter ce travail par:

- L'évaluation des effets du pyriproxyfène après traitement des pupes (0j) et ce afin de comparer la sensibilité de chaque stade.
- Explorer les effets de l'insecticide sur les différents paramètres de reproduction.
- Evaluer les effets de l'insecticide sur le métabolisme de la chitine (chitinases et chitine synthases).

RESUMES

Résumé

L'efficacité du pyriproxyfène, un analogue de l'hormone juvénile (JHA), a été évaluée en utilisant les larves de troisième stade de *D. melanogaster*. Différentes doses variant de 0,01 à 2 ng/larve ont été testées par application topique sur les larves, 12 h avant la formation du puparium. Les doses d'inhibition de l'émergence adulte sont respectivement de 0,108 ng et 0,29 ng pour la DI_{25} et la DI_{50} .

Dans une seconde série d'expériences, ces doses d'inhibitions (DI_{25} et DI_{50}) ont été évaluées sur la croissance (poids et taille) des pupes et des adultes des deux sexes, la durée de développement du stade pupal et la longévité des adultes. Les résultats révèlent que l'insecticide entraîne une réduction significative du poids et de la taille des pupes et des adultes et prolonge la durée de développement du stade pupal. Une réduction de la longévité des adultes est également notée.

De plus, le dosage enzymo-immunologique des écdystéroïdes dans les extraits des pupes montre que le pyriproxyfène (DI_{25} et DI_{50}) réduit significativement le taux de 20 hydroxyecdysone avec un effet dose-dépendant et ce comparativement aux témoins.

Enfin, l'insecticide augmente significativement le contenu en chitine uniquement avec la dose la plus élevée et engendre la formation d'une nouvelle cuticule plus épaisse et dépourvue de soies.

Ainsi, l'application topique du pyriproxyfène sur les larves de dernier stade interfère avec l'hormone de mue et perturbe le développement de l'insecte.

Mots clés: Pyriproxyfène, *D. melanogaster*, toxicité, croissance, développement ecdystéroïdes, cuticule, chitine.

Abstract

The efficacy of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog (JHA), was evaluated using third instar larvae of *Drosophila melanogaster*. Various doses of the insecticide, ranging from 0.01 to 2 ng/larva, were applied topically to larvae (12 h before pupariation). The doses that inhibit adult emergence (ID) were 0.108 ng and 0.29 ng respectively for ID_{25} and ID_{50} . In a second series of experiments, these ID were evaluated on the growth (weight and size) of pupa and adults of both sex, duration of the pupal instars and longevity. Results showed that insecticide decreased significantly the pupal and adults weight and size. Pyriproxyfen treatment increased also the duration of pupal development and decreased the adults' longevity.

In addition, Enzyme immunoassay measurements of ecdysteroids in extracts of pupae indicated that pyriproxyfen (DI_{25} and DI_{50}) decreased significantly the ecdysteroid titer in a dose-dependent manner as compared to controls.

Finally, the insecticide increases significantly the chitin content only with the highest dose and disrupt the cuticle formation resulting in an increase of the thickness of the new adult cuticle and suppression of bristles formation. Thus, a topical application of pyriproxyfen to third instar larvae interfered with the molting hormone and disrupted the normal development of this insect.

Key words: Pyriproxyfen, *D. melanogaster*, toxicity, growth, development ecdysteroids, cuticle, chitin.

الملخص

تم تقييم فعالية pyriproxyfène، مماثل هرمون الشباب (JHA)، وذلك باستخدام يرقات الطور الثالث من ذبابة الفاكهة Drosophila melanogaster. جرعات مختلفة أستعملت، تتراوح بين 0.1 - 2 ng/ يرقة، تم تطبيقها موضعيا على يرقات (12 ساعة قبل pupariation). وكانت الجرعات التي تمنع ظهور الكبار ل ID₂₅ و ID₅₀ هي ng 0.108 و ng 0.29 على التوالي. في السلسلة الثانية من التجارب، تم تقييم هذه الجرعات على نمو (الوزن والحجم) الشرنقة والكبار للجنسين على حد سواء، مدة تطور الشرنقة وطول العمر للكبار. أظهرت النتائج أن pyriproxyfène يقلص بشكل ملحوظ وزن وحجم الشرنقة والكبار و يمدد أيضا مدة نمو الشرنقة. لوحظ أيضا تقلص مدة نمو الكبار.

في جزء آخر من التجربة، تم قياس محتوى هرمون النمو écdystéroïdes و كمية الكيتين chitine في الشرائق بعد تطبيق écdystéroïdes و كمية الكيتين chitine في في بعد تطبيق ecdystéroïdes (DI₂₅ et DI₅₀) pyriproxyfène). الفحص الإنزيمو ايمينولوجي لمحتوى هرمون النمو écdystéroïdes في الشرائق بين أن pyriproxyfène يخفض بشكل ملموس نسبة هرمون النمو وبالإضافة إلى ذلك، المبيد يزيد بشكل كبير من كمية الكيتين chitine فقط مع الجرعة الكبيرة.

وأخيرا، تم دراسة تأثير pyriproxyfène على بشرة الشرانق بدراسة تشريحية، حيث أظهرت النتائج أن المركب يرفع بشكل ملموس سمك البشرة ويمنع تشكل الشعيرات عليها.

وبهذا فإن التطبيق الموضعي ل pyriproxyfène على يرقات الطور الثالث يتفاعل مع الهورمونات ويعطل النمو الطبيعي لهذه الحشرة.

الكلمات المفتاحية: D. melanogaster ، Pyriproxyfène، السمية، النمو، التطور، ecdystéroïdes، Cuticule، Chitine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267.
- Alizadeh, M., Karimzadeh, J., Rassoulian, G. R., Farazmand, H., Hoseini-Naveh, V., & Pourian, H. R. (2012). Sublethal effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue, on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): life table study. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(14), 1741-1763.
- Al-Sarar, A. S., Al-Hafiz, A. M., Bakr, Y. A., Bayoumi, A. E., & Hussein, H. I. (2011). Effects of space spray application methods on fenitrothion efficacy and development of resistance in *Culex pipiens*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(2), 129-134.
- Andersen, S. O. (1979). Biochemistry of insect cuticle. *Annual review of entomology*, 24(1), 29-59.
- Arakane, Y., Specht, C. A., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., & Beeman, R. W. (2008). Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(10), 959-962.
- Aribi, N. (1997). L'entrée en métamorphose chez Zophohas atratus (Coleoptera: Tenebrionidae): Analyse des ecdystéroïdes; effets de l'isolement (groupement); effets de régulateurs de croissance et étude des sources hormonales (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Université d'Annaba, Algérie).
- Aribi, N., Quennedey, A., Soltani, N., & Delbeque, J. P. (1999). L'initiation de la métamorphose chez Zophobas atratus Fab.: Effets des ligatures et des régulateurs de croissance (Coleoptera: Tenebrionidae). Annales de la Société entomologique de France, 35, 59-64.
- Aribi, N., Lakbar, S., Smagghe, G., & Soltani, N. (2000). Comparative action of RH-0345 and pyriproxyfen on molting hormone production and protein analysis in mealworm pupae. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen), 66(2a), 445-454.
- Aribi, N., Smagghe, G., Lakbar, S., Soltani-Mazouni, N., & Soltani, N. (2006). Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(1), 55-62.
- Ashburner, M. (1970). Effects of juvenile hormone on adult differentiation of *Drosophila* melanogaster. Nature, 227, 187-189
- Ashburner, M., & Thompson, J. N. (1978). The laboratory culture of Drosophila In: *The* genetics and biology of Drosophila.(Eds. Ashburner M, Wright TRF). Academic Press, 24, 1-81.
- Ashburner, M., & Bergman, C. M. (2005). *Drosophila melanogaster*: a case study of a model genomic sequence and its consequences. *Genome Research*, 15(12), 1661-1667.

- Ashok, M., Turner, C., & Wilson, T. G. (1998). Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2761-2766.
- Baehrecke, E. H. (2000). Steroid regulation of programmed cell death during Drosophila development. *Cell Death & Differentiation*, 7(11).
- Bainbridge, S. P., & Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of Drosophila melanogaster. Development, 66(1), 57-80.
- Baltaev, U. A., & Shangaraeva, G. S. (2000). Zooecdysteroids: Distribution and Role in Arthropod Life Cycles. *Chemistry of Natural Compounds*, *36*(6), 543-559.
- Bauer, J., Antosh, M., Chang, C., Schorl, C., Kolli, S., Neretti, N., & Helfand, S. L. (2010). Comparative transcriptional profiling identifies takeout as a gene that regulates life span. Aging, 2(5), 298-310.
- Bellés, X., & Maestro, J. L. (2005). Endocrine peptides and insect reproduction. *Invertebrate* reproduction & development, 47(1), 23-37.
- Berghiche, H., Smagghe, G., & Soltani, N. (2003). In vitro effects of RH-0345 and KK-42 on ecdysteroid levels and cuticle synthesis by pupal integument of mealworms. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 68(1), 41-46.
- Berghiche, H., Houamria, M., Van de Velde, S., Soltani, N., & Smagghe, G. (2008). Effect of two insect growth regulators on the ecdysteroid contents in eggs of the mealworm. *Belgian Journal of Zoology*, 138(2), 140-145.
- Bitsch, C., Delbecque, J. P., Mathelin, J., & Bitsch, J. (1986). Effects of precocene on intermoult length and ecdysteroid titres in relation to ovarian maturation in *Thermobia domestica* (Thysanura: Lepismatidae). *Journal of insect physiology*, *32*(6), 535-541.
- Boina, D. R., Rogers, M. E., Wang, N., & Stelinski, L. L. (2009). Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri Kuwayama*. *Pest management science*, *66*(4), 349-357.
- Bouhsira, E., Lienard, E., Jacquiet, P., Warin, S., Kaltsatos, V., Baduel, L., & Franc, M. (2012). Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (Ctenocephalides felis felis) from cats to dogs. *Veterinary parasitology*, 190(3), 541-546.
- Brooks, G. T., & McCaffery, A. R. (1990). The precocene antijuvenile hormones (allatotoxins): a case history in insect toxicology. In: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones* (Eds. A. R. McCaffery, I. D. Wilson). Springer, 33-42.

Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2006). Biologie. 1. vyd. Brno.

- Cassier, P., Laffont, R., Porchet, M. D., & Soyez, D. (1997). La reproduction des invertébrés: stratégies, modalités et régulation: intérêt fondamental et appliqué. (Eds.). *Masson*, 354 p.
- Chamseddin, K. H., Khan, S. Q., Nguyen, M. L., Antosh, M., Morris, S. N. S., Kolli, S., Nerettid, N., Helfandd. S., & Bauer, J. H. (2012). takeout-dependent longevity is associated with altered Juvenile Hormone signaling. *Mechanisms of ageing and development*, 133(11), 637-646.
- Chang, E. S., Bruce, M. J., & Tamone, S. L. (1993). Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. *American Zoologist*, 33(3), 324-329.
- Charles, J. P., Iwema, T., Epa, V. C., Takaki, K., Rynes, J., & Jindra, M. (2011). Ligandbinding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52), 21128-21133.
- Chen, L., Zhu, J., Sun, G., & Raikhel, A. (2004). The early gene Broad is involved in theecdysteroïdes hierarchi governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33, 743-761.
- Chen, Y. W., Wu, P. S., Yang, E. C., Nai, Y. S., & Huang, Z. Y. (2016). The impact of pyriproxyfen on the development of honey bee (*Apis mellifera* L.) colony in field. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(3), 589-594.
- Cheng, D., Peng, J., Meng, M., Wei, L., Kang, L., Qian, W., & Xia, Q. (2014). Microarray Analysis of the Juvenile Hormone Response in Larval Integument of the Silkworm, *Bombyx mori. International journal of genomics*, 2014, 15.
- Chihara, C. J., Silvert, D. J., & Fristrom, J. W. (1982). The cuticle proteins of *Drosophila* melanogaster: stage specificity. *Developmental biology*, 89(2), 379-388.
- Cohen, E. (2010). Chitin biochemistry: Synthesis, hydrolysis and inhibition. Advances in Insect Physiology, 38, 5-74.
- Cranna, N., & Quinn, L. (2009). Impact of steroid hormone signals on Drosophila cell cycle during development. *Cell division*, 4(1), 1.
- Dalton, R. (2010). What's in a name? Fly world is abuzz, Nature, 464.
- Darvas, B., Kuwano, E., Etq, M., Tag el-din, M. H., & Timár, T. (1990). Effects of some anti-juvenile hormone agents (Precocene-2, J-2710, KK-110) on postembryonic development of *Neobellieria bullata*. *Agricultural and biological chemistry*, 54(11), 3045-3047.
- Dedos, S. G., & Fugo, H. (2001). Acceleration of pupal-adult development by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori. Zoological Science*, *18*(6), 771-777.
- De Loof, A., Vandersmissen, T., Marchal, E., & Schoofs, L. (2015). Initiation of metamorphosis and control of ecdysteroid biosynthesis in insects: The interplay of absence of Juvenile hormone, PTTH, and Ca 2+-homeostasis. *Peptides*, 68, 120-129.

- **De Reggi, M., Pitoizet, N., Gharib, B., & Delbecque, J. P. (1992).** New enzyme immunoassay for ecdysteroids using peroxydase enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies. In: *Xth ecdysone workshop. Liverpool, 91.*
- Desbrières, J. (2002). Chitine et chitosane. L'actualité chimique, (11-12), 39-44.
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., & Le, D. P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual review of entomology*, 43(1), 545-569.
- Dhadialla, T. S., Retnakaran A., & Smagghe G. (2005). Insect growth and development disrupting insecticides.In: Comprehensive Insect Molecular Science (Eds. L. I. Gilbert, I. Kostas, S. S. Gill). Elsevier, 6, 55-115.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A., & Smagghe, G. (2010). Insect growth- and development disrupting insecticides. In: *Insect Control* (Eds. L. I. Gilbert, S. S. Gill). *Elsevier*, 121–184.
- Dinan, L. (2001). Phytoecdysteroids: biological aspects. Phytochemistry, 57(3), 325-339.
- **Dubrovsky, E. B. (2005).** Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology & Metabolism, 16*(1), 6-11.
- **Dudley, R. (2002).** The biomechanics of insect flight: form, function, evolution. (Ed.). *Princeton University Press*, 476 p.
- **Dukas, R. 2008.** Evolutionary biology of insect learning. *Annual Review of Entomology 53*, 145-160
- Edgar, B. A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nature Reviews Genetics*, 7(12), 907-916.
- Elbert, A., & Nauen, R. (2000). Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Management Science*, 56(1), 60-64.
- Erler, F., Polat, E., Demir, H., Catal, M., & Tuna, G. (2011). Control of mushroom sciarid fly *Lycoriella ingenua* populations with insect growth regulators applied by soil drench. *Journal of economic entomology*, 104(3), 839-844.
- Estrada, J. G., & Mulla, M. S. (1986). Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. *Journal of the American Mosquito Control* Association, 2(1), 57-60.
- Farnesi, L. C., Brito, J. M., Linss, J. G., Pelajo-Machado, M., Valle, D., & Rezende, G. L. (2012). Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. *PLoS One*, 7(1), e30363.
- Fechtel, K., Fristrom, D. K., & Fristrom, J. W. (1989). Prepupal differentiation in Drosophila: distinct cell types elaborate a shared structure, the pupal cuticle, but accumulate transcripts in unique patterns. *Development*, 106(4), 649-656.

- Fisher, R. A., & Yates, F. (1957). Statistical tables for biological, agricultural and medical research. *.5ème edition, Olivirer et Boyd. London. 64-66.*
- Flatt, T., & Kawecki, T. J. (2007). Juvenile hormone as a regulator of the trade-off between reproduction and life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, *61*(8), 1980-1991.
- **Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., Pinchai, N., Perfect, B. Z., Alspaugh, J. A., Perfect, J. R., & Steinbach, W. J. (2009).** Differential effects of inhibiting chitin and 1, 3-β-D-glucan synthesis in ras and calcineurin mutants of *Aspergillus fumigatus. Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 476-482.
- Fougeron, A. S. (2011). Réponses comportementales et préférences envers les acides gras à longue chaîne chez *Drosophila melanogaster* (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).
- Gäde, G., Hoffmann, K. H., & Spring, J. H. (1997). Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews*, 77(4), 963-1032.
- Gäde, G. (2002). Allatoregulatory peptides—molecules with multiple functions. *Invertebrate reproduction & development*, *41*(1-3), 127-135.
- Gäde, G., & Hoffmann, K. H. (2005). Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiological Entomology*, 30(2), 103-121.
- Gadenne, C., Grenier, S., Plantevin, G., & Mauchamp, B. (1990). Effects of a juvenile hormone mimetic, fenoxycarb, on post-embryonic development of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hbn. *Experientia*, 46(7), 744-747.
- Ganter, G. K., Walton, K. L., Merriman, J. O., Salmon, M. V., Brooks, K. M., Maddula, S., & Kravitz, E. A. (2007). Increased male-male courtship in ecdysone receptor deficient adult flies. *Behavior genetics*, 37(3), 507-512.
- Ghasemi, A., Sendi, J., & Ghadamyari, M. (2010). Physiological and biochemical effect of pyriproxyfen on Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner)(Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection Research*, 50(4), 416-422.
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R., & Warren, J. T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual review of entomology*, 47(1), 883-916.
- Gilbert, S. F., & Epel, D. (2009). Ecological developmental biology: integrating epigenetics, medicine, and evolution. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 82(4), 231–232.
- Gilbert, S. F. (2010). Developmental biology. Ninth edition. (Ed.). Sinauer Associates, 711 p.
- Gilbert, E. H., Kwak, S. J., Chen, R., & Mardon, G. (2013). Drosophila signal peptidase complex member Spase12 is required for development and cell differentiation. *PloS* one, 8(4), e60908.
- Goodman, W. G., & Granger, N. A. (2005). The Juvenile Hormones. In: Comprehensive Molecular Insect Science (Eds. L. I. Gilbert, I. Kostas, S. S. Gill). Elsevier, 3, 319-408.

- Gorman, K., Hewitt, F., Denholm, I., & Devine, G. J. (2002). New developments in insecticide resistance in the glasshouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) and the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) in the UK. *Pest management science*, 58(2), 123-130.
- Gruntenko, N., & Rauschenbach, I. (2009). 20-hydroxyecdysone, juvenile hormone andbiogenic amines: Mechanisms of interaction in control of Drosophila reproduction under normal and stressful conditions. In: *Ecdysone: Structures and Functions* (Ed. G. Smagghe). *Springer*, 317–332.
- Gu, J., Huang, L. X., Gong, Y. J., Zheng, S. C., Liu, L., Huang, L. H., & Feng, Q. L. (2013). De novo characterization of transcriptome and gene expression dynamics in epidermis during the larval-pupal metamorphosis of common cutworm. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(9), 794-808.
- Hamaidia, K., & Soltani, N. (2014). Laboratory evaluation of a biorational insecticide, kinoprene, against *Culex pipiens* larvae: Effects on growth and development. *Annual Research & Review in Biology*, 4(14), 2263–2273.
- Handler, A. M. (1982). Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila* melanogaster. Developmental biology, 93(1), 73-82.
- Harburguer, L., Beltrán, G., Goldberg, L., Goldberg, L., Zerba, E., Licastro, S., & Masuh, H. (2011). A new strategy for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control with community participation using a new fumigant formulation. *Journal of medical entomology*, 48(3), 577-583.
- Harshman, L. G., Loeb, A. M., & Johnson, B. A. (1999). Ecdysteroid titers in mated and unmated *Drosophila melanogaster* females. *Journal of insect physiology*, 45(6), 571-577.
- Harshman, L. G., Song, K. D., Casas, J., Schuurmans, A., Kuwano, E., Kachman, S. D., & Hammock, B. D. (2010). Bioassays of compounds with potential juvenoid activity on *Drosophila melanogaster*: Juvenile hormone III, bisepoxide juvenile hormone III and methyl farnesoates. *Journal of insect physiology*, 56(10), 1465-1470.
- Hatakoshi, M., Agui, N., & Nakayama, I. (1986). 2-(1-Methyl-2-(4-phenoxyphenoxy) ethoxy) pyridine as a new insect juvenile hormone analogue: induction of supernumerary larvae in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 21(2), 351-353.
- Hatakoshi, M. (2012). Pyriproxyfen: a new juvenoid. In: *Modern Crop Compound. 2nd ed* (Eds. W. Kramer, U. Schirmer, P. Jeschke, M. Witschel). *Wiley-VCH, Weinheim*, 963-998.
- Hirashima, A., Takeya, R., Taniguchi, E., & Eto, M. (1995). Metamorphosis, activity of juvenile-hormone esterase and alteration of ecdysteroid titres: Effects of larval density and various stress on the red flour beetle, *Tribolium freemani* Hinton (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of insect physiology*, 41(5), 383-388.

- Hiruma, K., & Kaneko, Y. (2013). Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 103, 73-100.
- Hoffmann, K. H., & Lorenz, M. W. (1998). Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica*, 26(4), 323-330.
- Hoffmann, K. H., Meyerinng-Vos, M., & Lorenz, M. W. (1999). Allatostatins and allatotropins: Is the regulation of corpora allata activity their primary function?. *European Journal of Entomology*, *96*, 255-266.
- Iga, M., & Smagghe, G. (2010). Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Peptides*, *31*(3), 456-467.
- Ishaaya I., 1990. Benzoylphenyl ureas and other selective control agents-mechanism and application. In: *Pesticides and alternatives* (Ed. J. E. Casida). *Elsevier*, 363-376.
- Ishaaya, I., & Horowitz, A. R. (1992). Novel phenoxy juvenile hormone analog (pyriproxyfen) suppresses embryogenesis and adult emergence of sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 85(6), 2113-2117.
- Ishaaya, I., De Cock, A., & Degheele, D. (1994). Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 87(5), 1185-1189.
- Ishaaya I., 2001. Biochemical processes related to insecticide action: An overview. In: Biochemical sites of insecticides action and resistance (Ed. I. Ishaaya). Springer, 1-16.
- Jeuniaux, C. (1963). Chitine et chitinolyse: un chapitre de la biologie moléculaire. (Ed.). Masson. 181 p.
- Jindra, M., Palli, S. R., & Riddiford, L. M. (2013). The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual review of entomology*, 58, 181-204.
- Jones, G., & Sharp, P. A. (1997). Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13499-13503.
- Jones, G., Jones, D., Teal, P., Sapa, A., & Wozniak, M. (2006). The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand. *Febs journal*, 273(21), 4983-4996.
- Jurenka, R. (2007). Insect physiology. In: *Encyclopedia of Science & Technology* (Ed. S. Parker). *McGraw-Hill Companie*, *l*, *9*, 323.
- Kadono-Okuda, K. E. I. K. O., Kuwano, E., Eto, M., & Yamashita, O. (1987). Inhibitory action of an imidazole compound on ecdysone synthesis in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori. Development, growth & differentiation*, 29(5), 527-533.
- Karr, L. L., Sheets, J. J., King, J. E., & Dripps, J. E. (2004). Laboratory performance and pharmacokinetics of the benzoylphenylurea noviflumuron in eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of economic entomology*, 97(2), 593-600.

- Kavallieratos, N. G., Athanassiou, C. G., Vayias, B. J., & Tomanović, Ž. (2012). Efficacy of insect growth regulators as grain protectants against two stored-product pests in wheat and maize. *Journal of Food Protection*®, 75(5), 942-950.
- Kawada, H., Kojima, I., & Shinjo, G. (1989). Laboratory evaluation of a new insect growth regulator pyriproxyfen, as a cockroach control agent. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 40, 195-201.
- Kaznowski, C. E., Schneiderman, H. A., & Bryant, P. J. (1986). The incorporation of precursors into Drosophila larval cuticle. *Journal of insect physiology*, 32(2), 133137-135142.
- Kiguchi, K., Mori, T., & Akai, H. (1984). Effects of anti-juvenile hormone "ETB" on the development and metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori. Journal of insect physiology*, *30*(6), 499-506.
- Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J. P., Smagghe, G., & Soltani, N. (2009). Halofenozide affects sexual behaviour, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Belgian Journal of Zoology*, 139(2), 147-155.
- Kilani-Morakchi, S., Badi, A., Aribi, N., Farine, J. P., & Soltani, N. (2014). Toxicity of tebufenozide, an ecdysteroid agonist, to *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *African Entomology*, 22(2), 337-342.
- Kimura, S. (1973). The control of chitinase activity by ecdysterone in larvae of Bombyx mori. *Journal of Insect Physiology*, 19(1), 115-123.
- Koehler, P. G., & Patterson, R. S. (1991). Incorporation of pyriproxyfen in a German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) management program. *Journal of economic entomology*, 84(3), 917-921.
- Kokoza, V. A., Martin, D., Mienaltowski, M. J., Ahmed, A., Morton, C. M., & Raikhel,
 A. S. (2001). Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene*, 274(1), 47-65.
- Kozlova, T., & Thummel, C. S. (2000). Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in Drosophila. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(7), 276-280.
- Kozlova, T., & Thummel, C. S. (2003). Essential roles for ecdysone signaling during Drosophila mid-embryonic development. *Science*, *301*(5641), 1911-1914.
- Kramer, K. J., Corpuz, L., Choi, H. K., & Muthukrishnan, S. (1993). Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca* sexta. Insect biochemistry and molecular biology, 23(6), 691-701.
- Kramer K. J., & Muthukrishnan S. (2005). Chitin metabolism in insects: a revisit. In: Comprehensive Insect Molecular Science (Eds. L. I. Gilbert, K. Kostas, S. S. Gill). Elsevier, 4, 111-144.

Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J.T., & Rees, H. (2005). Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: *Comprehensive Insect Molecular Science* (Eds. L. I. Gilbert, K. Kostas, S. S. Gill). *Elsevier*, *3*, 125-195.

Lehmann, P. F., & White, L. O. (1975). Chitin Assay Used to Demonstrate Renal Localization and Cortisone-Enhanced Growth of *Aspergillus fumigates* Mycelium in Mice. — *Infection and Immunty, 12,* 987–992.

- Linford, N. J., Bilgir, C., Ro, J., & Pletcher, S. D. (2013). Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. Journal of Visualized Experiments, (71), e50068-e50068.
- Liu, T. X. (2003). Effects of a juvenile hormone analog, pyriproxyfen, on *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Pest management science*, 59(8), 904-912.
- Lorenz, J., Lenz, M., & Hoffmann, K. H. (1995). Effects of pharmacological agents on ecdysteroid synthesis in vitro in ovaries and abdominal integument from female adult crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 50(3-4), 286-293.
- Ludwig, S. W., & Oetting, R. D. (2001). Evaluation of medium treatments for management of *Frankliniella occidentalis* (Thripidae: Thysanoptera) and *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae). *Pest management science*, 57(12), 1114-1118.
- Luo, Y., Amin, Jahanshah., & Voellmy, R. (1991). Ecdysterone receptor is a sequencespecific transcription factor involved in the developmental regulation of heat shock genes. *Molecular and cellular biology*, 11(7), 3660-3675.
- Maiza, A., Kilani, S., Farine, J. P., Smagghe, G., Aribi, N., & Soltani, N. (2004). Reproductive effects in German cockroaches by ecdysteroid agonist RH-0345, juvenile hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69(3), 257-66.
- Malausa, T., Salles, M., Marquet, V., Guillemaud, T., Alla, S., Marion-Poll, F., & Lapchin, L. (2006). Within-species variability of the response to 20-hydroxyecdysone in peach-potato aphid (*Myzus persicae Sulzer*). Journal of insect physiology, 52(5), 480-486.
- Marchal, E., Vandersmissen, H. P., Badisco, L., Van de Velde, S., Verlinden, H., Iga, M., Wielendaelea, P. V., Huybrechtsa, R., Simoneta, G., Smaggheb, G., & Broeck, J. V. (2010). Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: a review. *Peptides*, 31(3), 506-519.
- Markow, T. A., & O'Grady, P. (2005). Drosophila: a guide to species identification and use. (Eds.). *Elsevier*, 272 p.
- Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. (Eds.). *Masson*, 345 p.
- Masner P., Bowers S., Kâlin M., & Mûhlet T., 1979. Effect of precocen I on the endocrine regulation of development and reproduction in the rol of juvenile hormone. *Physiological Entomology Journal*, 20, 59-65.

- Mbare, O., Lindsay, S. W., & Fillinger, U. (2013). Dose-response tests and semi-field evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv® 0.5 G) for the control of the malaria vectors Anopheles gambiae sensu lato. *Malaria journal*, 12(1), 1.
- McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J. P., Beckstead, R. B., Warren, J. T., & O'Connor, M. B. (2007). Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in Drosophila. *Developmental cell*, 13(6), 857-871
- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4393-4412.
- Merzendorfer, H. (2006). Insect chitin synthases: a review. Journal of Comparative Physiology B, 176(1), 1-15.
- Merzendorfer, H. (2013). Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect science*, 20(2), 121-138.
- Minakuchi, C., & Riddiford, L. M. (2006). Insect juvenile hormone action as a potential target of pest management. *Journal of Pesticide Science*, 31(2), 77-84.
- Miranda, J. E., Bortoli, S. A. D., & Takahashi, R. (2002). Development and silk production by silkworm larvae after topical application of methoprene. *Scientia Agricola*, 59(3), 585-588.
- Mirth, C. K., & Riddiford, L. M. (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays*, 29(4), 344-355.
- Mirth, C. K., & Shingleton, A. W. (2012). Integrating body and organ size in Drosophila: recent advances and outstanding problems. *Frontiers in endocrinology*, *3*, 49.
- Miura, K., Oda, M., Makita, S., & Chinzei, Y. (2005). Characterization of the Drosophila Methoprene-tolerant gene product. *Febs Journal*, 272(5), 1169-1178.
- Miyamoto J., Hirano M., Takimoto Y., & Hatakoshi M. (1993). Insect growth regulators for pest control, with emphasis on juvenile hormone analogs: Present status and future prosrects. In: *Pest Control with Enhanced Environmental Safety* (Eds. S.O. Duke, J.J. Menn, J.R. Plimmer). *American Chemical Society Symp*, 144–168.
- Moadeli, T., Hejazi, M. J., & Golmohammadi, G. (2014). Lethal Effects of Pyriproxyfen, Spinosad, and Indoxacarb and Sublethal Effects of Pyriproxyfen on the 1st Instars Larvae of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in the Laboratory. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *16*(6), 1217-1227.
- Monconduit, H., & Mauchamp, B. (1998). Effects of ultralow doses of fenoxycarb on juvenile hormone-regulated physiological parameters in the silkworm, *Bombyx mori* L. Archives of insect biochemistry and physiology, 37(2), 178-189.
- Moras, D., & Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current opinion in cell biology*, 10(3), 384-391.

- Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y., & Kramer, K. J. (2012). 7 Chitin Metabolism in Insects. In: *Insect molecular biology and biochemistry* (Ed. L. Gilbert). *Elsevier*, 193-225.
- Nasr, H. M., Badawy, M. E., & Rabea, E. I. (2010). Toxicity and biochemical study of two insect growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen, on cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *98*(2), 198-205.
- Nijhout H. F. (1994). Insect Hormones. (Ed.). Princeton University Press, 280 p.
- Nijhout, H. F., Riddiford, L. M., Mirth, C., Shingleton, A. W., Suzuki, Y., & Callier, V. (2014). The developmental control of size in insects. *Wiley Interdisciplinary Reviews:* Developmental Biology, 3(1), 113-134.
- O'Grady, P. M., & Markow, T. A. (2009). Phylogenetic taxonomy in Drosophila: problems and prospects. *Fly*, 3(1), 10-14.
- Ogihara, M. H., Hikiba, J., Iga, M., & Kataoka, H. (2015). Negative regulation of juvenile hormone analog for ecdysteroidogenic enzymes. *Journal of insect physiology*, 80, 42-47.
- Ohashi, K., Nakada, K., Ishiwatari, T., Shono, Y., Lucas, J. R., & Mito, N. (2012). Efficacy of pyriproxyfen-treated nets in sterilizing and shortening the longevity of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 49(5), 1052-1058.
- Ohba, S. Y., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., & Takagi, M. (2013). The effect of pyriproxyfen as a "population growth regulator" against *Aedes* albopictus under semi-field conditions. *PLoS One*, 8(7), e67045.
- Ono, H., Rewitz, K. F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J. T., Marqués, T., Shimell, J. T., Gilbert, L. I., & O'Connor, M. B. (2006). Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental biology*, 298(2), 555-570.
- **Ono, H. (2014).** Ecdysone differentially regulates metamorphic timing relative to 20hydroxyecdysone by antagonizing juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 391(1), 32-42.
- Ou, Q., Zeng, J., Yamanaka, N., Brakken-Thal, C., O'Connor, M. B., & King-Jones, K. (2016). The insect prothoracic gland as a model for steroid hormone biosynthesis and regulation. *Cell Reports*, 16(1), 247-262.
- Palli, S. R. (2009). Recent advances in the mode of action of juvenile hormones and their analogs. In: *Biorational Control of Arthropod Pests* (Eds. I. Ishaaya, A.R. Horowitz). *Springer*, 111-129.

- Panagopoulos, D. J. (2012). Gametogenesis, embryonic and postembryonic development of Drosophila melanogaster, as a model system for the assessment of radiation and environmental genotoxicity. In: Drosophila melanogaster, lifecycle, genetics (Ed. S. Barth). Nova Science Publishers, 1-38.
- **Panchout, F. (2007).** Physiologie des insectes le développement, le monde des insectes (Consulté le 30/11/2016) (https://www.insecte.org/spip.php?article31).
- Parvathi D. V., Amritha A. S., & Paul S. (2009). Wonder animal model for genetic studies
 Drosophila melanogaster its life cycle and breeding methods a review. Sri Ramachandra Journal of Medicine, 33.
- Pener, M. P., & Dhadialla, T. S. (2012). An overview of insect growth disruptors; applied aspects. *Advances in Insect Physiology*, 43, 1-162.
- Petryk, A., Warren, J. T., Marqués, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., & O'Connor, M. B. (2003). Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13773-13778.
- Porcheron, P., Moriniere, M., Grassi, J., & Pradelles, P. (1989). Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochemistry*, 19(2), 117-122.
- Pursley, S., Ashok, M., & Wilson, T. G. (2000). Intracellular localization and tissue specificity of the Methoprene-tolerant (Met) gene product in *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 30(8), 839-845.
- Quennedey, A., Aribi, N., Everaerts, C., & Delbecque, J. P. (1995). Postembryonic development of Zophobas atratus Fab.(Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. *Journal of Insect Physiology*, 41(2), 143-152.
- Quinn, L., Lin, J., Lee, J. E. A., Mitchell, N., Cranna, N., & Hannan, R. (2012). Steroid hormones in Drosophila: How ecdysone coordinates developmental signalling with cell growth and division. In: *Steroids - Basic Science* (Ed. H Abduljabbar). *Intech, 8*, 141-168.
- Radyuk, S. N., Klichko, V. I., & Orr, W. C. (2000). Catalase expression in *Drosophila* melanogaster is responsive to ecdysone and exhibits both transcriptional and post-transcriptional regulation. Archives of insect biochemistry and physiology, 45(2), 79-93.
- Raikhel, A.S., Brown, M. R., & Belles, X. (2005). Hormonal control of reproductive processes In: *Comprehensive Insect Molecular Science* (Eds. L. I. Gilbert, I. Kostas, S. S. Gill). *Elsevier*, 3, 433–491.
- Ramaseshadri, P., Farkaš, R., & Palli, R. S. (2012). 5 Recent Progress in Juvenile Hormone Analogs (JHA) Research. *Advances in insect physiology*, 43, 353-436

- Rewitz, K. F., Yamanaka, N., & O'Connor, M. B. (2013). Developmental checkpoints and feedback circuits time insect maturation. *Current topics in developmental biology*, 103, 1.
- Reynolds, S. E., & Samuels, R. I. (1996). Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Advances in insect physiology*, *26*, 157-232.
- Riddiford, L. M., & Ashburner, M. (1991). Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *General and comparative endocrinology*, 82(2), 172-183.
- Riddiford, L. M., & Truman, J. W. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *American Zoologist*, 33(3), 340-347.
- Riddiford, L. M. (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in insect physiology*, 24, 213-274.
- Riddiford L. M. (1996). Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In: *Metamorphosis: Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells* (Eds. L.I. Gilbert, J.R. Tata, B.G. Atkinson). *Academic Press*, 223–251.
- Riddiford, L. M., Cherbas, P., & Truman, J. W. (2000). Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitamins & Hormones*, 60, 1-73.
- Riddiford, L. M., Hiruma, K., Zhou, X., & Nelson, C. A. (2003). Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from Manduca sexta and Drosophila melanogaster. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(12), 1327-1338.
- Riddiford, L. M. (2008). Juvenile hormone action: a 2007 perspective. Journal of insect physiology, 54(6), 895-901.
- Riddiford, L. M., Truman, J. W., Mirth, C. K., & Shen, Y. C. (2010). A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 137(7), 1117-1126.
- Sazo L., Araya J.E., & Esparza S. (2008). Control of San Jose scale nymphs, Diaspidiotus perniciosus (Comstock), on almond and apple orchards with pyriproxyfen, phenoxycarb, chlorpyrifos, and mineral oil. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 68, 284–289.
- Schal, C., & Chiang, A. S. (1995). Hormonal control of sexual receptivity in cockroaches. *Experientia*, 51(9-10), 994-998.
- Sharp, R. G. (2013). A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy*, 3(4), 757-793.

- Sheets, J. J., Karr, L. L., & Dripps, J. E. (2000). Kinetics of uptake, clearance, transfer, and metabolism of hexaflumuron by eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of economic entomology*, 93(3), 871-877.
- Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-Rios, W., Stancil, J. D., Lopez-Sifuentes, V., Vidal-Ore, C., & Devine, G. J. (2005). Potential use of pyriproxyfen for control of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. Journal of Medical Entomology, 42(4), 620-630.
- Simon, A. F., Shih, C., Mack, A., & Benzer, S. (2003). Steroid control of longevity in Drosophila melanogaster. Science, 299(5611), 1407-1410.
- Singh, S., & Kumar, K. (2011). Effect of the juvenile hormone agonist pyriproxyfen on larval and pupal development of the citrus swallowtail *Papilio demoleus* (Lepidoptera: Papilionidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 31(03), 192-198.
- Singh, A., & Tiwari, S. K. (2014). Biological Activity of Fenoxycarb, a Juvenile Hormone Analogue on Rice Moth, *Corcyra cephalonica* Staint.(Lepidoptera: Pyralidae). World Applied Sciences Journal, 31(3), 376-382.
- Singh, S., & Kumar, K. (2015). Effects of juvenoid pyriproxyfen on reproduction and F1 progeny in myiasis causing flesh fly Sarcophaga ruficornis L.(Sarcophagidae: Diptera). Parasitology research, 114(6), 2325-2331.
- Singtripop, T., Oda, Y., Wanichacheewa, S., & Sakurai, S. (2002). Sensitivities to juvenile hormone and ecdysteroid in the diapause larvae of *Omphisa fuscidentalis* based on the hemolymph trehalose dynamics index. *Journal of insect physiology*, *48*(8), 817-824.
- Smykal, V., Daimon, T., Kayukawa, T., Takaki, K., Shinoda, T., & Jindra, M. (2014). Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. *Developmental biology*, 390(2), 221-230.
- Soltani, N., Chebira, S., Delbecque, J. P., & Delachambre, J. (1993). Biological activity of flucycloxuron, a novel benzoylphenylurea derivative, on *Tenebrio molitor*: comparison with diflubenzuron and triflumuron. *Experientia*, 49(12), 1088-1091.
- Soltani, N., Soltani-Mazouni, N., Quennedey, B., & Delachambre, J. (1996). Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under in vivo and in vitro conditions: effects of diflubenzuron. *Journal of Stored Products Research*, 32(3), 205-212.
- Soltani-Mazouni, N., Taïbi, F., & Zerguine, K. (2001). Evaluation de deux nouveaux régulateurs de croissance sur le potentiel reproducteur d'un ravageur des denrées stockés. *Revue Synthèse*, 9, 95-103.
- Soltani-Mazouni, N., Hami, M., & Gramdi, H. (2012). Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia Kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction & Development*, *56*(2), 157-163.
- Steigenga, M. J., Hoffmann, K. H., & Fischer, K. (2006). Effects of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on female reproduction and longevity in the butterfly *Bicyclus* anynana. Entomological science, 9(3), 269-279.

- Sullivan, J. (2000). Environmental fate of pyriproxyfen. Environmental Monitoring & Pest Manegement Branch. Sacramento.
- Swevers, L., Raikhel, A.S., Sappington, T.W., Shirk, P., & Kostas, I. (2005). Vitellogenesisand post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: *Comprehensive Insect Molecular Science* (Eds. L. I. Gilbert, I. Kostas, S. S. Gill). *Elsevier*, 6, 87–156.
- Takahashi, M., Kiuchi, M., & Kamimura, M. (2002). A new chitinase-related gene, BmChiR1, is induced in the *Bombyx mori* anterior silk gland at molt and metamorphosis by ecdysteroid. *Insect biochemistry and molecular biology*, *32*(2), 147-151.
- Thomas, H.E., Stunnenberg, H.G., Stewart, A.F. (1993). Heterodimerization of the Drosophila ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature*, *362*, 471-475.
- Thummel, C. S. (1996). Flies on steroids—Drosophila metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends in Genetics*, 12(8), 306-310.
- Toivonen, J. M., & Partridge, L. (2009). Endocrine regulation of aging and reproduction in Drosophila. *Molecular and cellular endocrinology*, 299(1), 39-50.
- Tomlin, C. D. S. (2000). The e-Pesticide Manual, v. 2.0. British Crop Protection Council, *ISBN*, 1-901396.
- Truman, J. W., & Riddiford, L. M. (1999). The origins of insect metamorphosis. *Nature*, 401(6752), 447-452.
- Truman, J. W., & Riddiford, L. M. (2002). Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual review of entomology*, 47(1), 467-500.
- Truman, J. W., & Riddiford, L. M. (2007). The morphostatic actions of juvenile hormone. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(8), 761-770.
- Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M. T., & Tanguay, R. L. (2016). Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environmental Pollution*, 218, 1089-1093.
- Tufail, M., Nagaba, Y., Elgendy, A. M., & Takeda, M. (2014). Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomological Science*, 17(3), 269-282.
- Tunaz, H., & Uygun, N. (2004). Insect growth regulators for insect pest control. *Turkish* Journal of Agriculture and Forestry, 28(6), 377-387.
- Walgraeve, H. R. M. A., & Verhaert, P. D. E. M. (1988). Presence and function of ecdysteroids in invertebrates. *ISI atlas of science: Animal and plant sciences (USA)*. 1, 164-172
- Wang S. F., Zhu J., Martin D., & Raikhel A. S. (2004). Regulation of vitellogenin gene expression by ecdysteroids. In : *Reproductive Biology of Invertebrates, Pragress in Vitellogenesis* (Eds. A.S. Raikhel, T. W. Sappington), *Science Publishers*, 12, 69-94.

- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jäckle, H., Janning, W. & Klämbt, C. (2003). FlyMove-a new way to look at development of Drosophila. *Trends in Genetics*, 19(6), 310-311.
- Who (2008). Guidelines for Drinking-Water Quality. 3rd ed. World Health Organization, Geneva, 668 pp.
- Wilson, T. G., & Ashok, M. (1998). Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14040-14044.
- Wing, K. D., Slawecki, R. A., & Carlson, G. R. (1988). RH-5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval Lepidoptera. *Science*, 241(4864), 470-472.
- Wozniak, M., Chu, Y., Fang, F., Xu, Y., Riddiford, L., Jones, D., & Jones, G. (2004). Alternative farnesoid structures induce different conformational outcomes upon the Drosophila ortholog of the retinoid X receptor, ultraspiracle. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(11), 1147-1162.
- Wu, Z., Guo, W., Xie, Y., & Zhou, S. (2016). Juvenile Hormone Activates the Transcription of Cell-division-cycle 6 (Cdc6) for Polyploidy-dependent Insect Vitellogenesis and Oogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(10), 5418-5427.
- Wyatt, G. R., & Davey, K. G. (1996). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Advances in insect physiology*, 26, 1-155.
- Xu, Y., Fang, F., Chu, Y., Jones, D., & Jones, G. (2002). Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6026-6036.
- Yamamoto, R., Bai, H., Dolezal, A. G., Amdam, G., & Tatar, M. (2013). Juvenile hormone regulation of Drosophila aging. *BMC biology*, 11(1), 1.
- Yamanaka, N., Honda, N., Osato, N., Niwa, R., Mizoguchi, A., & Kataoka, H. (2007). Differential regulation of ecdysteroidogenic P450 gene expression in the silkworm, *Bombyx mori. Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(11), 2808-2814.
- Yamanaka, N., Rewitz, K. F., & O'Connor, M. B. (2013). Ecdysone control of developmental transitions: lessons from Drosophila research. Annual review of entomology, 58, 497-516
- Yao, T. P., Segraves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M., & Evans, R. M. (1992). Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71(1), 63-72.
- Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P., & Evans, R. M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, 366(6454), 476-479.

- Yapabandara, A. M. G. M., & Curtis, C. F. (2004). Control of Vectors and Incidence of Malaria in an Irrigated Settlement Scheme in Sri Lanka When Using the Insect Growth Regulator Pyriproxyfen. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20(4), 395-400.
- Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H., & Niwa, R. (2006). Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development*, 133(13), 2565-2574.
- Zen, K. C., Choi, H. K., Krishnamachary, N., Muthukrishnan, S., & Kramer, K. J. (1996). Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect β-Nacetylglucosaminidase gene. *Insect biochemistry and molecular biology*, 26(5), 435-444.
- Zhang, X., & Yan-Zhu, K. (2013). Biochemical characterization of chitin synthase activity and inhibition in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect science*, 20(2), 158-166.
- Zhou, X., & Riddiford, L. M. (2002). Broad-Complex specifies pupal development and mediates the prevention of the pupal-adult transformation by juvenile hormone in Drosophila and Manduca. *Development*, 129, 2259-2269.
- Zhou, X., & Riddiford, L. M. (2008). rosy function is required for juvenile hormone effects in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 178(1), 273-281.
- Zhu, J., Chen, L., & Raikhel, A. S. (2007). Distinct roles of Broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, Vitellogenin, in the mosquito Aedes aegypti. *Molecular and cellular endocrinology*, 267(1), 97-105.
- Zufelato, M. S., Bitondi, M. M. G., Simoes, Z. L. P., & Hartfelder, K. (2000). The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod structure & development*, 29(2), 111-119.



Production scientifique

Publications:

1- Bensebaa, F., Kilani-Morakchi, S., Arib, N., & Soltani, N. (2015). Evaluation of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): Insecticidal activity, ecdysteroid contents and cuticle formation, *Eur. J. Entomol.* doi: 10.14411/eje.2015.000

Communications internationales:

- 1- Bensebaa, F., Boulahbel, B., Kilani-Morakchi, S., & Aribi, N. (2012). Toxicité d'un régulateur de croissance des insectes le pyriproxyfène chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (Diptera). Les 3^{èmes} journées scientifiques de l'ATT, 03-05 Février 2012.
- 2- Boulahbel, B., Bensebaa, F., Kilani-Morakchi, S., & Aribi, N. (2012). Toxicité de l'huile de neem et du neem azal chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (Diptera). Les 3^{èmse} journées scientifiques de l'ATT, 03-05 Février 2012.
- 3- Bensebaa, F., Kilani-Morakchi, S., & Arib, N. (2013). Effects of a juvenile hormone analog (pyriproxyfen) on *Drosophila melanogaster*: toxicity, growth and ecdysteroids titers. 23 RD European Drosophila Research Conferences 16th 19th October, Barcelona 2013.
- 4- **Bensebaa**, F., Kilani-Morakchi, S., & Arib, N. (2014). Toxicite d'un analogue de l'hormone juvenile (pyriproxyfene) chez *Drosophila melanogaster*. Ilème Congrès de l'AT-BVBR-18 au 20 Mars 2014, Tabarka. Tunisie.

Communications nationales:

- 1- Bensebaa, F., Boulahbel, B., Chahed, W., Khemri, M., Kilani-Morakchi, S., & Aribi, N. (2013). Toxicite du pyriproxyfene et effet d'un synergiste le Diethymaleate chez un modele de reference *Drosophila melanogaster* (diptera). Journée scientifique sur l'environnement, Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie, 26 Nov. 2013.
- 2- Boulahbel, B., Bensebaa, F., Oulhaci, M., Djihed, S., Kilani-Morakchi, S., & Aribi, N. (2013). Activité d'un pesticide naturel, l'azadirachtine seul et combine au Diethymaleate (DEM) chez un modele de reference *drosophila melanogaster* (diptera).). Journée scientifique sur l'environnement, Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie, 26 Nov. 2013.

Evaluation of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): Insecticidal activity, ecdysteroid contents and cuticle formation

FETHI BENSEBAA, SAMIRA KILANI-MORAKCHI, NADIA ARIBI and NOUREDDINE SOLTANI

Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000-Annaba, Algeria; e-mails: fethi.bensebaa@gmail.com; samira.morakchi@univ-annaba.dz; nadia.aribi@univ-annaba.dz; noureddine.soltani@univ-annaba.dz

Key words. Diptera, Drosophilidae, pyriproxyfen, Drosophila melanogaster, toxicity, ecdysteroids, cuticle, chitin

Abstract. The efficacy of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog (JHA), was evaluated using third instar larvae of *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae). Various doses of the compound, ranging from 0.01 to 2 ng/larva, were applied topically to larvae (12 h before pupariation). Treatment did not prevent pupariation but inhibited adult emergence at all the doses tested. In a second series of experiments the ecdysteroid content of pupae was determined following application of pyriproxyfen at two doses, 0.108 and 0.29 ng/larva, corresponding to ID₂₅ and ID₅₀, the doses required for 25 and 50% inhibition of adult emergence, respectively. Pyriproxyfen treatment increased the duration of pupal development. In addition, enzyme immunoassay measurements of ecdysteroids in whole body extracts of pupae indicated that pyriproxyfen decreased the ecdysteroid content in a dose-dependent manner. Finally, the effects on the cuticle of pyriproxyfen (ID₅₀) were studied histologically, which revealed that an increase in chitin content of the cuticle is only recorded at the highest dose. Thus, a topical application of pyriproxyfen to third instar larvae interfered with the molting hormone and disrupted the normal development of this insect.

INTRODUCTION

In insects 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile hormone (JH), play a central role in the regulation of growth and development (Nijhout, 1994). According to the classical dogma of insect endocrinology, the balance of these two hormones defines the outcome of each developmental transition (Dubrovsky, 2005). 20E initiates all major developmental transitions, but it is an interaction with JH that transduces the 20E pulses into stage-specific responses (Dubrovsky, 2005). Indeed, JH has been shown to modulate the action of ecdysteroids in various insects (Nijhout, 1994; Riddiford, 1996). There is little literature on the physiological and biochemical processes related to molting and metamorphosis in insects compared to other aspects, like reproduction (De Loof et al., 2015).

Recent advances in understanding the mechanism that regulate molting and metamorphosis in insects have relied heavily on using *Drosophila melanogaster* as a model system. However, the effect of JH on 20E and the cross-talk between these two hormones is not well established (Quinn et al., 2012; Yamanaka et al., 2013). In addition to its well-known advantages for molecular and genetic studies, *D. melanogaster* provides an ideal model system for elucidating the mechanisms of hormones, since 20E appears to be responsible for directing the major developmental transitions in the life cycle of this insect, including molting and metamorphosis (Quinn et al., 2012).

As recorded for ecdysone agonists and juvenile hormone analogs, interference with hormonal balance leads to interrupted development and are potential specific targets for use in pest control (Penner & Dhadialla, 2012). However, a better and complete understanding of regulatory processes underlying insect development still imperative for their rational management. Furthermore, JHAs are also excellent tools for studying endocrinological mechanisms in insects (Ramaseshadri et al., 2012).

The insect growth regulator (IGR), pyriproxyfen, is a JHA with a relatively low mammalian toxicity (Miyamoto et al., 1993). It is a broad-spectrum insect growth regulator with insecticidal activity against agricultural, horticultural and public health insect pests (Who, 2008), and has been successfully used to control important pests of many agricultural crops all over the world (Sazo et al., 2008; Moadeli et al., 2014). Pyriproxyfen, the most potent JHA available today (Hatakoshi, 2012), inhibits metamorphosis and embryogenesis in several insect orders, including Diptera (Kawada et al., 1988; Ishaaya et al., 1994; Aribi et al., 2006). In addition, this compound suppresses oviposition, reduces viability of eggs (Ghasemi et al., 2010; Ohba et al., 2013) and reduces fecundity (Singh & Kumar, 2015). Recently, pyriproxyfen was reported to affect some physical and biochemical processes in insects, such as moulting, by influencing the activity of chitinases (Nasr et al., 2010).

Therefore, in the present study we investigated the effect of pyriproxyfen on *D. melanogaster* in order to better understand the interaction between the two principal hormones, JH and 20E. Pyriproxyfen was applied topically to larvae at the end of third instar, when the JH titer drops to an undetectable level to allow the molting hormone (ecdysteroids) to initiate metamorphosis, in order to firstly determine its insecticidal potency, and then its effects on pupal development, the ecdysteroid profile and the chitin content and structure of the new cuticle, respectively.

MATERIAL AND METHODS

Insects

Canton-S wild-type flies of *D. melanogaster*, a widely used laboratory strain, were reared in glass vials containing a yeast/ cornmeal/agar laboratory medium containing an anti-fungal agent, which were kept in a breeding room at $25 \pm 2^{\circ}$ C and 70% humidity under a 12L : 12D cycle.

Treatment and bioassay

Pyriproxyfen (>95%, Sumitomo Chemical Company. Ltd., Osaka, Japan) was dissolved in acetone and topically applied (1 μ l/insect) to third instar larvae of *D. melanogaster* (12 h before pupariation when the JH titer drop to an undetectable level). Control insects were treated with 1 μ l acetone alone.

This compound was tested at five doses (0.01, 0.1, 0.5, 1 and 2 ng/larva) and the percentage inhibition of adult emergence was recorded. For each dose, three replicates of 20 insects were used. The percentage inhibition was corrected following Abbott (1925). The ID₅₀ and ID₂₅ (doses that caused an inhibition in adult emergence of 50% and 25%, respectively) were determined together with the corresponding 95% fiducial limits (95% FL) and the Hill slope.

Duration of pupal development

The duration of the pupal period was recorded for control and treated (ID_{50} , ID_{25}) insects. Pupae were observed at 4 h intervals until adult emergence. There were seven to eight replicates, each consisting of 20 insects.

Enzyme immunoassay of ecdysteroids

Third-instar larvae were treated as above with two doses (ID_{50} and ID_{25}) and surviving pupae were sampled at various times during pupal development (12, 36, 48, 60 and 84 h after puparium formation (APF)). Samples were extracted individually with methanol by sonication (2–3 min). After centrifugation (5000 g, 10 min), the supernatants were taken and evaporated (60°C). Each body extract was resuspended in 500 µl of phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4) and analyzed using an enzyme immunoassay (EIA) as previously described (Aribi et al., 2006) using rabbit polyclonal B antibody against 20E, peroxidase as an enzymatic tracer and tetramethyl benzidine as a colouring agent. Data are expressed in pg 20E equivalents per mg of body weight. Antibody was kindly supplied by J.P. Delbecque (CNRS, Université de Bordeaux I, France) and peroxidase by C. Blaise (Pierre and Marie Curie University, Paris, France).

Chitin quantification

Chitin quantification of a whole pupa was performed as previously described (Farnesi et al., 2012). Chitin content of pupae sampled at various ages (12, 36, 48, 60 and 84 h APF) was evaluated by quantification of glucosamine derivatives obtained by deacetylation, depolymerisation and deamination of N-acetylglucosamine polymer. Chitin undergoes an alkaline digestion with KOH (14 M) at 130°C in order to deacetylate the chitin, thus forming chitosan. A solubilized chitosan solution is then depolymerized using NaNO₂(10%) and KHSO₄ (10%) in order to release the amine residues from the glucosamine, forming a soluble aldehyde. The aldehydes generated in a reaction with HNO₂ and with the further addition of MBTH and Fe⁺³ develop a blue coloration. Absorbance was read at 650 nm and chitin content was expressed as glucosamine equivalents, according to a standard curve of glucosamine (50–1000 μ g). Before chitin quantification, the weight of the pupae was determined to normalize the results.

Histology

Histological procedures were performed following Martoja & Martoja (1967). Pupae (60 and 84 h APF, these ages were chosen because adult cuticle deposition begins between 48 and 53 h APF) that developed, from pyriproxyfen-exposed or control larvae were fixed in 10% formol. After dehydration in a series of graded ethanol the samples were passed through three washes in xylene before being embedded in paraffin wax. Transverse sections of the abdomen (4 µm) obtained using a Leica RM2125T (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) manual rotary microtome, were stained with hematoxylin-Eosin. The abdominal region was chosen because JHA causes the development of abnormalities in this region (Zhou & Riddiford, 2002). Observations were made using a Leica DM500 microscope equipped with a Leica ICC50 HD camera and the thickness of the cuticle, based on five measurements, was determined using Las EZ Leica software.

Statistical analysis

Results are given as means \pm standard errors (SE). Data for the toxicity were analyzed using non-linear sigmoid curve fitting, and the activity of the treatment was evaluated in terms of a dose dependent response. The goodness of fit to the curve was evaluated on the basis of R² values. The homogeneity of variances was checked using Bartlett's and Brown-Forsythe tests. Data on pupal duration, EIA measurement and chitin quantification were subjected to one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc HSD Tukey test. The cuticle measurements were assessed using a Mann-Whitney test. All statistical analyses were performed using Prism v 6.01 for Windows (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com).

RESULTS

Insecticidal activity

Pyriproxyfen applied topically to third instar larvae of *D. melanogaster* inhibits adult emergence in a dose dependent way. Partial adult emergence and malformed adults were also classified as dead, since treatment does not prevent pupariation. The corrected inhibition percentages ranged from $8.12 \pm 1.55\%$ at lowest dose (0.01 ng) up to a maximum of $89.69 \pm 1.47\%$ at the highest dose (2 ng) (Fig. 1). The percentage inhibition recorded in controls was $11.66 \pm 1.66\%$. The ID₅₀ and ID₂₅ values together with their corresponding 95% fiducial limits (95% FL) are given in Table 1.

TABLE 1. Toxicity of pyriproxyfen applied topically to larvae of *D. melanogaster* at the end of the third instar. The data are expressed in terms of inhibiting dose (ID) of adult emergence together with the corresponding 95% fiducial limits (95%FL). R^2 – coefficient of determination.

Doses	Value (ng)	Fiducial limits (95%)	R ²
ID ₅₀	0.29	[0.21-0.39]	
ID ₂₅	0.108	[0.06-0.17]	0.99
Hill slope	1.11	[0.78–1.43]	



Fig. 1. Effect of pyriproxyfen, topically applied to larvae of *D. melanogaster* at the end of the third instar: sigmoidal dose-dependent response curve of corrected inhibitions (%) of adult emergence as a function of the logarithm of the doses.

Effect on the duration of pupal development

The duration of pupal development is given in Fig. 2. Treatment of third instar larvae increased the duration of pupal development only at the highest dose ID_{50} (0.29 ng) ($F_{2,20} = 8.543$; p = 0.0021). The means values recorded were 88.25 ± 3.01 h for the control and 102.57 ± 1.71 h for the (ID_{50}) treated pupae. Thus, pyriproxyfen delayed adult emergence by approximately 14 h.

Effect on the ecdysteroid content

During pupal development the ecdysteroid titer in the control series increased from 264.89 ± 7.68 pg 20E/mg at 12 h APF to reach a peak of 414.24 ± 2.71 pg 20E/mg at 36 h APF and then decreased (p < 0.0001) (Fig. 3). In the treated series, a similar trend was recorded for the two doses tested (ID₂₅ and ID₅₀). However, ecdysteroid titer remained stable after 60 h in the ID₂₅ and after 48 h in the ID₅₀ treatments. EIA measurements revealed that the two doses tested caused significant reductions in the ecdysteroid titers (p < 0.0001) at 12 h and 36 h APF. Moreover,



Fig. 2. Effect of pyriproxyfen, topically applied to larvae of *D. melanogaster* at the end of the third instar, on the duration of the pupal stage (h) (m \pm SE; n = 7–8 replicates, each of 20 insects). Different letters indicate a significant difference (p < 0.05).



Fig. 3. Effect of pyriproxyfen (ID₂₅, ID₅₀), topically applied to larvae of *D. melanogaster* at the end of the third instar, on the ecdysteroid (pg 20E/mg of weight) titer during pupal development (m \pm SE; n = 3–5). Mean values for individuals of the same age followed by different letters are significantly different (p < 0.05).

an increase in ecdysteroids titer was recorded at 84 h in the treated series because the values recorded between 60 and 84 h remained stable in the treated series but decreased after 60 h in the controls. ANOVA revealed significant effects of dose ($F_{2,36} = 22.25$; p < 0.0001), time ($F_{4,36} = 205$; p < 0.0001) and the dose-time interaction ($F_{8,36} = 51.92$; p < 0.0001).

Effect on chitin content

As shown in Fig. 4, the whole body chitin content of the controls increased during pupal development (36, 48 h APF) and then decreased (p < 0.0001) (60 and 84 h). Generally, the trend in the chitin content of the treated series is similar to that in the control and appears to be correlated with the ecdysteroid titers (Fig. 3). Pyriproxyfen treatment resulted in a significant (p < 0.0001) increase in the chitin content compared to the control only at the highest dose (ID₅₀). ANOVA revealed a significant effect of dose (F_{2, 119})



Fig. 4. Effect of pyriproxyfen (ID₂₅, ID₅₀), topically applied to larvae of *D. melanogaster* at the end of the third instar, on the chitin content (µg of glucosamine/mg) during pupal development (m ± SE; n = 8–11). Mean values for individuals of the same age followed by different letters are significantly different (p < 0.05).



Fig. 5. Effect of pyriproxyfen (ID₅₀), topically applied to larvae of *D. melanogaster* at the end of the third instar, on cuticle thickness (μ m) (m ± SE; n = 5). Different capital letters indicate a significant difference between individuals of the same age in the same series; different small letters indicate a significant difference between control and treated individuals of the same age (p < 0.05).

= 108.2; p < 0.0001), time ($F_{4,119}$ = 700; p < 0.0001) and the dose-time interaction ($F_{8,119}$ = 6.085; p < 0.0001).

Structure of new cuticle

As shown in Fig. 5 the thickness of new cuticle in the control series was $0.552 \pm 0.021 \ \mu\text{m}$ at 60 h APF and increased to a maximum of $0.645 \pm 0.013 \ \mu\text{m}$ at 84 h APF (p < 0.01). Pyriproxyfen (ID₅₀) treatment caused a significant increase in the thickness of the cuticle (p < 0.01) recorded at 60 and 84 h APF. Moreover, the increase in cuticle thickness in the treated series (ID₅₀) is much greater whatever the age (mean percentage of 45%) compared to the standard increase with age in the control series, which is 14.41%. As shown in Fig. 6, the new adult cuticle in the control series has normal bristles (Fig. 6A), but lacks bristles in treated series (Fig. 6B).

DISCUSSION

In the present study we topically applied a juvenile hormone analog, pyriproxyfen, to third instar larvae of D. melanogaster just prior to pupariation. This did not kill the larvae or prevent them from pupating but did result in a dose-dependent inhibition of adult emergence and caused morphological abnormalities in the adults that did emerge. Zhou & Riddiford (2008) report that unlike Lepidoptera and most other holometabolous insects, higher Diptera, such as D. melanogaster, have lost most of their sensitivity to JH. Indeed, topical applications of JH or JHA do not prevent D. melanogaster larvae pupating and have no role in initiating metamorphosis (Riddiford et al., 2003). Furthermore, in *Drosophila* and other higher flies, the pupa is derived from imaginal discs, except for the abdominal cuticle, which is produced by persisting larval epidermal cells and histoblasts, which may account for the inability of JH or JHA to prevent the larval-pupal transformation (Zhou & Riddiford, 2002). Nevertheless, applications of JH or JHA before or at the time of pupation prevent normal adult development (Zhou & Riddiford, 2002).

Pyriproxyfen is known to be a potent inhibitor of metamorphosis and adult development. Indeed, Boina et al. (2009) report that the topical application of pyriproxyfen suppress adult emergence in the Asian citrus psyllid. Pyriproxyfen also inhibits the emergence of *Aedes aegypti* (Sihuincha et al., 2005; Harburger et al., 2011), *Anopheles culicifacies, Anopheles subpictus* (Yapabandara & Curtis, 2004), *Anopheles gambiae* (Mbare et al., 2013), *Bradysia coprophila* (Ludwig & Oetting, 2001), *Lycoriella ingenue* (Erler et al., 2011) and *Culex pipiens* (Al-Sarar et al., 2011). Singh & Kumar (2015) also report a decrease in adult emergence, formation of pupal-adult mosaics and the development of deformed adults in the F1 generation of *Sarcophaga ruficornis* after topically applying pyriproxyfen to the parental generation.

In the current experiments, pyriproxyfen also prolonged pupal development at the highest dose (ID_{50}) compared



Fig. 6. Effect of pyriproxyfen (ID_{50}), topically applied to larvae of *D. melanogaster* at the end of the third instar. A – control: new adult cuticle with a normal bristles; B – treated: new cuticle with no bristles. Ct – cuticle; Ep – epidermis; Br – bristles.

to the controls, which indicates that the JH analog (here pyriproxyfen) can induce delays in the development of the pupal-adult transition. Alizadeh et al. (2012) previously reported that the larvae and pupae of *Plutella xylostella* treated with pyriproxyfen take longer to complete their development. Similar effects are reported by Singh & Kumar (2011) for *Papilio demoleus* treated with pyriproxyfen. Hamaidia & Soltani (2014) also report an increase in the duration of the larval and pupal stages of *Culex pipiens* treated with Kinoprene, another JHA.

At the beginning of the pupal stage there is JH sensitive period when JH must be absent in epidermal cells for successful adult development (Nijhout, 1994). Hence, the presence of pyriproxyfen at these critical times resulted in a prolonged pupal development, deformed adults and reduction in adult emergence.

In D. melanogaster, metamorphosis is controlled by several pulses of 20E secretion, the first occurs at the end of the third instar larva, when the JH titer is very low and initiates pupararium formation, the second 12 h after puparium formation (APF) triggering pupation, and finally the onset of adult development requires a large wave beginning approximately 30 h APF in the total absence of JH (Handler, 1982; Riddiford, 1993). In the present study we demonstrated that pyriproxyfen applied at the end of last larval instar significantly reduced the ecdysteroid titer during the pupal stage by inhibiting the production of 20E. Negative effects of JHA on ecdysteroid titers are reported in different orders of insects, especially Lepidoptera and Coleoptera. Aribi et al. (2006) report that pyriproxyfen reduces, in a dose-dependent manner, the ecdysteroid titer in the hemolymph of Tenebrio molitor pupae. Similar effects are recorded for other JHA, like methoprene and fenoxycarb, on the larval stages of the Coleoptera, Tribolium freemani (Hirashima et al., 1995) and Zophobas atratus (Aribi et al., 1999), Lepidoptera, Bombyx mori (Monconduit et al., 1998) and Omphisa fuscidentalis (Singtriopo et al., 2002) and the adult stage of *D. melanogaster* (Diptera) (Handler, 1982). Indeed, one of the many vital functions of JH in insect development is to modulate the action of the molting hormone (20E) and coordinate insect moulting and metamorphosis (Riddiford, 2008). Moreover, Yamanaka et al. (2007) demonstrate the direct effect of JH on the prothoracic gland during ecdysterodogenesis.

Chitin has an important role in insect development and its synthesis and degradation must be tightly regulated. Our results indicate that only the highest dose (ID_{50}) of pyriproxyfen significantly increased the chitin content of pupae of *D. melanogaster* compared to the control. It is reported that the molting hormone 20E regulates chitin metabolism by stimulating the secretion and activity of enzymes (Mezendorfer & Zimoch, 2003). Both the secretion and activation of chitinolytic enzymes are clearly controlled by ecdysteroids (Reynolds & Samuels, 1996). In addition, Kimura (1973) showed many years ago that the activity of enzymes in the molting fluid can be stimulated by injecting ecdysteroid. More recently, Nasr et al. (2010) report an inhibition of chitinase activity in larvae of *Spodoptera littoralis* treated with pyriproxyfen. Indeed, the expression of the gene determining the production of chitinolytic enzymes, which is normally induced by ecdysteroids, is suppressed by juvenile hormone (Cohen, 2010). In *Manduca sexta* expression of chitinase genes is suppressed by the topical application of the juvenile hormone mimic, fenoxycard (Kramer et al., 1993; Zen et al., 1996). The increase in chitin content recorded in our experiments may be related to an inhibition of chitinase activity due to the reduction in the secretion of ecdysteroids recorded following treatment with pyriproxyfen.

The histological study revealed that pyriproxyfen affects the secretion of the adult cuticle resulting in an increase in the thickness of the new cuticle and suppression of the development of bristles. The stimulation of the secretion of the adult cuticle by JHA is reported by Dedos & Fugo (2001) in *B. mori* treated with fenoxycarb. The increase in cuticle thickness recorded in our experiments seems to be correlated with the increase in chitin content, which is an important constituent of cuticles. Moreover, it is reported that in D. melanogaster the application of JH or JHA during the final larval instar or at pupariation causes the formation of a pupal-adult mosaic, with a transparent abdomen covered with pupal cuticle, with no or a few bristles (Zhou & Riddifrod, 2002). Indeed, the status quo action of JH on the pupal-adult transformation is mediated by the JH-induced re-expression of the broad (br) gene during adult differentiation causing the formation of a second pupal cuticle (Zhou & Riddifrod, 2002; Jindra et al., 2013). Br can both activate pupal genes and suppress adult genes, thus, during the crucial period of the commitment to adult development, ecdysone in the absence of JH switches off Br so that the adult-specific program of differentiation can occur (Goodman & Granger, 2005). The presence of JH (here pyriproxyfen) at this critical period may interfere with ecdysone and account for the abnormalities in cuticle structure and inhibition of adult emergence recorded in D. melanogaster. Furthermore, as the cuticle of insects is an effective barrier to the evaporation of water (Gibbs, 2011), the increase in cuticle thickness recorded when treated with pyriproxyfen may act as potential protective system against hot temperatures and desiccation, especially in the context of global warming.

In conclusion, our findings indicate that pyriproxyfen negatively affects the hormonal control of metamorphosis causing perturbations in *D. melanogaster* development. Nevertheless, the precise way in which ecdysone is affected by pyriproxyfen requires further research. Moreover, information is needed on the sublethal effects of pyriproxyfen on their offspring.

ACKNOWLEDGEMENTS. Thanks are due to G.L. Rezende, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, for his detailed protocol for chitin quantification. This research was supported by the National Fund for Scientific Research in Algeria (Laboratory of Applied Animal Biology to N. Soltani), by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (CNEPRU project F 011.2008. 0024 to N. Aribi).

REFERENCES

- ABBOTT W.S. 1925: A method of computing the effectiveness of an insecticide. — J. Econ. Entomol. 18: 265–267.
- ALIZADEH M., KARIMZADEH J., RASSOULIAN G.H., FARAZMAND H., HOSEINI-NAVEH V. & POURIAN H.R. 2012: Sublethal effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue, on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): life table study. — *Arch. Phytopathol. Pfl.* **45**: 1741–1763.
- AL-SARAR A.S., AL-SHAHRANI D., BAYOUMI A.E., ABOBAKR Y. & HUSSEIN H.I. 2011: Laboratory and field evaluation of some chemical and biological larvicides against *Culex* spp. (Diptera: Culicidae) immature stages. — *Int. J. Agric. Biol.* 13: 115–119.
- ARIBI N., QUENNEDEY A., SOLTANI N. & DELBECQUE J.P. 1999: L'initiation de la métamorphose chez Zophobas atratus: (Coleoptera: Tenebrionidae): effects des ligatures et des régulateurs de croissance. — Ann. Soc. Entomol. Fr. 35: 59–64.
- ARIBI N., SMAGGHE G., LAKBAR C., SOLTANI-MAZOUNI N. & SOLTANI N. 2006: Effect of pyriproxyfen a juvenile hormone analogue, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. — *Pestic. Biochem. Phys.* 84: 55–62.
- BOINA D.R., ROGERS M.E., WANG N. & STELINSKI L. 2009: Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. — *Pest Manag. Sci.* 66: 349–357.
- COHEN E. 2010: Chitin biochemistry: synthesis, hydrolysis and inhibition. Adv. Insect Physiol. 38: 5–74.
- DEDOS S.G. & FUGO H. 2001: Acceleration of pupal-adult development by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori.* — *Zool. Sci.* 18: 771–777.
- DE LOOF A., VANDERSMISSEN T., MARCHAL E. & SCHOOFS L. 2015: Initiation of metamorphosis and control of ecdysteroid biosynthesisin insects: The interplay of absence of juvenile hormone, PTTH, and Ca²⁺-homeostasis. — *Peptides* **68**: 120–129.
- DUBROVSKY E.B. 2005: Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**: 6–11.
- ERLER F., POLAT E., DEMIR H., CATAL M. & TUNA G. 2011: Control of mushroom sciarid fly *Lycoriella ingenua* populations with insect growth regulators applied by soil drench. *J. Econ. Entomol.* **104**: 839–844.
- FARNESI L.C., BRITO J.M., LINSS J.G., PELAJO-MACHADO M., VALLE D. & REZENDE G.L. 2012: Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: Effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. — *PLoS ONE* 7(1): e30363.
- GHASEMI A., SENDI J.J. & GHADAMYARI M. 2010: Physiological and biochemical effect of pyriproxyfen on Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). — J. Plant Protect. Res. 50: 416–422.
- GIBBS A.G. 2011: Thermodynamics of cuticular transpiration. *J. Insect Physiol.* **57**: 1066–1069.
- GOODMAN W.G. & GRANGER N.A. 2005: The juvenile hormones. In Gilbert L.I., Iatrou K. & Gill S.S. (eds): *Comprehensive Molecular Insect Science Endocrinology. Vol. 3*. Elsevier, Oxford, pp. 319–408.
- HAMAIDIA K. & SOLTANI N. 2014: Laboratory evaluation of a biorational insecticide, kinoprene, against *Culex pipiens* larvae: Effects on growth and development. *Annu. Res. Rev. Biol.* 4: 2263–2273.
- HANDLER A.M. 1982: Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. — *Dev. Biol.* 93: 73–82.
- HARBURGER L., BELTRÁN G., GOLDBERG L., GOLDBERG L., ZERBA E., LICASTRO S. & MASUH H. 2011: A new strategy for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control with community participa-

tion using a new fumigant formulation. — J. Med. Entomol. 48: 577–583.

- HATAKOSHI M. 2012: Pyriproxyfen: a new juvenoid. In Kramer W., Schirmer U., Jeschke P. & Witschel M. (eds): *Modern Crop Compound. 2nd ed.* Wiley-VCH, Weinheim, pp. 963–998.
- HIRASHIMA A., TAKEYA R., TANIGUSHI E. & ETO M. 1995: Metamorphosis, activity of juvenile hormone esterase and alteration of ecdysteroids titres: effects of larval density and various stress on the red flour beetle *Tribolium freemani* Hinton (Coleoptera, Tenebrionidae). — J. Insect Physiol. 41: 383–388.
- ISHAAYA I., DE COCK A. & DEGHEELE D. 1994: Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). — J. Econ. Entomol. 87: 1185–1189.
- JINDRA M., PALLI S.R. & RIDDIFORD L.M. 2013: The juvenile hormone signaling pathway in insect development. — Annu. Rev. Entomol. 58: 181–204.
- KAWADA H., DOHARA K. & SHINJO G. 1988: Laboratory and field evaluation of an insect growth regulator, 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridy1oxy) propyl ether, as a mosquito larvicide. — Jpn. J. Sanit. Zool. 39: 339–346.
- KIMURA S. 1973: The control of chitinase activity by ecdysterone in larvae of *Bombyx mori*. — J. Insect Physiol. 19: 115–123.
- KRAMER K.J., CORPUZ L., CHOI H.K. & MUTHUKRISHNAN S. 1993: Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. — *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23: 691–701.
- LUDWIG S.W. & OETTING R.D. 2001: Evaluation of medium treatments for management of *Frankliniella occidentalis* (Thripidae: Thysanoptera) and *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae). — *Pest Manag. Sci.* 57: 1114–1118.
- MARTOJA R. & MARTOJA M. 1967: Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale. Masson, Paris, 345 pp.
- MBARE O., LINDSAY S.W. & FILLINGER U. 2013: Dose-response tests and semi-field evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv[®]0.5G) for the control of the malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu lato. *Malaria J.* **12**: 94.
- MERZENDORFER H. & ZIMOCH L. 2003: Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. — *J. Exp. Biol.* **206**: 4393–4412.
- MIYAMOTO J., HIRANO M., TAKIMOTO Y. & HATAKOSHI M. 1993: Insect growth regulators for pest control, with emphasis on juvenile hormone analogs: Present status and future prosrects. In Duke S.O., Menn J.J. & Plimmer J.R. (eds): *Pest Control with Enhanced Environmental Safety*, American Chemical Society Symp., Washington, DC, pp. 144–168.
- MOADELI T., HEJAZI M.J. & GOLMOHAMMADI G. 2014: Lethal effects of pyriproxyfen, spinosad, and indoxacarb and sublethal effects of pyriproxyfen on the 1st instar larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory. *J. Agric. Sci. Tech.* **16**: 178–189.
- MONCONDUIT H. & MAUCHAMP B. 1998: Effects of ultralow doses of fenoxycarb on juvenile hormone-regulated physiological parameters in the silkworm, *Bombyx mori* L. — *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **37**: 178–189.
- NASR H.M., BADAWY M. & RABEA E.I. 2010: Toxicity and biochemical study of two insect growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen, on cotton leafworm *Spodoptera littoralis.* — *Pestic. Biochem. Phys.* **98**: 198–205.
- NUHOUT H.F. 1994: *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton, NJ, 280 pp.
- OHBA S., OHASHI K., PUJIYATI E., HIGA Y., KAWADA H., MITO N. & TAKAGI M. 2013: The effect of pyriproxyfen as a "population

growth regulator" against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. — *PLoS ONE* 8(7): e67045.

- PENER M.P. & DHADIALLA T.S. 2012: An overview of insect growth disruptors; applied aspects. — Adv. Insect Physiol. 43: 1–162.
- QUINN L., LIN J., CRANNA N., LEE J., MITCHELL N. & HANNAN R. 2012: Steroid hormones in *Drosophila*: How ecdysone coordinates developmental signalling with cell growth and division. In Abduljabbar H. (ed.): *Steroids – Basic Science*. InTech, Rijeka, pp. 141–168.
- RAMASESHADRI P., FARKAŠ R. & PALLI S.R. 2012: Recent progress in juvenile hormone analogs (JHA) research. — *Adv. Insect Physiol.* **43**: 353–436.
- REYNOLDS S.E. & SAMUELS R.I. 1996: Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. — Adv. Insect Physiol. 26: 157– 232.
- RIDDIFORD L.M. 1993: Hormones and *Drosophila* development. In Bate M. & Martinez Arias A. (eds): *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. 899–939.
- RIDDIFORD L.M. 1996: Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In Gilbert L.I., Tata J.R. & Atkinson B.G. (eds): *Metamorphosis: Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells*. Academic Press, San Diego, pp. 223–251.
- RIDDIFORD L.M. 2008: Juvenile hormone action: a 2007 perspective. — J. Insect Physiol. 54: 895–901.
- RIDDIFORD L.M., HIRUMA K., ZHOU X. & NELSON C.A. 2003: Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. — *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 1327–1338.
- SAZO L., ARAYA J.E. & ESPARZA S. 2008: Control of San Jose scale nymphs, *Diaspidiotus perniciosus* (Comstock), on almond and apple orchards with pyriproxyfen, phenoxycarb, chlorpyrifos, and mineral oil. — *Chil. J. Agric. Res.* 68: 284–289.
- SIHUINCHA M., ZAMORA-PEREA E., ORELLANA-RIOS W., STANCIL J.D., LÓPEZ-SIFUENTES V., VIDAL-ORÉ C. & DEVINE G.J. 2005: Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. — *J. Med. Entomol.* 42: 620–630.

- SINGH S. & KUMAR K. 2011: Diofenolan: a novel insect growth regulator in common citrus butterfly, *Papilio demoleus*. — *Phytoparasitica* **39**: 205–213.
- SINGH S. & KUMAR K. 2015: Effects of juvenoid pyriproxyfen on reproduction and F1 progeny in myiasis causing flesh fly Sarcophaga ruficornis L. (Sarcophagidae: Diptera). — Parasitol. Res. 114: 2325–2331.
- SINGTRIPOP T., ODA Y., WANICHACHEEWA S. & SAKURAI S. 2002: Sensitivities to juvenile hormone and ecdysteroid in the diapauses larvae of *Omphisa fuscidentalis* based on the hemolymph trehalose dynamics index. — *J. Insect Physiol.* **48**: 817–824.
- WHO 2008: *Guidelines for Drinking-Water Quality. 3rd ed.* World Health Organization, Geneva, 668 pp.
- YAMANAKA N., HONDA N., OSATO N., NIWA R., MIZOGUCHI A. & KATAOKA H. 2007: Differential regulation of ecdysteroidogenic P450 gene expression in the silkworm, *Bombyx mori. Biosci. Biotech. Bioch.* **71**: 2808–2814.
- YAMANAKA N., REWITZ K. & O'CONNOR M.B. 2013: Ecdysone control of developmental transitions: Lesson from *Drosophila* research. — *Annu. Rev. Entomol.* 58: 497–516.
- YAPABANDARA A.M.G.M. & CURTIS C.F. 2004: Control of vectors and incidence of malaria in an irrigated settlement scheme in Sri Lanka by using the insect growth regulator pyriproxyfen. — J. Am. Mosq. Contr. Assoc. 20: 395–400.
- ZEN K.C., CHOI H.K., KRISHNAMACHARY N., MUTHUKRISHNAN S. & KRAMER K.J. 1996: Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect beta-N acetylglucosaminidase gene. — *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 435–444.
- ZHOU X. & RIDDIFORD L.M. 2002: Broad-Complex specifies pupal development and mediates the prevention of the pupal-adult transformation by juvenile hormone in *Drosophila* and *Manduca.* — *Development* **129**: 2259–2269.
- ZHOU X. & RIDDIFORD L.M. 2008: rosy function is required for juvenile hormone effects in *Drosophila melanogaster*. — *Genetics* 178: 273–281.
 - Received March 28, 2015; revised and accepted May 14, 2015 Prepublished online July 21, 2015