

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR –
ANNABA

جامعة باجي مختار -
عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUÉE

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat LMD

Domaine : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : PHYSIOLOGIE ET ENVIRONNEMENT

Intitulé

**«Effets d'un biopesticide l'Azadirachtine, sur la reproduction
d'un Lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia
kuehniella*».**

Presentée par : Mlle. TAFFAR Asma

**Directrice de thèse : YEZLI-TOUIKER S. (Dr, Université Badji Mokhtar -
Annaba)**

Devant un jury composé de :

Pr. SOLTANI N.	Président	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. BOUDJELIDA H.	Examineur	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. TAIBI F.	Examinatrice	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. TINE S.	Examineur	Université Larbi Tebessi - Tébessa
Pr. HAMAIDIA K.	Examinatrice	Université Cherif Messaidia Souk Ahra

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude avant tout à **Allah le majestueux, le miséricordieux** qui m'a donné la force, le courage et la volonté d'élaborer cette thèse.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur **SOLTANI Noureddine**, Professeur au département de Biologie et directeur du laboratoire de recherche (Laboratoire de Biologie Animale Appliquée), de m'avoir accueilli dans son laboratoire d'excellence et surtout de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Merci pour votre confiance durant toutes ces années, pour vos précieux conseils et votre aide.

A ma Directrice de thèse,

*Je témoigne une vive reconnaissance à ma chère Directrice de thèse, Docteur **YEZLI-TOUIKER Samira**, Maître de Conférences A au département de Biologie, Université de Badj Mokhtar Annaba, pour l'excellent encadrement fourni, son soutien, sa disponibilité et sa patience malgré ses nombreuses tâches. Grâce à ses conseils judicieux, 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 et encore bien pour son humanisme et sa gentillesse, Merci !*

*Toute ma reconnaissance à Monsieur **BOUDJELIDA Hamid**, Professeur au département de Biologie, Université de Badj Mokhtar Annaba, pour avoir pris de son temps et accepté d'examiner ce travail et de participer à ce jury.*

*Je suis très reconnaissante envers Madame **TAIBI Faïza**, Professeur au département de Biologie, Université de Badj Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de juger cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Toute ma considération à l'égard de Monsieur **TINE Samir**, Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université Larbi Tébessi Tébessa qui m'a fait l'honneur de juger le présent travail.*

*Mes plus vifs remerciements vont aussi à Madame **HAMAIDIA Kaouther** Professeur au Département de Biologie, Université Mohamed Cherif Messaïdia Souk-Ahras qui a bien voulu accepter d'être membre du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.*

*Je tiens également à remercier mes collègues du **Laboratoire de Biologie Animale Appliquée**, Université Badji-Mokhtar Annaba qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, leur compétence, soutien, et la bonne humeur qui régnait au laboratoire.*

SOMMAIRE

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	7
2.1. Présentation du matériel animal	7
2.1.1. Position systématique	7
2.1.2. Cycle biologique	8
2.1.3. Distinction des sexes	9
2.1.4. Technique d'élevage	10
2.2. Présentation de l'insecticide	10
2.2.1. Application du traitement	11
2.3. Tests de toxicité	11
2.4. Détermination du développement nymphal	11
2.5. Composition biochimique	12
2.5.1. Évaluation des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires)	12
2.5.2. Extraction et dosage des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires)	13
2.6. Analyse qualitative et quantitative des protéines ovariennes	14
2.6.1. Étude électrophorétique des protéines	14
2.6.1.1 Extraction des protéines ovariennes	14
2.6.1.2 Principe de l'électrophorèse	14
2.6.2. Dosage des protéines ovariennes	17
2.7. Étude morpho-métrique des ovaires	18
2.8. Étude histologique	18
2.9. Étude du potentiel reproducteur	20
2.10. Analyse statistique	21
3. RÉSULTATS	22
3.1. Tests de toxicité	22

3.1.1. Toxicité de l'azadirachtine sur l'inhibition de l'exuviation adulte.....	22
3.2. Effets de l'azadirachtine sur le développement d' <i>Ephestia kuehniella</i>	24
3.2.1. Effet de l'azadirachtine sur la durée du développement nymphal	25
3.2.2. Effet de l'azadirachtine sur les types morphologiques induits.....	25
3.2.3. Effet de l'azadirachtine sur l'évolution pondérale des chrysalides	28
3.3. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires).....	29
3.3.1. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitéllogénines dans le corps gras.....	30
3.3.2. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitellines ovariennes	32
3.4. Analyse qualitative et quantitative des protéines ovariennes	33
3.4.1 Effets de l'azadirachtine sur le taux des protéines ovariennes	33
3.4.2. Effets de l'azadirachtine sur la qualité des protéines ovariennes	35
3.5. Effet de l'azadirachtine sur la morpho-métie de l'ovaire.....	36
3.5.1. Effet de l'azadirachtine sur le poids frais des ovaires	36
3.5.2. Effet de l'azadirachtine sur le nombre d'ovocyte par paire ovaire.....	37
3.5.3. Effet de l'azadirachtine sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal.....	37
3.5.4. Effet de l'azadirachtine sur le volume de l'ovocyte basal	38
3.6. Étude histologique	38
3.6.1. Effets de l'azadirachtine sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux	38
3.7. Étude du potentiel reproducteur.....	41
3.7.1. Effets de l'azadirachtine sur la durée des périodes de préoviposition et d'oviposition	41
3.7.2 Effets de l'azadirachtine sur la fécondité et la viabilité des œufs pondus	41
4. DISCUSSION	43
4.1. Effets de l'azadirachtine sur l'inhibition de la mue adulte.....	43
4.2. Effet de l'azadirachtine sur la durée du développement nymphal	46
4.3. Effet de l'azadirachtine sur les types morphologiques induits	47
4.4. Effet de l'azadirachtine sur l'évolution pondérale des chrysalides	48
4.5. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitéllogénines et des vitellines	48

4.6. Effets de l'azadirachtine sur la quantité et la qualité des protéines ovariennes	50
4.7. Effets de l'azadirachtine sur la morphométrie des ovaires.....	52
4.8. Effets de l'azadirachtine sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire.....	54
4.9. Effets de l'azadirachtine sur l'épaisseur du chorion	56
4.10. Effets de l'azadirachtine sur le potentiel reproducteur	57
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	59
8. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	60
9. ANNEXE 1 : TABLEAU ET FIGURES	99
10. ANNEXE 2 : PRODUCTION SCIENTIFIQUE	
(publications et communications)	106
7. RÉSUMÉS	111
Français	111
Anglais	112
Arabe	113

**LISTE DES TABLEAUX
ET
FIGURES**

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	Dosage des vitéllogénines et des vitellines chez <i>Ephestia kuehniella</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	13
2	Composition des gels (Running gel, stacking gel).	15
3	Composition du tampon de migration (Running buffer).	15
4	Composition du tampon d'échantillon.	16
5	Composition de la solution de coloration.	17
6	Composition de la solution de rinçage.	17
7	Composition de la solution de décoloration.	17
8	Effets de l'azadirachtine, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> : Inhibition observée (%) de l'adulte. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	22
9	Effets de l'azadirachtine, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> : Inhibition corrigée (%) de l'adulte. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	23
10	Effets de l'azadirachtine, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> , sur le pourcentage d'inhibition corrigé de la mue adulte : Analyse de la variance à un critère de classification. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	23
11	Effets de l'azadirachtine, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> : Détermination des doses d'inhibition de la mue adulte (DI en μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.	24
12	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427 μg et DI ₅₀ : 1,063 μg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur la durée du développement nymphal ($m \pm sd$; $n = 12$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).	25
13	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427 μg et DI ₅₀ : 1,063 μg) sur l'évolution pondérale (mg) des chrysalides femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm sd$; $n = 6$).	28

LISTE DES TABLEAUX

14	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) sur l'évolution pondérale (mg) des chrysalides femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± sd ; n = 6). Analyse de la variance à deux critères de classification.	29
15	Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard.	29
16	Effets de l'azadirachtine, administrée par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitéllogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> (m ± sd ; n = 12).	31
17	Effets de l'azadirachtine, administrée par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitéllogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> (m ± sd ; n = 12). Analyse de la variance à deux critères de classification.	32
18	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) appliqué topiquement, sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg) chez les adultes femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> à l'émergence (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p < 0,05.	32
19	Poids moléculaires (PM) en kDa et la mobilité relative (RF) des protéines standards (a : myosine, 250 kDa ; b : phosphorylase, 100 kDa ; c : ovalbumine, 50 kDa ; d : anhydrase carbonique, 37 kDa et e : lysozyme, 20 kDa).	33
20	Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM kDa) des différentes fractions protéiques des ovaires d' <i>Ephestia kuehniella</i> témoins et traitées à l'azadirachtine (DI ₂₅ , DI ₅₀) administré par application topique à l'exuviation nymphal.	35
21	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur le poids frais (mg) des ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	37
22	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	37

LISTE DES TABLEAUX

23	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	38
24	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur le volume de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	38
25	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire (µm) (m ± sd ; n= 6) et l'épaisseur du chorion (µm) des ovocytes basaux mesuré à l'émergence adulte (m ± sd ; n= 6). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05.	39
26	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05.	41
27	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur la fécondité (nombre œufs pondus/ femelle) et la viabilité des œufs (pourcentage d'éclosion %) (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05.	42
28	Types morphologiques induits des nymphes témoins et traitées à l'azadirachtine aux deux doses (DI ₂₅ et DI ₅₀) d' <i>Ephestia kuehniella</i> nouvellement exuviées. (3 répétitions, n = 60). N : Adulte Normal ; M : Adulte Malformé ; MP : Mue Partielle ; MB : Mue Bloquée.	99

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Farine infestée par <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller, 1879) (Photos personnelles).	7
2	<i>Ephestia kuehniella</i> Zeller (1879) (×3) (Photo personnelle).	8
3	Cycle de développement d' <i>Ephestia kuehniella</i> à 27°C (Photos personnelles).	9
4	Distinction entre les deux sexes: mâle et femelle d' <i>Ephestia kuehniella</i> : femelle (×5,4) ; mâle (×6) (Photos personnelles).	10
5	Structure chimique de l'azadirachtine (Butterworth <i>et al.</i> , 1972).	11
6	Ovaires prélevés sous loupe binoculaire : (A) ovaire témoin ; (B) ovaire traité (DI ₂₅) ; (C) ovaire traité (DI ₅₀) (Gr : ×16) (Photos personnelles).	12
7	Accouplement: Mâle et femelle d' <i>Ephestia kuehniella</i> (Photo personnelle).	21
8	Effets de l'azadirachtine, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> : Inhibition corrigée de l'adulte et classement des doses testées par le test HSD de Tukey. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).	23
9	Effets de l'azadirachtine, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'exuviation chez <i>Ephestia kuehniella</i> : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose de l'azadirachtine (µg).	24
10	Les différents types morphologiques au cours du développement nymphal. A : Adulte normal (×4,6) ; B : Adulte malformé (×4,3) ; C : Mue partielle (×3,9) ; D : Mue bloquée (×5,3) (Photos personnelles).	26
11	Répartition (%) des différents types morphologiques observés chez les chrysalides témoins et traitées avec l'azadirachtine d' <i>Ephestia kuehniella</i> .	27
12	Dosage des vitélogénines dans le corps gras et des vitellines ovariennes, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg) (BSA).	30
13	Séparation électrophorétique des protéines ovariennes : courbe de référence exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du logarithme décimal du poids moléculaire.	34

LISTE DES FIGURES

14	Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines ovariennes des femelles adultes d' <i>Ephestia kuehniella</i> témoins et traitées avec l'azadirachtine : (A) témoin, (B) protéines standards, (C) DI ₂₅ et (D) DI ₅₀ à l'émergence adulte (<8h), comparée à celle des protéines marqueurs (a : myosine, 250 kDa ; b : phosphorylase, 100 kDa ; c : ovalbumine, 50 kDa ; d : anhydrase carbonique, 37 kDa et e : lysozyme: 20 kDa).	36
15	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire, l'épaisseur du chorion, les cellules folliculaires et les plaquettes vitelline. (A, B, C): ovocyte basal témoin; (D, E, F): ovocyte basal traité avec l'azadirachtine à la dose DI ₂₅ : 0,427µg; (G, H, I): ovocyte basal traité à l'azadirachtine à la dose DI ₅₀ : 1,063µg. (VO): ovocytes; (FE): Épithélium Folliculaire; (FC): Cellules Folliculaires; (Ch): Chorion; (YP): Plaquettes Vitellines. Barres d'échelle: 20 µm (A, D, G); 10 µm (B, E, H); 5 µm (C, F, I).	40
16	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur la durée du développement nymphal (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	99
17	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) sur l'évolution pondérale (mg) des chrysalides femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> au cours du temps (jours) durant la métamorphose (m ± sd ; n = 6). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	100
18	Effets de l'azadirachtine, administrée par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitélogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> (m ± sd ; n = 12). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	100
19	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg), sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg) à l'émergence chez les adultes femelles d' <i>Ephestia kuehniella</i> . (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05.	101
20	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) administré par application topique à l'exuviation nymphal d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± sd ; n = 6, p <0,0001). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à p > 0,05.	101

LISTE DES FIGURES

21	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur le poids frais (mg) des ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	102
22	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	102
23	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	103
24	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez <i>Ephestia kuehniella</i> sur le volume de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	103
25	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine administré par application topique (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire (A) et sur l'épaisseur du chorion (B) (µm) des ovocytes basaux mesuré à l'émergence adulte (m ± sd ; n= 6). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05	104
26	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05	104
27	Effet <i>in vivo</i> de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI ₂₅ : 0,427µg et DI ₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d' <i>Ephestia kuehniella</i> sur la fécondité (nombre d'œufs pondus / femelle) et la viabilité des œufs (pourcentage d'éclosion %) (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05.	105

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Nous sommes confrontés à un défi croissant de sécurité alimentaire mondiale alors que la population humaine continue de croître à travers le monde (Montauban *et al.*, 2021), en effet, la population mondiale devrait atteindre près de 10 milliards d'ici 2050, l'augmentation de la production alimentaire est donc le principal objectif de tous les pays (Kaur et Garg, 2014), ainsi, L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a suggéré que cette dernière doit être augmentée de 70% (Popp *et al.*, 2013). Toutefois cela n'a jamais été suffisant à cause de la présence des autres espèces qui sont en concurrence avec nos ressources alimentaires dont les insectes, représentent le groupe le plus grand et le plus diversifié en espèces (Bhumi *et al.*, 2017). Considérés comme l'un des problèmes majeurs en agriculture, les insectes ravageurs sont classés aujourd'hui dans la catégorie des risques sanitaires (Dureau, 2020), ils peuvent être vecteurs d'agents pathogènes (White *et al.*, 2014 ; Govindarajan et Rajeswary, 2015) et constituent une menace pour les animaux dont l'homme.

L'entomologie des produits stockés met l'accent sur les insectes nuisibles, en effet, environ 70 espèces de papillons nocturnes, principalement dans les familles Pyralidae, Tineidae, Oecophoridae, et Gelechiidae, sont associées à une infestation de produits stockés tels que les céréales, légumineuses, graines, épices, fruits séchés et noix, ainsi que d'autres produits de base, secs et durables (Hagstrum et Subramanyam, 2009 ; Tarlack *et al.*, 2014). La pyrale méditerranéenne de la farine, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae) est l'un des ravageurs les plus importants (Kurtuluş *et al.*, 2020) ; Elle est trouvée principalement dans les moulins où la farine et d'autres céréales sont stockés (Pakyari *et al.*, 2016). Cette espèce est nuisible non seulement parce qu'elle détruit ou détériore une quantité assez considérable des produits lorsque elle s'en nourrit, mais aussi parce qu'elle les contamine avec ses excréments et surtout avec les fils de soie (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012) qui transforment la farine en une sorte de feutrage, mais aussi et surtout parce qu'elle empêche le fonctionnement régulier des appareils et des arrêts forcés du moteurs dans les moulins, par les feutrages formés par les larves (Pandir *et al.*, 2013).

Dans le but de contrôler l'abondance des ravageurs dans les denrées emmagasinées, de nombreux moyens ont été consacrés pour prévenir les pertes dans les stocks, parmi lesquels la lutte chimique est la méthode la plus largement utilisée avec différents insecticides chimiques synthétiques ; Cependant les risques inhérents à l'utilisation de ces produits et leur énorme impact négatif sont une préoccupation constante. Les applications à long terme d'insecticides

synthétiques ont entraîné non seulement, des effets dramatiques sur la biodiversité et les écosystèmes mais aussi une importante pollution de l'environnement (Gupta et Milatovic, 2014) ainsi, l'Homme souffre de diverses affections et maladies (respiratoires, immunitaires, cancers...etc) suite à des désordres dans le développement des organes et/ou dans la physiologie de diverses fonctions de l'organisme (Nicolopoulo-Stamati *et al.*, 2016 ; Mossa, 2016). Ces pratiques ont aussi conduit à l'apparition de la résistance au sein des populations de ravageurs (Drabo *et al.*, 2019). L'utilisation des pesticides synthétiques a connu un développement important et différents éléments ont favorisé cet essor : l'accroissement démographique de la population humaine (obligation d'augmenter la productivité agricole), l'affaiblissement des terres cultivées (épidémies dans les cultures), l'apparition du machinisme agricole ainsi que les progrès importants dans le domaine de la chimie organique de synthèse (Louat, 2013). L'utilisation des organochlorés a été fortement réduite dans certaines parties du monde dès 1970 et plusieurs de ces composés ont été retirés du marché des pesticides comme le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane) interdit en 1972 (Jayaraj *et al.*, 2016). Des molécules synthétiques à moindre impact environnemental, alternative aux pesticides conventionnels, ont pu être développées puis commercialisées par des firmes phytosanitaires. Ces molécules sont représentées par les perturbateurs de développement des insectes (Insect Growth Disruptors ou IGDs) anciennement connus sous le nom de régulateurs de croissance (Dhadialla *et al.*, 2005, 2010 ; Hamilton *et al.*, 2020). Parmi ces composés se trouvent les agonistes et antagonistes de l'hormone juvénile ou « HJ » mais aussi les inhibiteurs de la synthèse de la chitine composé majeur de la cuticule ; ces composés présentent l'avantage, comparativement à d'autres pesticides d'être faiblement voire moins toxiques pour les mammifères, les oiseaux, les poissons ainsi que pour un certain nombre d'insectes auxiliaires (Pener et Dadhialla, 2012).

Parallèlement à ces développements, un regain d'intérêt pour l'utilisation de composés naturels a réapparu. Actuellement, ils sont classés en trois grandes catégories selon leur origine (microbienne, végétale ou animale) et présentent de nombreux avantages (Deravel *et al.*, 2014). Ils peuvent être aussi bien utilisés en agriculture conventionnelle qu'en agriculture biologique, certains permettent aux plantes de résister à des stress abiotiques et d'une manière générale, ils sont beaucoup moins nocifs que leurs homologues chimiques. Rahardjo *et al.*, 2020 ont rapporté que l'application d'extrait de plante ayant un effet insecticide est considérée comme une alternative prometteuse pour réduire les effets négatifs des pesticides synthétiques. Les biopesticides ont fait l'objet d'un intérêt croissant de la part des exploitants, (Deravel *et al.*, 2014) ; Ce sont des agents potentiels de lutte biologique et constituent une

composante importante au sein de systèmes de gestion intégrée des insectes ravageurs ; Très développés à travers le monde ces dernières années, leur principe d'action repose sur l'action inhibitrice de la nutrition et de la croissance des insectes ravageurs de culture ; Leur efficacité dans l'amélioration de la productivité et la maîtrise des insectes ravageurs dépendent de l'utilisation de la dose optimale (Gougbe-Semako *et al.*, 2021). De plus, ils sont rapidement biodégradables et ils ont la capacité de se décomposer rapidement et sont donc intrinsèquement moins toxiques pour l'environnement et l'homme ainsi que pour les espèces non ciblées et ne laissent pas de résidus nocifs, ils sont moins chères (Sporleder et Lacey, 2013 ; Batabyal, 2021) et plus sélectives dans leur action que les insecticides synthétiques (Pintong *et al.*, 2020). Leur apparition sur le marché de pesticides s'est faite grâce à l'essor de la biotechnologie et à la mise en place du processus du développement durable (Sporleder et Lacey, 2013).

Parmi ces molécules se trouve une molécule fortement recommandée dans la lutte intégrée : l'azadirachtine (Shelton *et al.*, 2004) qui est devenu un bio-pesticide très puissant (Chaudhary *et al.*, 2017) et qui est généralement choisi parmi les insecticides botaniques pour lutter contre différents insectes ravageurs dans diverses cultures (Darabian *et al.*, 2017 ; Camarda *et al.*, 2018 ; Muhammad *et al.*, 2018). L'azadirachtine, triterpénoïde provenant des grains d'*Azadirachta indica*, A. Juss, arbre de la famille des Meliaceae et originaire d'Asie du Sud-est (Schmutterer, 1990). L'azadirachtine représente le limonoïde actif le plus puissant et constitue l'un des principaux biopesticides commercialisés dans le monde sous plusieurs formulations (Huile de Neem, Neem Azal, Bioneem) (Mordue *et al.*, 2005 ; Isman, 2006 ; Isman et Grieneisen, 2014). L'azadirachtine constitue le pesticide utilisé avec succès dans les agro-écosystèmes (Isman, 2006). il est aussi utilisé dans la médecine traditionnelle, en Asie et en Afrique, comme un antidiabétique, immunostimulant, antimicrobien, antiviral, contraceptif et anti cancéreux (Korim, 2013 ; Hao *et al.*, 2014 ; Hummel *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016). La littérature précise que ce pesticide pouvait interagir avec les récepteurs de l'acide rétinoïque et exercer des réponses anti-inflammatoires et anti-métastatiques dans les lignées cellulaires humaines (Lim, 2014). L'azadirachtine est également utilisée comme anti acariens pour la literie humaine (Denardi *et al.*, 2010). L'azadirachtine possède une forte toxicité contre différents insectes (lépidoptères, diptères, coléoptères, hyménoptères, hétéroptères, homoptères et hémiptères) et autres arthropodes (Mordue *et al.*, 2005 ; Morgan, 2009 ; Benelli *et al.*, 2017), mais aussi contre les nématodes, les annélides et les champignons pathogènes (Mordue *et al.*, 2005 ; Saleem *et al.*, 2018 ; Chutulo *et al.*, 2018). Il est particulièrement efficace contre la majorité des insectes phytophages, comme les aleurodes,

les pucerons, les doryphores, les thrips, les charançons, les larves de papillons, la pyrale, les cochenilles, la noctuelle de la tomate et diverses espèces de mouches (Aribi *et al.*, 2020). Cette molécule a une biodégradation rapide et ne pose pas de problème de résistance en raison de sa complexité chimique (Mordue *et al.*, 2005 ; Benelli *et al.*, 2017). Ce pesticide naturel est aussi cité comme moins nocif pour l'environnement et les organismes non visés par rapport à la plupart des insecticides conventionnels (Lai *et al.*, 2014 ; Benelli *et al.*, 2017). Il est noté comme non-toxique pour les humains et les vertébrés à sang chaud (Mordue *et al.*, 2005) et sans génotoxicité pour les mammifères (Celestino *et al.*, 2014 ; Saxena et Kesari, 2016). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence la toxicité des produits du neem sur des espèces non visées, mais les résultats restent contradictoires (Banerjee *et al.*, 2014 ; Lima *et al.*, 2015 ; Luna-Cruz *et al.*, 2015 ; Barbosa *et al.*, 2015 ; Turchen *et al.*, 2016 ; Bernardes *et al.*, 2016). En effet, des altérations comportementales et morphologiques ont été mises en évidence chez les abeilles par Barbosa *et al.*, 2015 mais ces auteurs ne notent aucun effet sur la mortalité des abeilles ouvrières, le vol, ou encore la respiration ; par ailleurs, chez les organismes aquatiques, l'azadirachtine est utilisé comme un immunostimulant potentiel et un agent prometteur pour le contrôle des parasites de poissons (Banerjee *et al.*, 2014).

L'azadirachtine agit, cependant, de manière similaire à un perturbateur du développement (Benelli *et al.*, 2017). En effet, l'action majeure de l'azadirachtine résulte dans sa capacité à inhiber les deux principales hormones de la reproduction et du développement, l'hormone juvénile « HJ » et la 20 hydroxyecdysone (20E) induisant des effets délétères sur ces processus physiologiques (Mordue *et al.*, 2005 ; Morgan, 2009). L'azadirachtine agit donc de manière similaire à un IGD mais montre, en outre, des effets qui peuvent varier selon sa formulation (Abedi *et al.*, 2014 ; Da Costa *et al.*, 2014). L'azadirachtine induit des anomalies dans la mue et affecte le développement ovarien, la structure de l'ovocyte, la fécondité, la ponte et la viabilité des œufs chez les diptères et lépidoptères (Mordue *et al.*, 2005 ; Lucantoni *et al.*, 2006 ; Abedi *et al.*, 2014 ; Dembo *et al.*, 2015 ; Evans et Hallett, 2016 ; Aribi *et al.*, 2017 ; Shu *et al.*, 2021). De plus, plusieurs études montrent que l'azadirachtine influence le comportement d'oviposition chez plusieurs insectes (Blaney *et al.*, 1990 ; Ma *et al.*, 2000 ; Charleston *et al.*, 2006 ; Cordeiro *et al.*, 2010 ; Hasan et Ansari, 2011 ; Tomé *et al.*, 2013 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016 ; Manna *et al.*, 2020). L'azadirachtine montre aussi une forte cytotoxicité, des effets antimitotiques et induit l'apoptose (Mordue *et al.*, 2005, 2010 ; Huang *et al.*, 2011 ; Qiao *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015 ; Remedio *et al.*, 2015, 2016). Cette molécule peut aussi par des effets anti appétants agir sur le mouvement naturel de l'intestin, provoquant une paralysie et le dépérissement des organismes cibles (Schmutterer et Singh,

1995 ; Chaudhary *et al.*, 2017 ; Shu *et al.*, 2018). L'azadirachtine affecte, non seulement, le stress, l'immunité (Lynn *et al.*, 2012 ; Koodalingam *et al.*, 2014 ; Shaurub *et al.*, 2014) et la chemoréception (Capinera et Froeba, 2007) mais agit aussi sur l'expression des gènes liés au développement chez les insectes *Plodia interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012) et *Drosophila melanogaster* (Lai *et al.*, 2014). Gulzar *et al.*, 2019 ont rapporté que l'azadirachtine fonctionnait sur *Earias vittella* (Lépidoptères : Noctuidae) en exerçant des effets toxiques sur les cellules neurosécrétoires et sur le système endocrinien. En outre, il est aussi noté que l'azadirachtine interfère avec le système nerveux central (SNC) par inhibition de la transmission cholinergique excitatrice *via* les canaux calciques (Qiao *et al.*, 2014) mais aussi sur la voie de signalisation de l'insuline (Shao *et al.*, 2016).

Néanmoins, malgré l'intérêt que cette molécule a suscité ces quatre dernières décennies, le ou les mécanismes d'action de l'azadirachtine à l'origine de son effet insecticide restent encore à définir (Mordue *et al.*, 2005 ; Benelli *et al.*, 2017) et la définition de l'interrelation entre la structure de la molécule et son activité semble cruciale afin de comprendre les interactions moléculaires effectivement responsables des différentes bioactivités de l'azadirachtine (Fernandez *et al.*, 2019).

Par conséquent, la présente étude a pour but d'évaluer les effets d'une formulation commerciale de l'azadirachtine : le Neem Azal, sur la reproduction d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* Zeller. Cette espèce est considérée comme un modèle important pour étudier les interactions entre les pesticides et les insectes car elle a un cycle de vie court, un potentiel de reproduction élevé et un élevage simple en conditions de laboratoire (Shahriari *et al.*, 2018 ; Bendjedid *et al.*, 2021 ; Taffar *et al.*, 2021).

L'étude a été réalisée *in vivo* et comporte les objectifs suivants :

- Évaluer la toxicité de l'azadirachtine par application topique sur les chrysalides nouvellement exuviées (<8h) d'*Ephestia kuehniella* Zeller et la détermination des doses sublétales et létales de l'inhibition de la mue adulte (DI₂₅ et DI₅₀) et de leurs intervalles de confiance respectifs.

Par la suite:

- Évaluer les effets sublétaux et létaux (DI₂₅ et DI₅₀) de l'azadirachtine sur la durée du développement nymphal, les types morphologiques induits, et sur l'évolution pondérale de chrysalides.

- Tester l'effet de l'azadirachtine sur le contenu des vitéllogénines et des vitellines dans le corps gras les ovaires respectivement.
- Examiner l'effet de l'azadirachtine sur l'aspect qualitatif et quantitatif des protéines ovariennes durant la reproduction.
- Évaluer les effets de l'azadirachtine sur l'aspect morpho-métrique de l'ovaire.
- Évaluer les effets sublétaux et létaux (DI_{25} et DI_{50}) de l'azadirachtine sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux.
- Étude de l'effet de l'azadirachtine sur le potentiel reproducteur.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Présentation du matériel animal

Ephestia kuehniella Zeller (1879) est un ravageur majeur dans les minoteries (Trematerra et Gentile, 2010) ; appelée communément «pyrale de la farine», c’est une mite des denrées stockées dont les larves s’attaquent essentiellement à la farine (Fig. 1), aux grains de céréales (blé, maïs, riz), la semoule, les pâtes alimentaires et aux fruits secs (raisins, figues, abricots) (Sedlacek *et al.*, 1995 ; Tarlack *et al.*, 2014).



Figure 1. Farine infestée par *Ephestia kuehniella* Zeller (1879) (Photos personnelles).

2.1.1. Position systématique

Ephestia kuehniella Zeller est un insecte holométabole micro lépidoptère de la famille des pyralidés (Momen *et al.*, 2007) (Fig. 2), constitue un groupe d’insectes important dans l’ordre des lépidoptères. La classification de cette espèce selon le Centre National d’Information sur la Biotechnologie « NCBI » (2018) est la suivante :

Règne :	Animalia
Sous-règne :	Metazoa
Embranchement :	Anthropoda
Sous-embranchement :	Hexapoda
Classe :	Insecta
Ordre :	Lepidoptera
Famille :	Pyralidae
Genre :	<i>Ephestia</i>
Espèce :	<i>kuehniella</i> (Zeller, 1879)



Figure 2. *Ephestia kuehniella* Zeller (1879) (×3) (Photo personnelle).

2.1.2. Cycle biologique

Chez *Ephestia kuehniella*, la durée totale du cycle de développement dure environ 61 jours à une température constante de ($27^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) (Pakyari *et al.*, 2018), et une humidité relative de 70% (Vieira *et al.*, 1992). Le cycle de vie comporte quatre stades bien déterminés : œuf, larve ou chenille, nymphe ou chrysalide et adulte ou imago (Fig. 3).

- **L'œuf** : de couleur blanchâtre et de forme ovoïde ; sa durée d'incubation est de 3 à 14 jours (Balashowsky, 1972) en rapport avec la température ambiante ; il mesure $460\ \mu\text{m}$ de longueur et $230\ \mu\text{m}$ de largeur (Hami *et al.*, 2004 ; Yezli-Touiker *et al.*, 2016).
- **La larve ou chenille** : elle passe par six stades larvaires. La larve du premier stade mesure de 1 à 1,5 mm de long, elle peut atteindre jusqu'à 15 à 20 mm au stade final. Dès son exuviation, la larve se nourrit directement de la farine, elle est de couleur blanche virant légèrement vers le rose (Taibi, 2007).
- **La chrysalide ou nymphe** : la larve du dernier stade subit une mue nymphale et devient chrysalide. De profonds remaniements se manifestent, ça consiste en la destruction des organes larvaires et à l'édification de ceux de l'adulte, notamment la maturation sexuelle (Cassier, 1996). La nymphe est de couleur blanchâtre et devient de plus en plus foncée avec l'âge. Entourée d'un cocon de soie blanche contenant des substances nutritives, la chrysalide aboutit à un adulte après une durée du développement nymphale variant de 8 à 12 jours (Ozer, 1953).
- **L'adulte** : la chrysalide subit une mue imaginale apportant les dernières modifications en réalisant l'insecte parfait qui est un papillon de 20 à 25 mm d'envergure, les ailes antérieures sont grisâtres satinées, avec des points noirs, les ailes postérieures sont blanchâtres finement frangées. Les femelles adultes pondent juste après l'accouplement qui aura lieu quelques heures après l'émergence et la

fécondité est de 200 - 300 œufs en amas au fond et sur les parois des sacs de farine (Balashowsky, 1972).

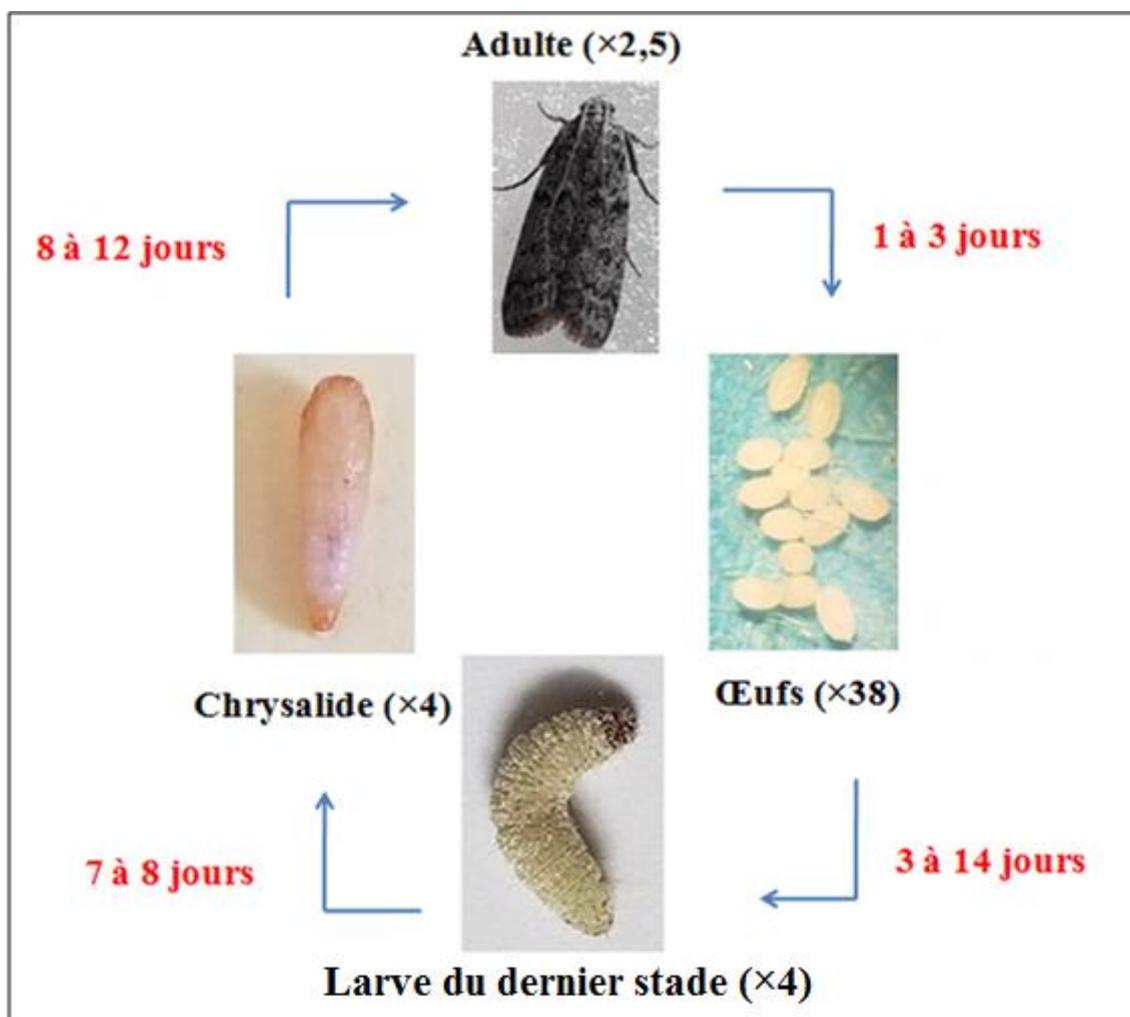


Figure 3. Cycle de développement d'*Ephestia kuehniella* à 27°C (Photos personnelles).

2.1.3. Distinction des sexes

Chez *Ephestia kuehniella*, il est difficile de distinguer les mâles des femelles au stade adulte ; la séparation des sexes se fait plus facilement chez la larve qui est caractérisée par la présence de deux tâches noires, visibles à travers l'épiderme de la surface dorsale qui correspondent à la paire de testicules (Fig. 4).

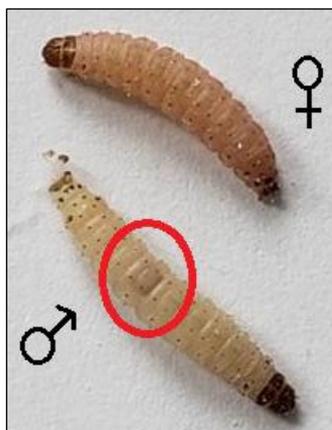


Figure 4. Distinction entre les deux sexes: mâle et femelle d'*Ephestia kuehniella* : femelle (×5,4) ; mâle (×6) (Photo personnelle).

2.1.4. Technique d'élevage

Les adultes proviennent de la [Société Nationale de Semoule, Pâtes Alimentaires et Couscous \(SN-SEMPAC\)](#) d'Annaba. L'élevage est conduit au laboratoire à une température de 27°C et une humidité relative voisine à 70% selon les indications de [Payne \(1966\)](#). Les larves du dernier stade triées, sont déposées dans des boîtes en plastique contenant de la farine et du papier plissé pour qu'elles puissent se nymphoser. L'élevage est suivi quotidiennement.

2.2. Présentation de l'insecticide

L'azadirachtine commercialisée sous le nom de Neem Azal-T/S comprend seulement de l'azadirachtine (1% d'azadirachtine ; Emulsion Concentrée (EC); firme : Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany). Sa masse molaire est de 720,7g/mol, et sa formule chimique : $C_{35}H_{44}O_{16}$ ([Fig. 5](#)). Cette formulation, insoluble dans l'eau, correspond à un liquide brun avec une odeur caractéristique du neem. La solution est conservée au frais et à l'abri de la lumière. Selon l'entreprise SIPCAM INAGRA spécialisé dans la protection des végétaux, l'azadirachtine est utilisé en Algérie sous le nom de Bioaza depuis 1991 jusqu'à aujourd'hui, il est homologué aux USA depuis 1999 et en Europe depuis le 21 octobre 2013 ([Journal Officiel de l'Union Européenne](#)).

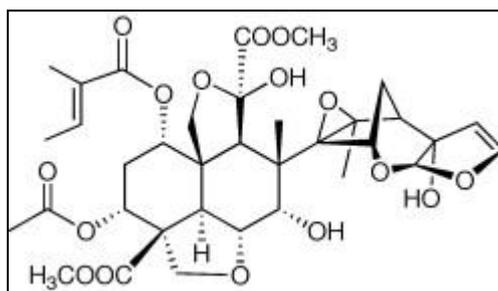


Figure 5. Structure chimique de l'azadirachtine (Butterworth *et al.*, 1968).

2.2.1. Application du traitement

L'azadirachtine a été testé par application topique (2 μ l) sur la face ventrale de l'abdomen des chrysalides nouvellement exuviées (<8h) d'*Ephestia kuehniella*. L'insecticide a été dilué dans l'acétone (solvant) et différentes solutions stocks ont été préparées. Les témoins ont reçu 2 μ l d'acétone. Les chrysalides traitées et témoins sont ensuite déposées dans des boîtes de Pétri, puis conservées dans une étuve à 27°C.

2.3. Tests de toxicité

Après un screening préalable, les concentrations utilisées sont de : 500 ; 1000 ; 1500 ; 2000 ; 2500 et 3500 ppm correspondant respectivement aux doses : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3,5 μ g / pupes. L'essai pour chaque dose est conduit en utilisant 3 répétitions qui comportent chacune 30 insectes ; une série témoin est conduite en parallèle.

Les pourcentages d'inhibition observée des différentes séries ont été déterminés puis corrigés selon la formule d'Abbott (1925) pour éliminer la mortalité naturelle. Les pourcentages d'inhibitions corrigée subissent une transformation angulaire selon les tables de Bliss (1938), cités par Fisher et Yates (1957) et font l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification qui permet le classement des doses par le test HSD de Tukey, afin d'évaluer l'effet de l'insecticide. Enfin, la régression non linéaire exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose a permis d'estimer les doses d'inhibition de la mue adulte DI₁₀, DI₂₅, DI₅₀ et DI₉₀ avec leurs intervalles de confiance.

2.4. Détermination du développement nymphal

L'azadirachtine a été testé *in vivo* par application topique aux deux doses (DI₂₅ : 0,427 μ g ; DI₅₀ : 1,063 μ g) sur des chrysalides nouvellement exuviées (<8h) d'*E. kuehniella* afin de

déterminer ses effets sur le développement nymphal. Le développement a été suivi quotidiennement jusqu'à l'émergence adulte. Plusieurs paramètres ont été déterminés :

- La durée du développement nymphal (jours) ; $n = 12$.
- La détermination des types et taux morphologiques induits (trois répétitions ont été effectuées pour les chrysalides témoins et traitées, pour un total de 60 insectes).
- Évolution pondérale des chrysalides (mg) tout au long du stade pupal (0, 1, 3, 5, 7 et 9 jours) à l'aide d'une balance de précision (Sartorius AG Gottinger, Germany).

2.5. Composition biochimique

2.5.1. Évaluation des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires)

Les femelles des séries témoins et traitées à l'azadirachtine aux deux doses sublétales et létales (DI_{25} , DI_{50}) sont disséquées sous une loupe binoculaire :

- Les corps gras ont été prélevés à partir des chrysalides femelles des séries témoins et traitées à différents âges (0, 1, 3, 5 et 7 jours).
- Les ovaires ont été prélevés à partir des adultes femelles des séries témoins et traitées sous loupe binoculaire (Fig. 6).

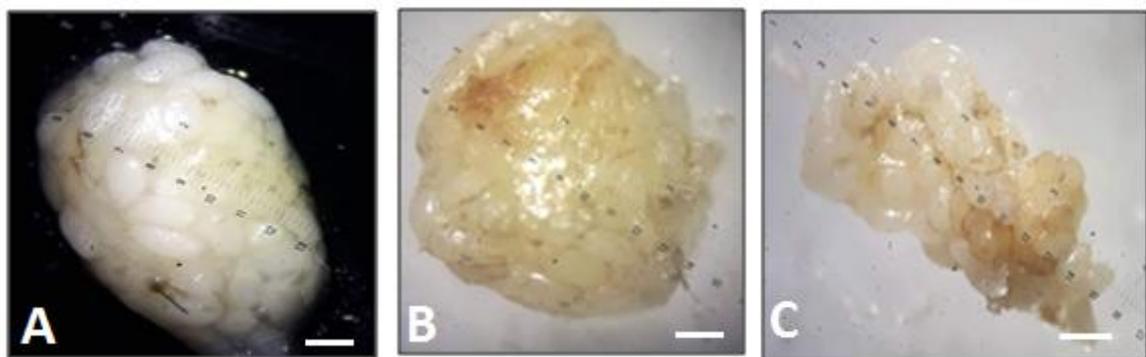


Figure 6. Ovaires prélevés sous loupe binoculaire : (A) ovaire témoin ; (B) ovaire traité (DI_{25}) ; (C) ovaire traité (DI_{50}) (Gr : $\times 16$) (Barre d'échelle : $10\mu\text{m}$) (Photos personnelles).

Les corps gras ainsi que les ovaires ; ont été pesés et déposés dans des tubes contenant un tampon (Tris-HCL-NaCl) (pH 7,4 ; 0,5 M) ¹ permettant l'extraction des vitéllogénines et des vitellines. La conservation se fait à (-20°C) jusqu'au dosage.

[1] (3,02g de Tris + 300ml d'eau distillé, puis ajusté avec l'HCL et complété à 500ml d'eau distillé : il en résulte une solution mère de Tris-HCL ; 2,9g de NaCl sont alors diluer dans 10ml de solution mère de Tris-HCL ; pour obtenir le tampon complet).

2.5.2. Extraction et dosage des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires)

L'extraction des vitéllogénines et des vitellines est réalisée selon la méthode de Postlethwait *et al.*, (1980) et Fabre *et al.*, (1990). Les échantillons biologiques, conservés dans 500µl de tampon d'extraction (Tris-HCL-NaCl) ¹, sont broyés aux ultrasons. L'homogénat obtenu est centrifugé à 5000 trs/min pendant 10 minutes. Il en résulte 3 couches distinctes : une couche surnageante qui représente les lipides, un culot contenant des glycoprotéines et une couche intermédiaire renfermant les vitéllogénines et les vitellines. La fraction soluble obtenue est récupérée puis déposée dans un tube Eppendorf. Les échantillons sont ensuite conservés au froid (-20°C) jusqu'au dosage.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G 250 (BBC) ² comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (1mg/ml) comme standard, dans une fraction aliquote de 100µl. La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 595nm contre un blanc de gamme (Tab. 1).

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

Tableau 1. Dosage des vitéllogénines et des vitellines chez *Ephestia kuehniella* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

2.6. Analyse qualitative et quantitative des protéines ovariennes

2.6.1. Étude électrophorétique des protéines

2.6.1.1 Extraction des protéines ovariennes

Les ovaires (pools de 12 paires) sont prélevés des femelles adultes (<8h) d'*E. kuehniella* témoins et traitées *in vivo* avec l'azadirachtine aux deux doses (DI₂₅ : 0,4277µg et DI₅₀ : 1,063) ; les échantillons sont conservés dans une solution de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) à 0,1% dans l'eau distillée.

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

2.6.1.2 Principe de l'électrophorèse

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

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

➤ Montage de l'appareil

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

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

Les gels sont préparés extemporanément. On coule d'abord le gel de séparation ou running gel (12,5 %) entre la plaque d'alumine et la plaque de verre et on laisse polymériser pendant 30 mn (Tab. 2).

On prépare ensuite le gel de concentration (4,5%) ou stacking gel, que l'on fait couler jusqu'aux bords des plaques. On place enfin les peignes qui serviront au moulage des dix chambres de dépôt, puis on laisse polymériser pendant 30 mn. Après polymérisation du gel de concentration, on remplit la cuve de tampon de migration ou running buffer (Tab. 3). On enlève délicatement le peigne, les puits sont prêts pour le dépôt des échantillons.

Tableau 2. Composition des gels (Running gel, stacking gel).

Produits		Stacking gel	Running gel
Acrylamide 30%	(ml)	1,50	5,30
Eau distillée	(ml)	5,70	6,80
Upper buffer	(ml)	1,20	-
SDS 10%	(ml)	-	0,20
Sucrose 55%	(ml)	-	2,50
Lower buffer	(ml)	-	5,00
Amonium persulfate	(ml)	0,30	0,20
Temed	(ml)	0,01	0,025

Tableau 3. Composition du tampon de migration (Running buffer).

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

➤ **Dépôt des échantillons et migration**

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans une solution tampon (Tab. 4). La détermination du volume de l'échantillon a été obtenue à partir du dosage des protéiques dans les échantillons. Au niveau de chaque chambre de dépôt, on introduit 10 à 15 µl d'échantillon biologique à l'aide d'une micro seringue.

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

Tableau 4. Composition du tampon d'échantillon.

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

➤ **Coloration**

À la fin de la migration, les gels sont placés dans la solution de coloration (Tab. 5) pendant 24 heures sous agitation. Elle permet la révélation des bandes protéiques. Les gels subissent ensuite 2 à 3 bains successifs d'acide acétique à 10 % afin d'éliminer l'excès de colorant. Un dernier bain est effectué dans une solution de rinçage pour obtenir une meilleure visualisation des bandes protéiques. La décoloration (Tab. 7) du fond du gel est effectuée avec deux bains d'acide acétique à 10% (1 heure chacun). La procédure prend fin lorsque l'acide devient clair. Le gel est alors fixé pendant 15 min dans la solution de rinçage (Tab. 6).

Tableau 5. Composition de la solution de coloration.

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

Tableau 6. Composition de la solution de rinçage.

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

➤ **Décoloration**

Tableau 7. Composition de la solution de décoloration.

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

2.6.2. Dosage des protéines ovariennes

Les femelles des séries témoins et traitées sont disséquées sous une loupe binoculaire et les ovaires prélevés sont débarrassés du corps gras puis conservés dans des tubes Eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20%.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de [Bradford \(1976\)](#) qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie ² comme réactif et l'albumine de sérum boeuf (Sigma Life Science, Allemagne) comme standard (1mg/ml), dans une fraction aliquote de 100µl.

Les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme ([Tab. 1](#)).

2.7. Étude morphométrique des ovaires

Les ovaires sont prélevés des séries témoins et traitées avec l'azadirachtine (DI₂₅, DI₅₀) à l'émergence des femelles (<8h) dans le but de voir les différents paramètres morphométriques :

- Le poids frais des ovaires, déterminé à l'aide d'une balance [Sartorius Handy](#), avec une précision de ± 0,1 mg.
- Le nombre des ovocytes par paire d'ovaires, la longueur (L) et la largeur (l) de l'ovocyte basal.
- Le volume (V) exprimé en mm³ est obtenu grâce à la formule suivante ([Lumbreas et al., 1991](#)) :

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

2.8. Étude histologique

L'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux des séries témoins et traitées à l'azadirachtine aux doses sublétales et létales (DI₂₅ et DI₅₀) ont été déterminées sur des coupes semi-fines préparées selon la technique histologique, réalisées selon les indications de [Martoja et Martoja \(1967\)](#). Les échantillons doivent passer par plusieurs étapes afin d'éviter toute altération des tissus et assurer la stabilité de leurs structures macromoléculaires. Ces étapes sont : fixation, inclusion, confection des coupes, coloration, et montage.

- **Fixation** : cette étape a pour but la conservation des structures contre l'attaque microbienne et l'opposition à l'autolyse des constituants fondamentaux sous l'effet d'enzymes cellulaires pour éviter la destruction des protéines des tissus, le

durcissement des pièces de façon à faciliter les coupes et la préparation de l'échantillon aux traitements ultérieurs, notamment en augmentant l'affinité du protoplasme pour les colorations. La fixation a été réalisée sur l'ovaire dans du Bouin alcoolique (formol 26 ml, acide acétique 7 ml, 45ml de solution d'acide picrique à 1 % dans l'alcool 95° et 22 ml d'eau distillée) pendant 48h.

- **Inclusion** : la pièce fixée, doit être incluse dans une matière plastique chimiquement neutre. Le principe de l'inclusion consiste à traiter les pièces dans un ordre déterminé par différents solvants de manière à faire pénétrer dans un tissu, à l'origine hydraté, une substance hydrophobe, qui maintiendra ses éléments en place lors de la coupe : ceci implique que la pièce soit soumise à une série de traitements successifs par des mélanges dont chacun est destiné à préparer la pénétration de celui qui le suivra et à éliminer celui qui l'a précédé. Chaque solvant doit être évidemment miscible à celui qui le précède et à celui qui le suit. On procède tout d'abord à deux bains de 24h dans l'alcool 95°, puis à trois bains de 24h dans le butanol (liquide d'attente ou intermédiaire), ensuite on passe à l'inclusion dans la paraffine. On effectue d'abord une imprégnation par plusieurs bains de paraffine. La mise en bloc se fait dans des cassettes en plastique, qui nous donne des blocs de paraffine, avec la pièce à l'intérieure.
- **Confection des coupes** : les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome (Stassinier LEICA AN 2125 RT) qui comporte un support de rasoir, un support d'objet et un système d'avance mécanique. Le bloc, contenant la pièce est taillé et fixé sur le porte objet sous l'action de la chaleur. L'excès de paraffine, entourant la pièce est enlevé, avec une lame de scalpel. Le bloc est orienté parallèlement au rasoir. On obtient ainsi des rubans droits de paraffine. L'épaisseur des coupes est de 5 à 7 μ m.
Les rubans obtenus mis sur des lames soigneusement nettoyées, marquées avec une pointe de diamant sur lesquelles on dispose de l'eau gélatinée, qui permet de coller les rubans des coupes. La lame est mise sur une platine chauffante (20°C), Ces lames sont mises dans une étuve à 37°C pendant 24h afin de compléter le séchage des coupes.
- **Déparaffinage et coloration** : le déparaffinage élimine le milieu d'inclusion et précède la coloration. Les coupes sont d'abord traitées par le xylène (3 bains de 3 minutes chacun). Elles sont ensuite plongées dans trois bains d'alcool 95° (2 minutes

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

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

Les épaisseurs ont été déterminées et traitées à l'aide d'un microscope Leica DM500 équipé d'une caméra Leica ICC50 HD, les observations faites étaient en termes de 6 mesures à l'aide du logiciel Las EZ Leica.

2.9. Étude du potentiel reproducteur

Les adultes femelles nouvellement émergées issues des séries témoins et traitées et qui ont survécu au traitement des chrysalides (0 jour) à l'azadirachtine (DI₂₅ et DI₅₀), ont été placées dans des boîtes de Pétri avec des adultes mâles témoins nouvellement émergés.

3 sortes de couples ont été formées:

Couple 1 : F_T × M_T : Femelle _{Témoin} × Mâle _{Témoin}

Couple 2 : F_{DI25} × M_T : Femelle _{DI25} × Mâle _{Témoin}

Couple 3 : F_{DI50} × M_T : Femelle _{DI50} × Mâle _{Témoin}

Pour chaque couple, 12 répétitions ont été réalisées. Les boîtes de Pétri portant la date du traitement sont placées dans l'étuve à une température de 27°C afin de suivre quotidiennement le développement. L'accouplement (Fig. 7), c'est-à-dire la rencontre entre le mâle et la femelle survient peu de temps après l'émergence. La mort de la femelle survient généralement peu de temps après la fin de la période de ponte.



Figure 7. Accouplement : Mâle et femelle d'*Ephestia kuehniella* (Photo personnelle).

Plusieurs paramètres du potentiel reproducteur ont été déterminés à savoir :

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

2.10. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont représentés par la moyenne suivie de l'écart type pour chaque groupe d'expérience ($m \pm sd$). La régression non linéaire, le test « t » de Student ($p \leq 5\%$), l'analyse de variance (un et deux critères de classification) ou encore le test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey ont été utilisés pour mettre en évidence des différences entre les échantillons mais aussi pour définir des groupes ou des classes selon leurs effets (classement des doses).

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism d'analyse et de traitement statistique des données version 8.0 pour Windows XP. La courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (**PM**) des protéines standards en fonction du rapport frontal (**Rf**) a été réalisé grâce au logiciel Minitab (Weinberg, 1985), version française 17 pour Windows (W, 2000).

RÉSULTATS

3. RÉSULTATS

3.1. Tests de toxicité

L'efficacité de l'azadirachtine a été testée, par application topique, sur des chrysalides nouvellement exuviées d'*Ephestia kuehniella*. La mortalité a été relevée à l'émergence de l'adulte. Les doses, correspondant à 25 et 50% de l'inhibition de l'exuviation adulte (DI₂₅ et DI₅₀), caractérisant la toxicité de l'insecticide, ont été déterminées.

3.1.1. Toxicité de l'azadirachtine sur l'inhibition de l'exuviation adulte

Le traitement avec l'azadirachtine, par application topique à différentes doses (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3,5 µg / pupe) le jour de l'exuviation nymphale d'*E. kuehniella*, a induit une inhibition de la mue adulte dont les pourcentages sont précisés dans le [tableau 8](#). L'inhibition de la mue adulte, de l'ordre de 6 ± 1 chez les témoins (inhibition naturelle) augmente chez les séries traitées significativement avec une relation dose réponse ; ainsi, il est noté, pour la dose la plus élevée, un pourcentage d'inhibition observée de 89,88 ± 3,17.

Tableau 8. Effets de l'azadirachtine, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg / pupe) le jour de l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* : Inhibition observée (%) de l'adulte. (m ± sd ; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,5	1	1,5	2	2,5	3,5
R1	5	36,66	46,66	60,85	63,33	70	86,66
R2	7	40,00	36,66	56,66	67,78	73	90
R3	6	40,00	56,66	62,13	70,34	83	93
m ± sd	6±1	38,88±1,92	46,66±10	59,88±6,93	67,15±3,54	75,33±6,80	89,88±3,17

Les pourcentages d'inhibition observée, chez les séries traitées, ont été corrigées par la formule d'Abbott (1925) afin d'éliminer le pourcentage de la mortalité naturelle ([Tab. 9](#)). Les pourcentages de mortalités corrigées de l'ordre de 34,98 ± 2,05 pour la dose la plus faible (0,5 µg) augmentent graduellement et sont de 89,23 ± 3,37 pour la dose la plus élevée (3,5 µg). L'analyse statistique des résultats, présentée dans le [tableau 10](#), révèle une relation dose-réponse avec une différence hautement significative (p < 0,0001***). Un classement des doses réalisé, grâce au test HSD de Tukey, permet de classer les doses testées en fonction de leur toxicité ([Fig. 8](#)). Les résultats révèlent l'existence de cinq groupes présentant des effets différents du pesticide sur les pourcentages d'inhibition de la mue adulte ; ainsi dans un ordre croissant les doses sont : 0,5µg et 1µg < 1 et 1,5µg < 1,5 et 2µg < 2 et 2,5µg < 3,5.

Tableau 9. Effets de l'azadirachtine, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg / pupe) le jour de l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* : Inhibition corrigée (%) de l'adulte. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).

Répétitions	0,5	1	1,5	2	2,5	3,5
R1	32,61	43,25	58,35	61,34	68,08	85,80
R2	36,17	32,61	53,89	65,72	71,27	89,36
R3	36,17	53,89	59,71	68,44	81,91	92,55
m \pm sd	34,98\pm2,05	43,25\pm10,64	57,31\pm3,04	65,16\pm3,58	73,75\pm7,24	89,23\pm3,37

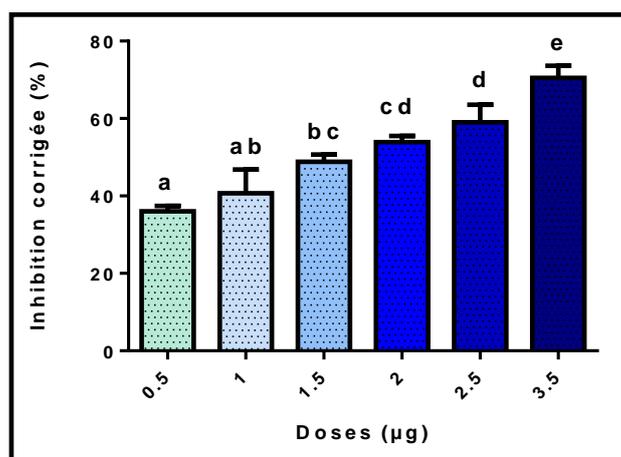


Figure 8. Effets de l'azadirachtine, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg / pupe) le jour de l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella* : Inhibition corrigée de l'adulte et classement des doses testées par le test HSD de Tukey. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Tableau 10. Effets de l'azadirachtine, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella*, sur le pourcentage d'inhibition corrigée de la mue adulte: Analyse de la variance à un critère de classification. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	2352	5	470,50	37,00	0,0001***
Erreur résiduelle	152,60	12	12,72	-	-
Total	2505	17	-	-	-

*** : 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.

La régression non linéaire a permis d'obtenir la courbe dose-réponse chez les chrysalides d'*E. kuehniella* ; cette courbe, exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en

fonction du logarithme de la dose de l'azadirachtine présente un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 0,9454$). Cette valeur révèle une liaison très forte entre le pourcentage d'inhibition corrigée et le logarithme de la dose (Fig. 9). Les différentes doses de la mortalité de l'adulte et leur intervalle de confiance ont été également déterminées par cette analyse; les DI_{25} et DI_{50} sont de l'ordre de $0,4277 \mu\text{g}$ [$0,2294 - 0,7974$] et $1,063 \mu\text{g}$ [$0,7853 - 1,438$] respectivement (Tab. 11).

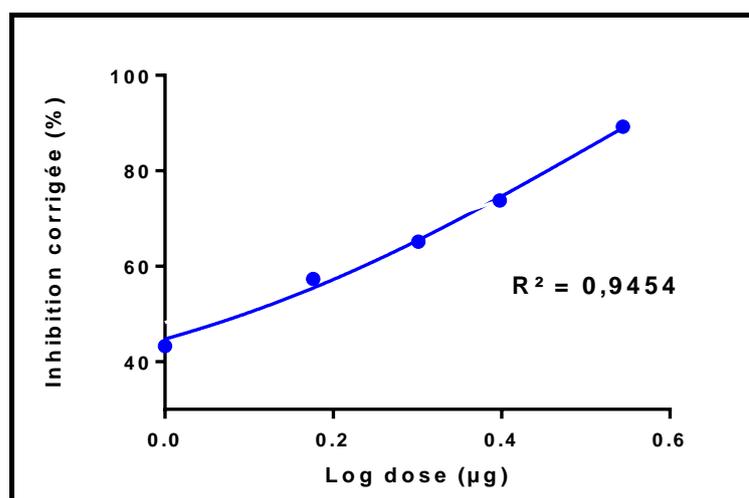


Figure 9. Effets de l'azadirachtine, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation chez *Ephestia kuehniella* : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose de l'azadirachtine (μg).

Tableau 11. Effets de l'azadirachtine, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* : Détermination des doses d'inhibition de la mue adulte (DI en μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.

Composé	DI_{10}	DI_{25}	DI_{50}	DI_{90}	Hill Slope
Azadirachtine	0,1721 [0,06169 – 0,4803]	0,4277 [0,2294 – 0,7974]	1,063 [0,7853 – 1,438]	6,562 [3,016 – 14,28]	1,207 [0,6377 – 1,776]

3.2. Effets de l'azadirachtine sur le développement d'*Ephestia kuehniella*

L'azadirachtine a été appliqué topiquement sur des chrysalides nouvellement exuviées (0j) d'*E. kuehniella*. Le développement nymphal des chrysalides témoins et traitées aux deux doses (DI_{25} et DI_{50}) a été examiné jusqu'à l'émergence des papillons adultes afin d'évaluer l'effet de l'azadirachtine sur la durée du développement nymphal, l'apparition de différents types et taux morphologiques ainsi que sur l'évolution pondérale.

3.2.1. Effet de l'azadirachtine sur la durée du développement nymphal

Les résultats obtenus montrent que l'azadirachtine entraîne une augmentation significative ($p = 0,02^*$) de la durée du développement nymphal chez les séries traitées par rapport aux témoins (Tab. 12) (Fig. 16 ; Annexe 1).

Tableau 12. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) à l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* sur la durée du développement nymphal ($m \pm sd$; $n = 12$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Traitement	Durée du développement nymphal (jours)
Témoins	12,50 \pm 0,70 a
DI ₂₅	12,75 \pm 0,50 ab
DI ₅₀	13,50 \pm 0,70 b

3.2.2. Effet de l'azadirachtine sur les types morphologiques induits

L'azadirachtine a été administré topiquement à l'émergence des chrysalides femelles d'*E. kuehniella*. Le traitement provoque des perturbations du développement nymphal d'où l'apparition de quatre différents types morphologiques à la mue imaginale (Fig. 10) avec des pourcentages différents comparativement aux témoins (Tab. 28 ; Annexe 1).

- **Type 1 : Adultes normaux (N)** : le taux de formation d'adultes normaux après traitement avec l'azadirachtine est estimé à 51,10% pour la DI₂₅ et 39,28% pour la DI₅₀ comparativement aux témoins avec un taux de 82,88% (Fig. 11).
- **Type 2 : Adultes malformés (M)** : les adultes subissent une exuviation montrant un corps entier avec des ailes malformées caractérisées soit par une petite taille soit par une courbure donnant l'aspect d'une aile brisée. L'application de l'azadirachtine révèle un taux de 22,22% pour la DI₂₅ et 25,77% pour la DI₅₀ d'adultes malformés en comparaison des témoins avec un taux de 7,88% (Fig. 11).
- **Type 3 : Mue partielle (MP)** : l'exuviation adulte est incomplète avec apparition d'une partie du corps adulte tandis que l'autre partie reste nymphale (bloquée) ; cette apparition de chrysalides partiellement exuviées est de 1,11% pour la DI₂₅ et 8,90% pour la DI₅₀ contre 00,00% pour les témoins (Fig. 11).

- **Type 4 : Mue bloquée (MB)** : le développement nymphal est bloqué, certaines chrysalides présentent un corps peu ou pas tanné alors que d'autres s'effritent au toucher. L'application de l'azadirachtine entraîne un taux de 25,55% pour la DI_{25} et 25,70% pour la DI_{50} de chrysalides bloquées comparativement aux témoins avec un taux de 9,22% (Fig. 11).

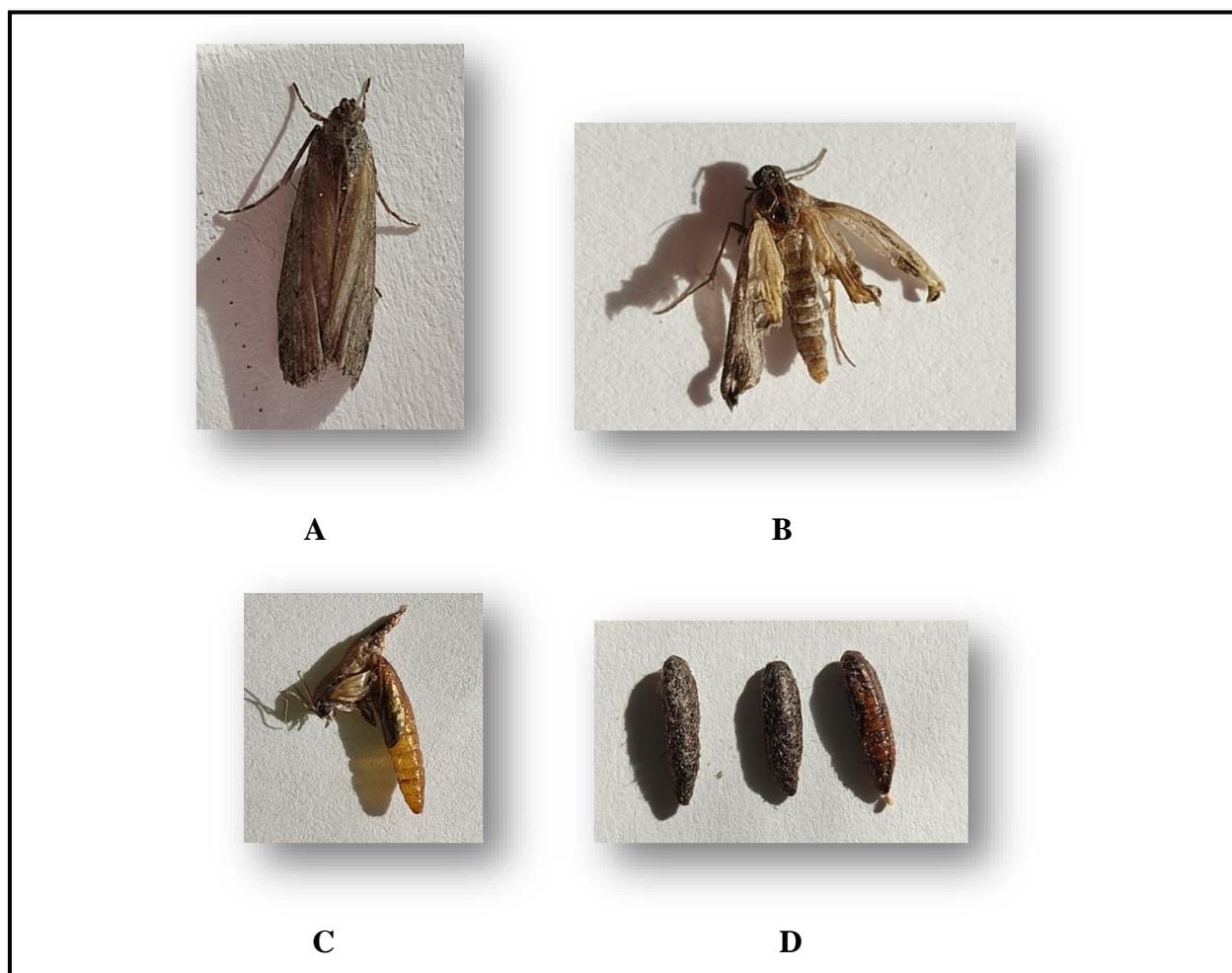


Figure 10. Les différents types morphologiques au cours du développement nymphal. **A** : Adulte normal ($\times 4,6$) ; **B** : Adulte malformé ($\times 4,3$) ; **C** : Mue partielle ($\times 3,9$) ; **D** : Mue bloquée ($\times 5,3$) (Photos personnelles).

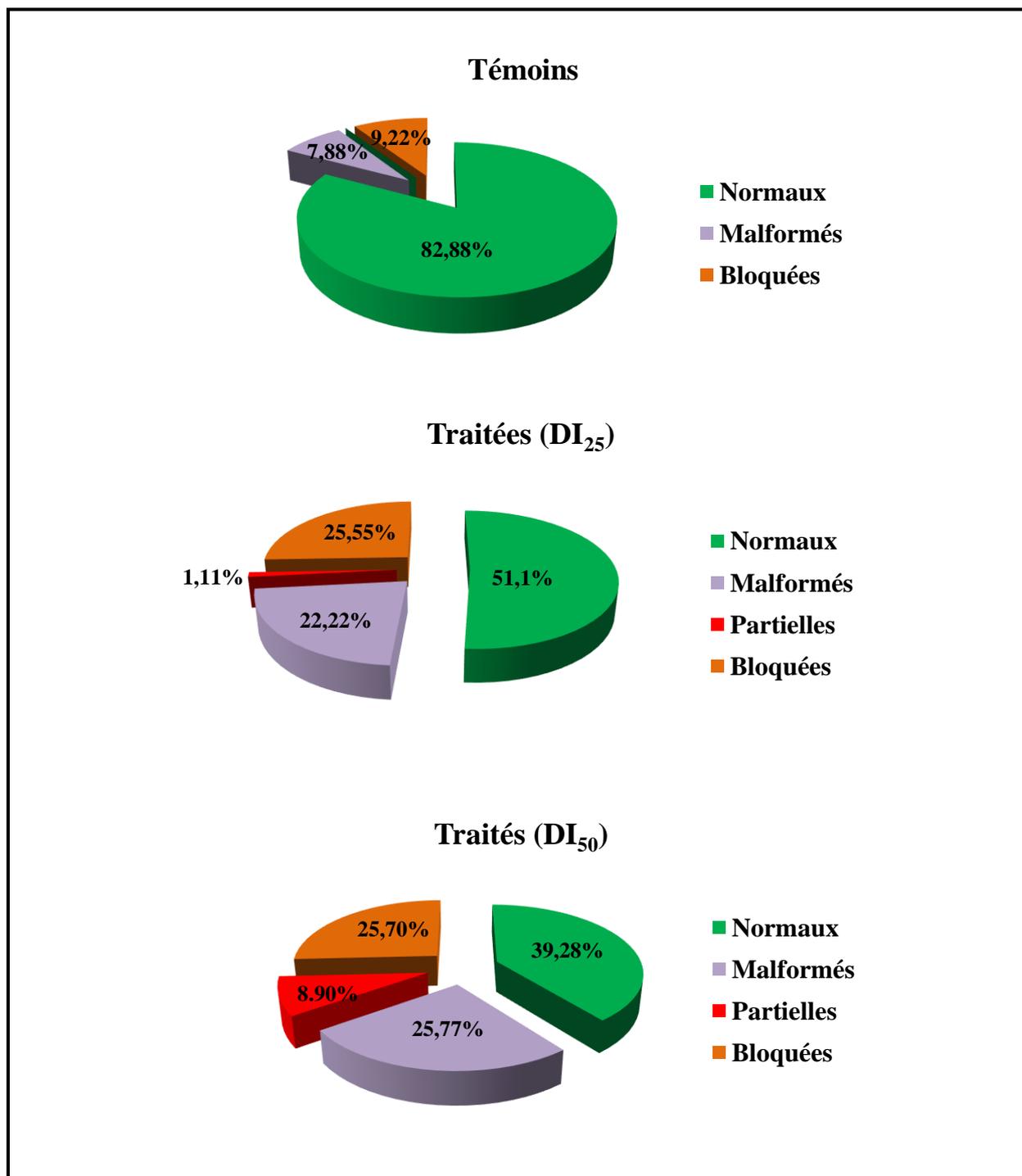


Figure 11. Répartition (%) des différents types morphologiques observés chez les chrysalides témoins et traitées avec l'azadirachtine d'*Ephestia kuehniella*.

3.2.3. Effet de l'azadirachtine sur l'évolution pondérale des chrysalides

Le poids des chrysalides diminue au cours du temps durant la métamorphose. En effet, les résultats montrent que le poids diminue pour atteindre un minimum de $12,80 \pm 0,14$ mg au 9^{ème} jour pour la série de témoins (Tab. 13) (Fig. 17 ; Annexe 1). Le même profil a été enregistré chez les séries traitées avec une diminution du poids pour un minimum de $10,80 \pm 0,08$ mg pour les traités avec la DI_{25} , et $6,04 \pm 0,30$ mg pour la DI_{50} au 9^{ème} jour de la vie nymphale (la veille de l'exuviation adulte). L'analyse statistique montre que l'azadirachtine administré à des chrysalides de 0 jour aux deux doses testées entraîne une diminution hautement significative au 1^{er} jour de la vie nymphale ($p < 0,0001^{***}$) par rapport aux témoins. La comparaison entre les séries témoins et traités chez les chrysalides de 3, 5, 7 et 9 jours de la vie nymphale, montre que l'azadirachtine diminue d'une manière hautement significative le poids des chrysalides traitées par rapport aux témoins ($p < 0,0001^{***}$).

L'analyse de la variance à deux critères de classification confirme ces résultats et indique un effet temps et traitement hautement significatif ($p < 0,0001^{***}$) et une interaction temps-traitement hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) (Tab. 14).

Tableau 13. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI_{25} : $0,427\mu\text{g}$ et DI_{50} : $1,063\mu\text{g}$) sur l'évolution pondérale (mg) des chrysalides femelles d'*Ephestia kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm sd$; $n = 6$).

Traitement \ Jours	Témoins	DI_{25}	DI_{50}
0	$17,35 \pm 0,49$ a		
1	$16,45 \pm 0,37$ a A	$15,66 \pm 0,13$ b A	$14,76 \pm 0,31$ c A
3	$15,93 \pm 0,10$ a B	$13,28 \pm 0,11$ b B	$11,93 \pm 0,14$ c B
5	$14,95 \pm 0,18$ a C	$12,58 \pm 0,23$ b C	$9,83 \pm 0,22$ c C
7	$13,80 \pm 0,12$ a D	$11,48 \pm 0,19$ b D	$7,11 \pm 0,11$ c D
9	$12,80 \pm 0,14$ a E	$10,80 \pm 0,08$ b E	$6,04 \pm 0,30$ c E

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Tableau 14. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) sur l'évolution pondérale (mg) des chrysalides femelles d'*Ephestia kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm sd$; $n = 6$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de la variance	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	892,40	2	446,20	9210	< 0,0001***
Age	1056	5	211,10	4358	< 0,0001***
Interaction	730,00	10	73,00	1507	< 0,0001***
Erreur résiduelle	4,360	90	0,4845	-	-

*** : 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.

3.3. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires)

La quantification des vitéllogénines dans les corps gras prélevés à partir des chrysalides femelles à différents âges (0, 1, 3, 5 et 7 jours) ainsi que le taux des vitellines dans les ovaires prélevés à partir des adultes femelles nouvellement émergées a été réalisée à partir d'une courbe de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard (Tab. 15 ; Fig. 12).

Tableau 15. Gamme d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard.

Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbance	0	0,129	0,216	0,414	0,501	0,629

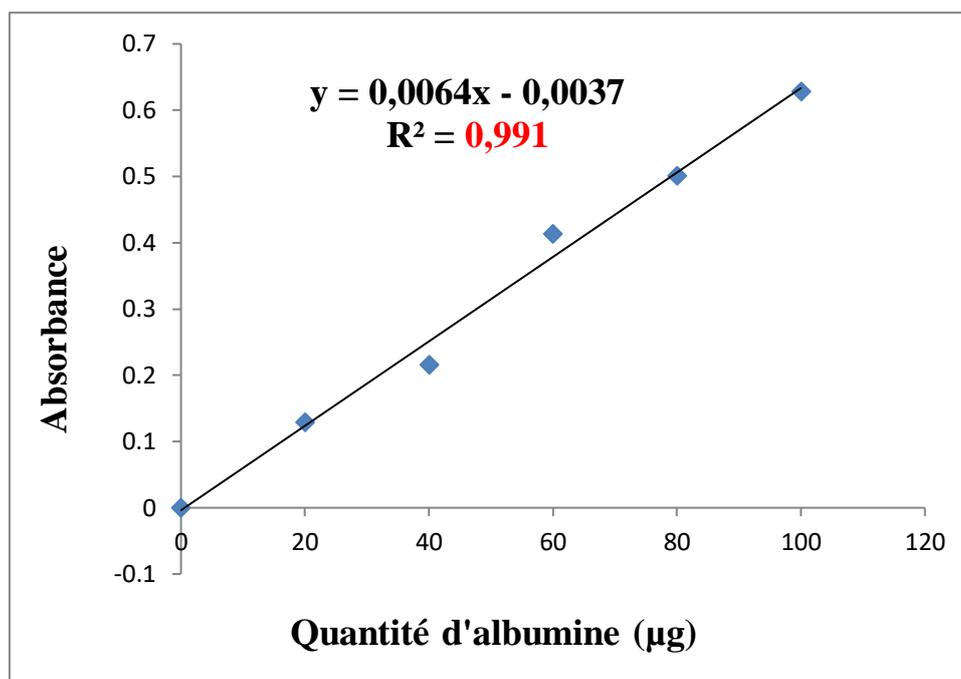


Figure 12. Dosage des vitélogénines dans le corps gras et des vitellines ovariennes, droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg) (BSA).

3.3.1. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitélogénines dans le corps gras

Les effets de l'azadirachtine (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) administrées, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale à des femelles d'*Ephestia kuehniella*, ont été évalués, au cours de ce même stade (1, 3, 5 et 7 jours), sur le contenu en vitélogénines dans les corps gras.

Chez les chrysalides témoins, les vitélogénines montrent une valeur maximale au 5^{ème} jour qui est de l'ordre de $37,05 \pm 1,11$ µg/mg de corps gras. Le même profil est remarqué pour les deux doses testées ; en effet, une augmentation dans les valeurs est observée qui sont de l'ordre de $25,69 \pm 0,55$ µg/mg et $21,07 \pm 0,49$ µg/mg de corps gras pour les deux doses DI₂₅ et DI₅₀ respectivement ; puis les valeurs diminuent au 7^{ème} jour: $33,08 \pm 1,31$ µg/mg de vitélogénines dans le corps gras chez les témoins ; $21,59 \pm 1,22$ µg/mg chez les traités à la DI₂₅ et $19,83 \pm 0,42$ µg/mg chez les traités à la DI₅₀, ce qui laisse supposer un arrêt dans la synthèse des vitélogénines (Tab. 16) (Fig. 18 ; Annexe 1).

La comparaison entre les séries témoins et traitées montre que l'azadirachtine entraîne une diminution significative ($p = 0,0137^*$) dans le contenu en vitélogénines au 1^{er} jour chez les individus traités à la dose DI₅₀ par rapport aux témoins.

Au 3^{ème} jour, l'azadirachtine entraîne une diminution significative ($p = 0,04^*$) chez les traités à la DI_{25} , et une diminution très significative ($p = 0,0010^{**}$) chez les traités à la DI_{50} par rapport aux témoins.

Au 5^{ème} jour, la comparaison entre les séries témoins et traitées montre que l'azadirachtine entraîne une diminution très significative ($p = 0,0012^{**}$) chez les traités à la DI_{25} , et une diminution hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) chez les traités à la DI_{50} par rapport aux témoins.

Au 7^{ème} jour, l'azadirachtine induit une diminution très significative ($p = 0,0046^{**}$) chez les traités à la DI_{25} , et une diminution hautement significative ($p = 0,0005^{***}$) chez les traités à la DI_{50} par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification confirme ces résultats et indique un effet temps et traitement hautement significatif ($p < 0,0001^{***}$) et une interaction temps-traitement hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) (Tab. 17).

Tableau 16. Effets de l'azadirachtine, administrée par application topique (DI_{25} : $0,427\mu\text{g}$ et DI_{50} : $1,063\mu\text{g}$) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitélogénines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*Ephestia kuehniella* ($m \pm sd$; $n = 12$).

Traitement \ Jours	Témoins	DI_{25}	DI_{50}
0	$21,51 \pm 0,97$ a		
1	$24,14 \pm 0,41$ a B	$22,13 \pm 0,82$ ab B	$21,07 \pm 0,49$ b B
3	$25,08 \pm 0,14$ a B	$23,47 \pm 0,62$ b BC	$22,15 \pm 0,44$ b C
5	$37,05 \pm 1,11$ a C	$25,69 \pm 0,55$ b C	$22,68 \pm 0,42$ c BC
7	$33,08 \pm 1,31$ a D	$21,59 \pm 1,22$ b B	$19,83 \pm 0,42$ b B

Les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries.

Les lettres majuscules comparent les valeurs d'une même série entre les différents âges ($p < 5\%$).

Tableau 17. Effets de l'azadirachtine, administrée par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitélogénines (µg/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*Ephestia kuehniella* (m ± sd ; n = 12). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de la variance	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	1439	2	719,30	826,30	< 0,0001***
Age	3242	4	810,40	2848	< 0,0001***
Interaction	706,60	8	88,32	157,30	< 0,0001***
Erreur résiduelle	13,47	24	0,5613	-	-

*** : hautement significatif (p < 0,0001) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p : niveau de significativité.

3.3.2. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitellines ovariennes

Les effets de l'azadirachtine administré par application topique aux deux doses DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg, le jour de l'exuviation nymphale, ont été évalués, sur le contenu des vitellines ovariennes chez les adultes femelles d'*Ephestia kuehniella* à l'émergence. Les témoins ont une valeur de l'ordre de 158,13 ± 18,74 µg/mg ; l'azadirachtine induit une diminution hautement significative (p < 0,0001***) dans le contenu des vitellines ovariennes. (Tab. 18) (Fig. 19 ; Annexe 1).

Tableau 18. Effet *in vivo* de l'azadirachtine (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) appliqué topiquement, sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg) chez les adultes femelles d'*Ephestia kuehniella* à l'émergence (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p < 0,05.

Traitement	Contenu en vitellines ovariennes (µg/mg)
Témoins	158,13 ± 18,74 a
DI ₂₅	88,66 ± 4,90 b
DI ₅₀	63,40 ± 8,36 c

3.4. Analyse qualitative et quantitative des protéines ovariennes

3.4.1 Effets de l'azadirachtine sur le taux des protéines ovariennes

La quantification des protéines dans les ovaires des adultes nouvellement émergées a été réalisée à partir d'une courbe de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine standard (Tab. 15 ; Fig.12).

Une diminution hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) est enregistrée chez les femelles traitées par comparaison avec les témoins. En effet, chez les témoins, on enregistre un taux protéique de $46,49 \pm 2,72 \mu\text{g}/\text{mg}$ qui sera réduit à $27,20 \pm 2,16 \mu\text{g}/\text{mg}$ et à $14,62 \pm 0,56 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les femelles traitées avec l'azadirachtine avec les deux doses DI₂₅ et DI₅₀ respectivement. (Fig. 20 ; Annexe 1).

3.4.2. Effets de l'azadirachtine sur la qualité des protéines ovariennes

L'étude électro-phorétique sur PAGE-SDS a été menée *in vivo* sur la qualité des protéines ovariennes chez les adultes femelles d'*Ephestia kuehniella* témoins et traitées par l'azadirachtine aux deux doses : DI₂₅ : 0,427 μg et DI₅₀ : 1,063 μg .

La courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (**PM**) des protéines standards en fonction du rapport frontal (**RF**) a été établi avec cinq protéines standards à poids moléculaire connue (Tab. 19 ; Fig. 13).

Tableau 19. Poids moléculaires (**PM**) en kDa et la mobilité relative (**RF**) des protéines standards (**a** : myosine, 250 kDa ; **b** : phosphorylase, 100 kDa ; **c** : ovalbumine, 50 kDa ; **d** : anhydrase carbonique, 37 kDa et **e** : lysozyme, 20 kDa).

Poids moléculaire (kDa)	250	100	50	37	20
Log PM	2,39	2,00	1,69	1,56	1,30
Rapport frontal	0,07	0,26	0,42	0,53	0,67

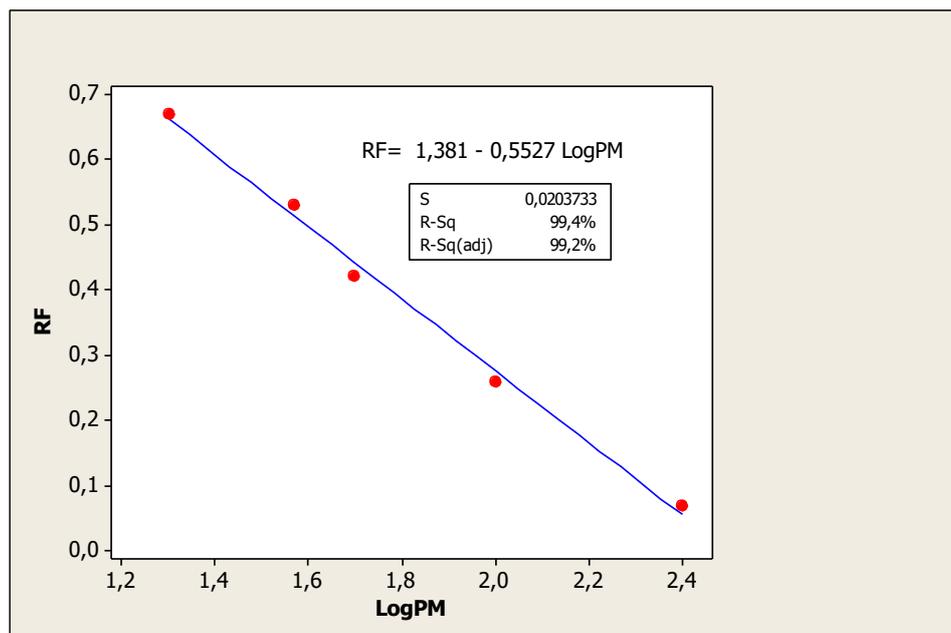


Figure 13. Séparation électrophorétique des protéines ovariennes: courbe de référence exprimant le rapport frontal (**RF**) en fonction du logarithme décimal du poids moléculaire.

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

La comparaison des profils électrophorétiques révèle une différence entre les témoins et les traitées. En effet il y'a une réduction de trois fractions chez les traitées avec la DI₂₅, ce sont les fractions 3, 6 et 9 dont les poids moléculaires sont respectivement 206,06 kDa, 124,45 kDa et 70,30 kDa. Chez les traitées avec la DI₅₀ on remarque l'absence de six fractions, ce sont les fractions 2, 3, 5, 6, 9 et 10 dont les poids moléculaires sont respectivement 219,78 kDa, 206,06 kDa, 150,31 kDa, 124,45 kDa, 70,30 kDa et 42,46 kDa (Tab. 20 ; Fig. 14).

Tableau 20. Mobilité relative (**RF**) et poids moléculaire (**PM** kDa) des différentes fractions protéiques des ovaires d'*Ephestia kuehniella* témoins et traitées à l'azadirachtine (**DI₂₅**, **DI₅₀**) administré par application topique à l'exuviation nymphal.

Nombre de fractions	RF	PM correspondant (témoins)	DI₂₅	DI₅₀
1	0,1666	233 ,88	+	+
2	0,1904	219,78	+	-
3	0,2142	206,06	-	-
4	0,2619	181,55	+	+
5	0,3333	150,31	+	-
6	0,4047	124,45	-	-
7	0,5000	96,60	+	+
8	0,5952	76,03	+	+
9	0,6190	70,30	-	-
10	0,809	42 ,46	+	-
11	0,880	35 ,07	+	+
12	0,952	29,04	+	+

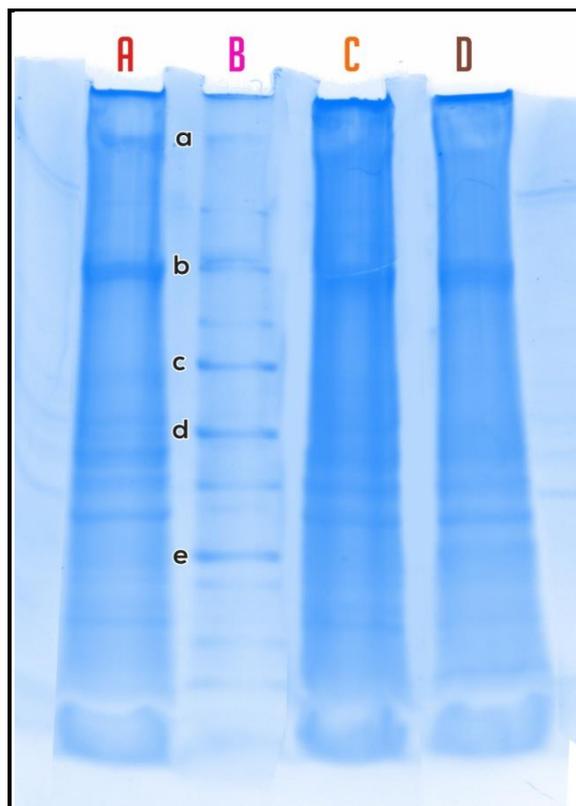


Figure 14. Séparation électrophorétique sur PAGE-SDS (12%) des protéines ovariennes des femelles adultes d'*Ephestia kuehniella* témoins et traitées avec l'azadirachtine : (A) témoin, (B) protéines standards, (C) DI₂₅ et (D) DI₅₀ à l'émergence adulte (<8h), comparée à celle des protéines marqueurs (**a** : myosine, 250 kDa ; **b** : phosphorylase, 100 kDa ; **c** : ovalbumine, 50 kDa ; **d** : anhydrase carbonique, 37 kDa et **e** : lysozyme: 20 kDa).

3.5. Effet de l'azadirachtine sur la morphométrie de l'ovaire

3.5.1. Effet de l'azadirachtine sur le poids frais des ovaires

Les résultats obtenus montrent que l'azadirachtine entraîne une réduction hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) du poids frais des ovaires mesuré à l'émergence adulte (<8h) par rapport aux témoins (Tab. 21) (Fig. 21 ; Annexe 1).

Tableau 21. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* sur le poids frais (mg) des ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Traitement	Poids frais des ovaires (mg)
Témoins	5,36 ± 0,10 a
DI ₂₅	3,21 ± 0,17 b
DI ₅₀	1,78 ± 0,11 c

3.5.2. Effet de l'azadirachtine sur le nombre d'ovocyte par paire ovaire

L'azadirachtine induit une réduction hautement significative (p < 0,0001***) du nombre d'ovocytes chez les femelles traitées par rapport aux témoins (Tab. 22) (Fig. 22 ; Annexe 1).

Tableau 22. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Traitement	Nombre d'ovocytes par paire d'ovaires
Témoins	128,50 ± 1,87 a
DI ₂₅	62,66 ± 2,06 b
DI ₅₀	39,50 ± 1,87 c

3.5.3. Effet de l'azadirachtine sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal

L'analyse statistique révèle un effet hautement significatif (p < 0,0001***) sur la longueur et un effet hautement significatif (p < 0,0001***) sur la largeur de l'ovocyte basal par chez les traités par rapport aux témoins (Tab. 23) (Fig. 23 ; Annexe 1).

Tableau 23. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Traitement	Longueur (µm)	Largeur (µm)
Témoins	3,37 ± 0,04 a	1,83 ± 0,03 a
DI ₂₅	2,53 ± 0,03 b	1,39 ± 0,04 b
DI ₅₀	2,37 ± 0,04 c	1,20 ± 0,06 c

3.5.4. Effet de l'azadirachtine sur le volume de l'ovocyte basal

La comparaison des valeurs moyennes obtenues dans les séries traitées révèle que l'azadirachtine provoque une réduction hautement significative (p < 0,0001***) dans le volume de l'ovocyte basal chez les traitées par rapport aux témoins (Tab. 24) (Fig. 24 ; Annexe 1).

Tableau 24. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* sur le volume de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) (m ± sd ; n = 12). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Traitement	Volume (mm ³)
Témoins	6,10 ± 1,31 a
DI ₂₅	2,63 ± 0,65 b
DI ₅₀	1,60 ± 0,47 b

3.6. Étude histologique

3.6.1. Effets de l'azadirachtine sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux

Les effets des deux doses de l'azadirachtine (DI₂₅ et DI₅₀) sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux sont présentés dans la figure 15. Dans les ovocytes basaux témoins, l'épaisseur de l'épithélium folliculaire était de 7,53 ± 0,20 µm. L'azadirachtine a provoqué une réduction hautement significative (p < 0,0001***) de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire des ovocytes basaux traités par rapport aux témoins

(Tab. 25). L'azadirachtine a également réduit l'épaisseur du chorion ($p < 0,0001^{***}$) des ovocytes basaux traités par rapport aux témoins (Tab. 25) (Fig. 25 ; Annexe 1).

Tableau 25. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) à l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire (μ m) ($m \pm sd$; $n = 6$) et l'épaisseur du chorion (μ m) des ovocytes basaux mesuré à l'émergence adulte ($m \pm sd$; $n = 6$). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Traitement	Épaisseur de l'épithélium folliculaire des ovocytes basaux (μ m)	Épaisseur du chorion des ovocytes basaux (μ m)
Témoins	7,53 \pm 0,20 a	2,46 \pm 0,32 a
DI ₂₅	6,40 \pm 0,24 b	1,59 \pm 0,14 b
DI ₅₀	5,72 \pm 0,10 c	1,13 \pm 0,09 c

Comme le montre la figure 15, les ovocytes témoins sont entourés d'un grand nombre de cellules folliculaires (Fig. 15. A, B) et le cytoplasme contient un vitellus abondant sous forme de plaquettes (Fig. 15.C). L'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) réduit le nombre de cellules folliculaires (Fig. 15. D, E, G et H). Il réduit également le nombre de plaquettes vitellines dans le cytoplasme (Fig. 15. F, I).

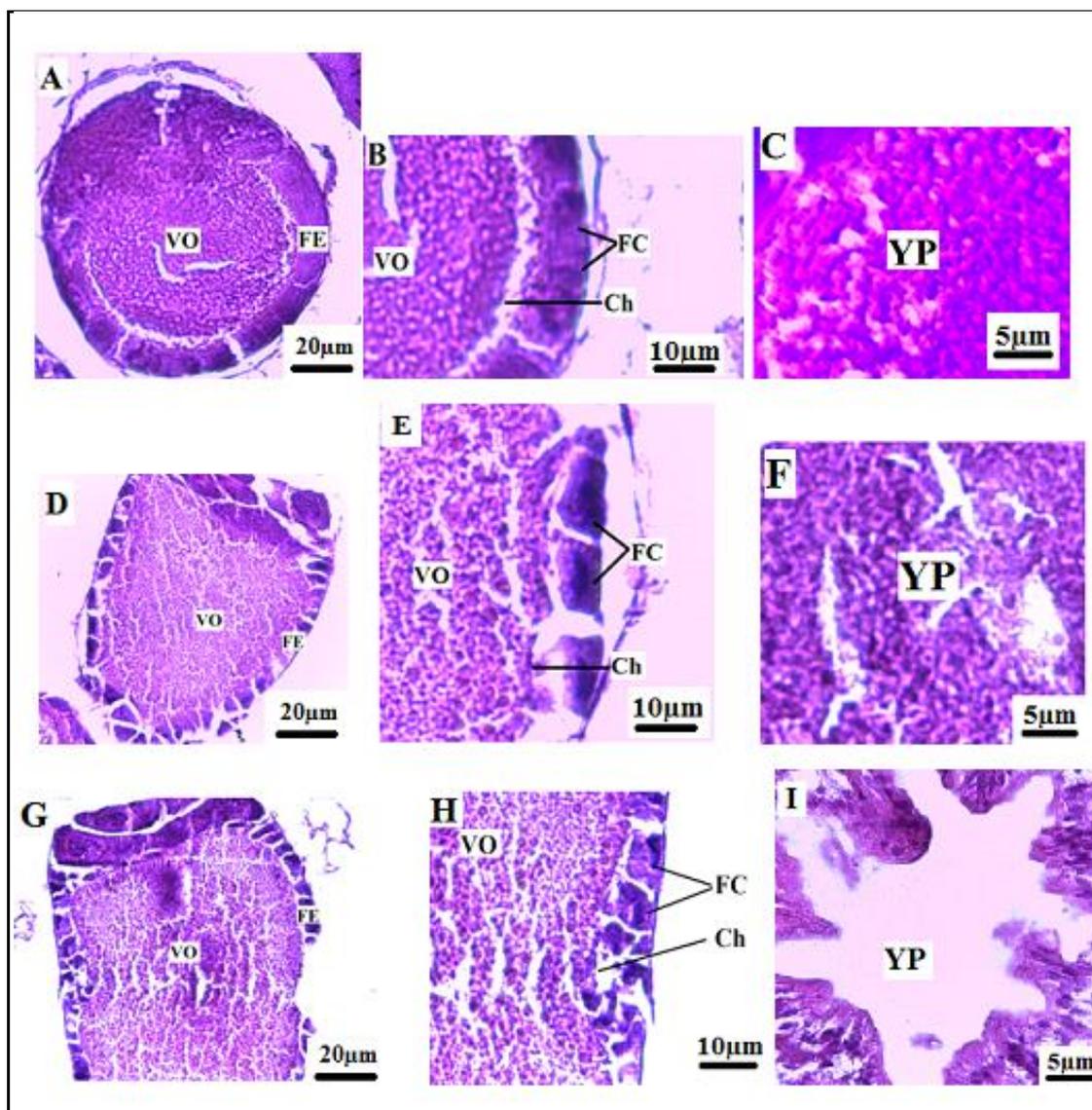


Figure 15. Effet *in vivo* de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI_{25} : $0,427\mu\text{g}$ et DI_{50} : $1,063\mu\text{g}$) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées chez *Ephesia kuehniella* sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire, l'épaisseur du chorion, les cellules folliculaires et les plaquettes vitelline. (A, B, C): ovocyte basal témoin; (D, E, F): ovocyte basal traité avec l'azadirachtine à la dose DI_{25} : $0,427\mu\text{g}$; (G, H, I): ovocyte basal traité à l'azadirachtine à la dose DI_{50} : $1,063\mu\text{g}$. (VO): ovocytes; (FE): Épithélium Folliculaire; (FC): Cellules Folliculaires; (Ch): Chorion; (YP): Plaquettes Vitellines. Barres d'échelle: $20\mu\text{m}$ (A, D, G); $10\mu\text{m}$ (B, E, H); $5\mu\text{m}$ (C, F, I).

3.7. Étude du potentiel reproducteur

3.7.1. Effets de l'azadirachtine sur la durée des périodes de pré-oviposition et d'oviposition

Un suivi régulier des couples permet de déterminer les périodes de pré-oviposition et d'oviposition, le nombre d'œufs pondus et le pourcentage d'éclosion des œufs. Dans nos conditions expérimentales (température 27°C, humidité relative à 80%), la ponte débute à $1,16 \pm 0,25$ jours après l'émergence des adultes et se poursuit jusqu'à $3,33 \pm 0,25$ jours chez les femelles témoins. L'azadirachtine provoque une augmentation hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) de la période de pré-oviposition, et une réduction hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) de la période d'oviposition (Tab. 26) (Fig. 26 ; Annexe 1).

Tableau 26. Effet *in vivo* de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d'*Ephestia kuehniella* sur la durée (jours) des périodes de pré-oviposition et d'oviposition ($m \pm sd$; $n = 12$). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Traitement	Période de pré-oviposition (jours)	Période d'oviposition (jours)
Témoins	$1,16 \pm 0,25$ a	$3,33 \pm 0,25$ a
DI ₂₅	$1,25 \pm 0,27$ a	$2,75 \pm 0,27$ b
DI ₅₀	$2,16 \pm 0,25$ b	$2,25 \pm 0,27$ b

3.7.2 Effets de l'azadirachtine sur la fécondité et la viabilité des œufs pondus

Le nombre d'œufs pondus par une femelle témoin est de $165,5 \pm 2,07$ pendant toute la période d'oviposition. L'azadirachtine entraîne une diminution hautement significative ($p < 0,0001^{***}$) du nombre des œufs pondus/ femelle. L'azadirachtine affecte également la viabilité des œufs, il entraîne une réduction hautement significative du pourcentage d'éclosion ($p < 0,0001^{***}$) (Tab. 27) (Fig. 27 ; Annexe 1).

Tableau 27. Effet *in vivo* de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d'*Ephestia kuehniella* sur la fécondité (nombre œufs pondus/ femelle) et la viabilité des œufs (pourcentage d'éclosion %) ($m \pm sd$; $n = 12$). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$

Traitement	Fécondité (Œufs / femelle)	Viabilité des œufs (%)
Témoins	165,50 ± 2,07 a	89,50 ± 1,87 a
DI ₂₅	123,50 ± 1,51 b	30 ± 1,41 b
DI ₅₀	78,50 ± 1,87 c	11,83 ± 1,47 c

DISCUSSION

4. DISCUSSION

4.1. Effets de l'azadirachtine sur l'inhibition de la mue adulte

Au cours des deux dernières décennies, les graines de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) ont attiré de plus en plus d'attention en tant qu'insecticide naturel, et leur activité a été évaluée contre de nombreuses espèces d'insectes économiquement importantes (Schmutterer, 1990 ; Kreutweiser *et al.*, 2002 ; Charleston *et al.*, 2005 ; Amtul, 2014 ; Duarte *et al.*, 2019 ; Phambala *et al.*, 2020 ; Sahrudi *et al.*, 2021). En conséquence, les Nations Unies ont déclaré le neem comme « l'arbre du 21^{ème} siècle » (Agbo *et al.*, 2019).

Dans la présente étude, une formulation commerciale de l'azadirachtine, a été testée, par application topique, chez *Ephestia kuehniella* Zeller sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées, induisant à une inhibition de la mue adulte. En effet, l'utilisation de l'azadirachtine entraîne l'apparition de différents types morphologiques comme des adultes malformés (ailes), des mues partielles mais aussi des mues bloquées. Les doses d'inhibition de la mue adulte, les DI₂₅ et DI₅₀ sont respectivement de l'ordre de 0,4277 et 1,063 µg ; Ces valeurs correspondent aux concentrations d'inhibition (CI₂₅ et CI₅₀) de la mue adulte qui sont de l'ordre de 427 et 1063 ppm.

L'azadirachtine a été efficacement utilisée contre plus de 400 espèces d'insectes et s'est avérée être l'un des ingrédients végétaux les plus prometteurs pour la lutte intégrée contre les ravageurs à l'heure actuelle (Isam, 1999 ; Saber *et al.*, 2004 ; Qin *et al.*, 2019).

Dans la littérature, la toxicité de l'azadirachtine varie en fonction de l'ordre de l'insecte, du stade de développement, de la formulation commerciale utilisée et de la méthode d'application (ingestion ou topique) (Tomé *et al.*, 2013 ; Abedi *et al.*, 2014 ; Koodalingam *et al.*, 2014 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016 ; Oulhaci *et al.*, 2018 ; Alouani *et al.*, 2018 ; Ferdenache *et al.*, 2019).

L'azadirachtine affecte trois aspects de la biologie des insectes : le comportement alimentaire, la croissance et le développement (Isman *et al.*, 1990 ; Wang *et al.*, 2015 ; Chaudhary *et al.*, 2017 ; Eissa *et al.*, 2020).

Plusieurs études antérieures ont révélé que même de très faibles doses (<1 à 50 ppm) d'azadirachtine étaient hautement toxiques pour les insectes (Barnby *et al.*, 1987 ; Dere *et al.*, 2019). En effet, les effets de cette molécule ont été montrés chez les Lépidoptères comme *Anticarsia gemmatalis* avec une CL₅₀ de 0,58 g L⁻¹ (Farder-Gomes *et al.*, 2021), chez les Hémiptères comme *Nilaparvata lugens* avec une CL₅₀ de

0,47 ppm (Senthil Nathan *et al.*, 2008) ou encore chez les Hyménoptères comme *Habrobracon hebetor* avec une CL_{50} de 43,5 ppm (Abedi *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les larves de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera : Pyralidae) qui se nourrissaient d'un régime contenant de l'azadirachtine a montré une mortalité accrue, des réserves d'énergie réduites, un poids réduit et des indices nutritionnels réduits (Nouri-Ganbalani *et al.*, 2016). L'azadirachtine réduit de manière significative l'émergence des adultes chez *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) (Ahmad *et al.*, 2015) et chez *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae) avec des concentrations d'inhibition de l'ordre de CI_{25} : 595 ppm et CI_{50} : 1106 ppm (Boulahbel *et al.*, 2015). De plus, des effets anti-appétant et une inhibition significative de la croissance ont été remarqués chez *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) à des concentrations de 10–100 ppm et 1–10 ppm respectivement (Govindachari *et al.*, 1996), la fécondité et la reproduction ont été réduites (Eissa *et al.*, 2020), et des modifications pathologiques de la structure de l'intestin moyen ont été notées (Qin *et al.*, 2021).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'azadirachtine induit des altérations morphologiques de l'insecte conduisant à une inhibition de l'émergence des adultes. En effet, chez les insectes holométaboles, le stade pupal subit un remodelage drastique des tissus et des organes et représente donc une phase critique pour la formation des adultes (Ureña *et al.*, 2014).

Les processus de croissance et de développement chez les insectes sont rythmés par différentes mues. Les mues de croissance permettant à la larve d'augmenter sa taille et des mues de métamorphose induisant de nombreux changements morphologiques aboutissant à l'imago. Ces différentes étapes sont régulées par deux hormones principales qui agissent en coordination : l'ecdysone, hormone stéroïdienne de mue (active sous forme de 20-hydroxyecdysone, 20E) et l'hormone juvénile (HJ) (Dhadialla *et al.*, 1998).

Chez les insectes, la biosynthèse et la sécrétion des ecdystéroïdes sont assurées par les glandes prothoraciques, au cours des stades post-embryonnaires, sous l'effet d'une neurohormone prothoracicotrope (PPTH) (Gäde et Hoffmann, 2005).

L'ecdysone (E), prohormone, est synthétisée *via* des enzymes codés par une famille de gènes (Halloween) incluant plusieurs cytochromes P450 (Petryk *et al.*, 2003 ; Ono *et al.*, 2006 ; Yoshiyama *et al.*, 2006). L'ecdysone, libérée dans l'hémolymphe, est convertie en hormone active ou 20-hydroxyecdysone (20E), grâce à l'ecdysone 20 monooxygénase, dans différents organes périphériques (corps gras et tubes de Malpighi) (Toivonen et Partridge, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2013).

La 20E, contrôle la reproduction (Toivonen et Partridge, 2009 ; Swevers, 2019), l'embryogénèse et le développement post-embryonnaire (Cranna et Quinn, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2013) ; Elle initie les différentes mues mais la nature de la mue (larvaire ou nymphale) est déterminée par la présence ou l'absence de l'HJ dont le rôle est le maintien des caractères larvaires et l'inhibition de la métamorphose (Cassier *et al.*, 1997 ; Dubrovsky, 2005 ; Cheng *et al.*, 2014).

Au cours de la métamorphose, la 20E se lie à un récepteur hétérodimère (EcR-ultraspiracle ou USP) qui active directement un petit groupe de gènes précoces : BR-C, E74 et E75 ; les protéines produites par ces gènes précoces activent un plus grand groupe de gènes tardifs qui contrôlent les différents aspects de la métamorphose (Dubrovsky, 2005 ; Kozlova et Thummel, 2003 ; Yamanaka *et al.*, 2013). Plus récemment, il a été constaté que la 20E régule l'hormone de déclenchement de l'ecdysis (Ecdysis Triggering Hormone - ETH) *via* le récepteur 20E (récepteur de l'ecdysone, EcR) et régule ainsi indirectement le niveau de l'HJ (Meiselman *et al.*, 2017).

Dès l'apparition du stade adulte, la 20E et l'HJ agissent ensuite de manière conjointe pour le contrôle de la reproduction (Gruntenko et Rauschenbach, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2013).

Chez *Ephestia kuehniella*, le stade nymphal (où se réalise le traitement) se caractérise par deux augmentations dans les taux des ecdystéroïdes, l'une au 3^{ème} jour et l'autre au 5^{ème} jour de la vie nymphale (Yezli-Touiker et Soltani-Mazouni, 2011).

Le pic du troisième jour est retrouvé chez la plupart des insectes (Zimowska *et al.*, 1991), il est d'origine ovarienne, et il est lié au processus de la reproduction. En effet, il coïncide avec le début de la vitellogénèse. Quant au pic du 5^{ème} jour il est d'origine prothoracique, et il est responsable du développement imaginal puisqu'il coïncide avec la synthèse de la cuticule pré-éluviale adulte qui débute au 4^{ème} jour et se poursuit jusqu'à la veille de l'exuviation adulte (Maamcha, 1997, Yezli-Touiker et Soltani-Mazouni, 2011).

Toute interférence dans l'homéostasie de l'HJ et de la 20E, avec des sources exogènes de ces mêmes hormones mais aussi avec leurs agonistes ou antagonistes, peut conduire à une perturbation dans le développement et la métamorphose (Dhadialla *et al.*, 2005 , 2010 ; Smaghe *et al.*, 2012). Ainsi, l'inhibition de la mue chez les adultes d'*Ephestia kuehniella*, leurs malformations et la perturbation de la métamorphose semblent être liés à l'action antagoniste de l'azadirachtine sur la 20E ; En effet, les effets négatifs induits par l'azadirachtine, pourraient s'expliquer par plusieurs processus.

Tout d'abord, l'azadirachtine est connue pour avoir une action inhibitrice sur le système endocrinien et neuroendocrinien (Morgan, 2009). L'inhibition de la mue pourrait donc être due à un blocage de la synthèse et la libération des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques *via* l'action spécifique de l'azadirachtine sur la libération de l'hormone prothoracicotropique (PTTH) (Mordue *et al.*, 2005).

L'azadirachtine peut affecter directement la production de l'enzyme responsable de la conversion de l'ecdysone (E) en 20E au niveau du corps gras et de l'intestin moyen (Mordue *et al.*, 2005). De plus, l'action antimitotique de l'azadirachtine peut perturber la formation de nouveaux organes adultes comme les yeux et les ailes, au cours de la métamorphose (Anuradha *et al.*, 2007). Enfin, l'azadirachtine peut aussi interférer avec le système nerveux central *via* l'inhibition de la transmission cholinergique excitatrice en bloquant les canaux de calcium (Qiao *et al.*, 2014).

4.2. Effet de l'azadirachtine sur la durée du développement nymphal

L'azadirachtine est un bon inhibiteur de croissance (Qin *et al.*, 2021) ; En effet, un retard de l'émergence des adultes causé par l'azadirachtine a été noté chez différentes espèces (Jagannadh et Nair 1992 ; Alouani *et al.*, 2009 ; Tunca *et al.*, 2012 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016 ; Abhay *et al.*, 2021). Nos résultats montrent que l'application de l'azadirachtine aux deux doses (DI₂₅ et DI₅₀) perturbe le développement en prolongeant la durée de l'émergence adulte chez les chrysalides d'*E. kuehniella*. Les mêmes résultats ont été observés lorsque des larves de *S. litura* âgées de 6 jours étaient nourries avec différentes concentrations d'azadirachtine ; À une concentration plus élevée de 3125 ppm, une mortalité larvaire a été observée et la période larvaire ainsi que la période de développement totale était également plus prolongée (Abhay *et al.*, 2021). L'azadirachtine avait d'excellentes bio-activités contre les larves de *Bactrocera dorsalis* (Diptera : Tephritidae), conduisant à une durée de développement plus longue et un taux de survie plus faible (Zhou *et al.*, 2020). L'effet toxique de l'azadirachtine sur les stades larvaires et l'émergence des adultes de *Trichogramma chilonis* Ishii (Hymenoptera : trichogrammatidae) a également été signalé par Narendra *et al.*, 2013. L'application topique de l'azadirachtine sur les derniers stades de *Galleria mellonella* (Lepidoptera : Pyralidae) interfère avec le temps d'émergence des adultes (Aylin *et al.*, 2016). Ce biopesticide a également prolongé le développement larvaire et la durée du stade nymphal de *Tirathaba rufivena* (Lepidoptera : Pyralidae) (Boazhu *et al.*, 2017). Il semble que l'augmentation du temps d'émergence des adultes soit basée sur la forte activité de régulation

de la croissance des insectes de l'azadirachtine, probablement due à une interférence avec le métabolisme des ecdystéroïdes chez les insectes (Adel *et al.*, 2000 ; Mordue *et al.*, 2010).

4.3. Effet de l'azadirachtine sur les types morphologiques induits

Le traitement des chrysalides femelles nouvellement exuviées à l'azadirachtine aux deux doses (DI₂₅ et DI₅₀) a causé une perturbation du développement nymphal d'où l'apparition de quatre différents types morphologiques à la mue imaginale : adultes normaux, adultes avec malformations des ailes, une exuviation incomplète ou mue partielle et des mues bloquées.

Des effets similaires ont été rapportés chez *S. litura*, *Spodoptera mauritia* (Lepidoptera : Noctuidae), *E. kuehniella*, *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae), *Philosamia ricini* (Lepidoptera : Saturniidae), *Papilio demoleus* (Lepidoptera : Papilionidae) et *D. melanogaster* après traitement des larves du dernier stade avec différentes formulations commerciales d'azadirachtine (Gujar et Mehrotra, 1983 ; Jagannadh et Nair, 1992 ; Martinez *et al.*, 2001 ; Gnanamani et Dhanasekaran, 2013 ; Pandey *et al.*, 2011 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016). Ochi *et al.*, 2020 ont rapporté que l'application topique de l'azadirachtine aux larves du scarabée japonais, *Popillia japonica* Newman (Coléoptères : Scarabaeidae), a complètement perturbé le développement normal ultérieur jusqu'au stade adulte.

Les différents effets observés après traitement des larves d'*E. kuehniella* à l'azadirachtine peuvent être attribués à son effet perturbateur de croissance des insectes (IGDs) via une perturbation de l'équilibre hormonal (20E, HJ) (Mordue *et al.*, 2010 ; Eissa *et al.*, 2020 ; Gougbe-Semako *et al.*, 2021). Ce composé est connu pour introduire une dégénérescence des noyaux cellulaires dans les différentes glandes endocrines (glandes prothoraciques, *corpora allatum* et *corpora cardiacum*), responsables du contrôle des processus des mues et de métamorphoses chez les insectes, ce qui pourrait contribuer à une généralisation de la perturbation des fonctions neuroendocrines (Mordue *et al.*, 2010). De plus, différentes études ont rapporté une inhibition de la synthèse des ecdystéroïdes sous l'effet de l'azadirachtine (Min-Li et Shin-Foon, 1987 ; Feder *et al.*, 1988). Cette inhibition de la synthèse et de la libération des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques peut être le résultat d'une action spécifique de l'azadirachtine sur la libération de l'hormone prothoracicotrope (PTTH) (Mordue *et al.*, 2005). L'azadirachtine peut également affecter directement la production de l'enzyme responsable de la conversion de l'ecdysone (E) en 20E

au niveau du corps gras et de l'intestin moyen (Mordue *et al.*, 2005). En effet, ce sont les modifications des taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques sous l'effet de l'azadirachtine qui contribuent en large partie à son effet IGDs. La réduction des taux d'HJ, probablement liée à une altération de la sécrétion des neuropeptides (allatostatine et allatotropine) responsables de la synthèse et de la libération de l'HJ, a également été rapporté (Mordue *et al.*, 2010). L'action antimittotique de l'azadirachtine peut également affecter la formation de nouveaux organes adultes au cours de la métamorphose (Anuradha *et al.*, 2007). Ceci pourrait expliquer certaines déformations notées au cours de nos résultats tels que la malformation des ailes.

4.4. Effet de l'azadirachtine sur l'évolution pondérale des chrysalides

L'application de l'azadirachtine perturbe le développement d'*E. kuehniella* en entraînant une diminution dans le poids des chrysalides. Des résultats similaires ont été rapportés par Lai *et al.*, 2014, Boulahbel *et al.*, 2015 et Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016, où l'azadirachtine a diminué le poids nymphal de *D. melanogaster*. L'azadirachtine a également causé la diminution du poids des pupes de *B. dorsalis* (Zhou *et al.*, 2020). Rao et Subrahmanyam, 1986 ont rapporté que l'azadirachtine entraînait une réduction du poids corporel des nymphes de stade final de *Schistocerca gregaria* (Orthoptera : Acrididae). Dans d'autres expériences, le BioNeem a entraîné une réduction du poids des larves et des nymphes du premier et deuxième stades de *H. armigera* (Abedi *et al.*, 2014) ; ou encore chez les pupes de *H. armigera* après traitement des larves avec plusieurs formulations commerciales d'azadirachtine (Neem Azal, Huile de Neem et Neemmix) (Ahmad *et al.*, 2015). La diminution du poids des chrysalides chez *E. kuehniella* pourrait s'expliquer par l'utilisation des réserves énergétiques acquises au cours des stades larvaires pour détoxifier le produit toxique (Boggs, 2009) ou encore par le fait que l'azadirachtine diminue le taux des enzymes digestives trouvées dans l'intestin moyen (Nouri-Ganbalani *et al.*, 2016).

4.5. Effets de l'azadirachtine sur le taux des vitélogénines et des vitellines

La phase d'accroissement des ovocytes ou vitélogénèse (Cassier *et al.*, 1997), étape essentielle de la reproduction correspond à la synthèse des vitélogénines par le corps gras puis à leur incorporation dans l'ovocyte pour la formation des vitellines. En effet, durant la maturation sexuelle, le corps gras libère des nutriments ou précurseurs ; Les protéines (nombreuses et variées sont représentées par les vitellines, qui proviennent des vitélogénines), glucides et lipides qui seront captés via l'hémolymphe par les gonades pour y

être utilisés à des fins énergétiques (Downer, 1985 ; Stanley-Samuelson *et al.*, 1988 ; Raikhel et Dhadialla, 1992 ; Stanley-Samuelson et Pedibhotla, 1996 ; Soulages et Wells, 1994). Ce processus est sous contrôle endocrine, il est régi principalement par les ecdystéroïdes et l'HJ (Telfer, 2009 ; Delanoue *et al.*, 2010 ; Yamanaka *et al.*, 2013 ; Bellés et Piulachs, 2015). L'HJ contrôle, sous l'action du cerveau, la transcription des gènes de la vitéllogénine et leur synthèse (Li *et al.*, 2003, 2004). La vitellogénèse, chez *Ephestia kuehniella*, s'effectue pendant la vie nymphale (Zimowska *et al.*, 1991) et une augmentation dans le contenu en vitéllogénine est notée entre 3 et 5 jours chez les séries témoins ; ce pic dans les valeurs des vitéllogénines est contemporain avec l'augmentation des ecdystéroïdes signalée dans divers travaux (Zimowska *et al.*, 1991 ; Yezli-Touiker et Soltani-Mazouni 2011 ; Delhoum *et al.*, 2016 ; Kirane-Amrani *et al.*, 2018).

L'azadirachtine, administré aux doses testées (DI₂₅ et DI₅₀) chez les chrysalides d'*E. kuehniella* affecte la vitellogénèse chez les adultes femelles ; en effet, l'évaluation des vitéllogénines dans le corps gras et des vitellines dans les ovaires, montre une réduction dans leur contenu. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Boulahbel *et al.*, 2015) lors de l'administration de l'azadirachtine à des pupes de *D. melanogaster*. L'application d'analogues de l'hormone juvénile, le methoprène ou encore le pyriproxifène entraînent une réduction dans le contenu en vitéllogénine et vitellines chez divers ordres insectes (Pinto *et al.*, 2000 ; Bai *et al.*, 2010), les mêmes effets sont observés avec les agonistes des ecdystéroïdes (Sridhara et Lee, 2013 ; Mordue *et al.*, 2005 ; Kirane-Amrani *et al.*, 2018). Par ailleurs, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le teflubenzuron, diminue la synthèse des vitéllogénines et leur incorporation par les ovocytes chez *Locusta migratoria* (Orthoptera : Acrididae) (Acheuk *et al.*, 2012). D'autres pesticides non polluants, comme le spinosad ou l'indoxacarbe, à mode d'action neurotoxique ont le même effet chez *Blattella germanica* (Blattodea : Blattellidae) ou *Blatta orientalis* (Blattodea : Blattidae) (Tine, 2013 ; Maiza *et al.*, 2013). Contrairement à nos résultats, l'application de l'insuline et la 20- hydroxyecdysone (20E) augmentent le contenu en vitéllogénine et en vitellines dans les ovaires des chrysalides d'*E. kuehniella* (Delhoum *et al.*, 2016).

Nos résultats sont en conformité avec la littérature où il est noté que l'azadirachtine peut affecter le processus de reproduction chez divers insectes *via* les vitéllogénines (Mordue *et al.*, 2005). Cet antagoniste des ecdystéroïdes et de l'HJ inhibe la synthèse des vitéllogénines et leur incorporation par l'ovocyte chez *Labidura riparia* (Dermaptera : Labiduridae) (Sayah *et al.*, 1996), *Chrysoperla carnea* (Neuroptera : Chrysopidae) (Medina *et al.*, 2004), ou encore chez *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida : Ixodidae) (Denardi *et al.*,

2011). L'azadirachtine entraîne, similairement, une diminution dans le contenu en protéines ovariennes chez *B. orientalis* suggérant une inhibition dans la synthèse des vitellogénines et/ou de leur captation par l'ovaire (Tine *et al.*, 2011). La 20E et l'HJ jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la vitellogénèse (Gilbert *et al.*, 1998 ; Wismar *et al.*, 2000 ; Ganter *et al.*, 2007). Les deux hormones stimulent la production des vitellogénines dans le corps gras mais aussi leur absorption par les ovocytes permettant la croissance rapide des follicules vitellogéniques (Richard *et al.*, 1998). Parallèlement à la synthèse des vitellogénines, l'HJ contrôle également la transcription des gènes des vitellogénines et leur synthèse (Hoffman et Sorge, 1996 ; Li *et al.*, 2003 , 2004 ; Tufail *et al.*, 2014). Les deux hormones montrent une dualité d'action dans le contrôle de la vitellogénèse en l'activant ou en l'inhibant (Swevers *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2008) mais jouent surtout un rôle essentiel dans le maintien de l'expression des gènes des vitellogénines (Tufail *et al.*, 2014). Les effets inhibiteurs de l'azadirachtine sur la vitellogénèse peuvent être donc expliqués par le fait que l'azadirachtine agit comme antagoniste de ces deux hormones (Stark *et al.*, 1990 ; Stark *et al.*, 1992 ; Mordue *et al.*, 2005). La littérature note que l'azadirachtine affecte la synthèse des ecdystéroïdes ovariens et conduit à une altération de l'ovogenèse et de la croissance ovocytaire chez *L. migratoria* et *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae) (Mordue *et al.*, 2005). Par ailleurs, une autre étude montre que l'azadirachtine exerce un effet neurotoxique chez *D. melanogaster* (Qiao *et al.*, 2014), conduisant probablement à des effets secondaires sur les processus de régulation neuroendocrine *via* les neuropeptides (allatostatines, allatotropines, PTTH...) qui contrôlent la régulation hormonale de la reproduction.

4.6. Effets de l'azadirachtine sur la quantité et la qualité des protéines ovariennes

La maturation des ovocytes dépend, entre autres, des métabolites prélevés de l'hémolymphe et du matériel synthétisé *in situ* par l'ovaire (Raikhel et Dhadialla, 1992). La phase d'accroissement correspondant à l'accumulation de matériaux plastiques et énergétiques variés : lipides (triglycérides, lipoprotéines), glucides (glycogène), protéines et sels minéraux correspond à la vitellogénèse (Cassier *et al.*, 1997). Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues. Ces dernières entrent dans diverses réactions et peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s'intègrent dans la cellule comme éléments structuraux en même temps que les glucides et les lipides (Jacob *et al.*, 1961). Dans ce processus, la protéine essentielle est la vitellogénine, une protéine précurseur du vitellus dans les ovocytes (Attardo

et al., 2005) ; elle est synthétisée dans les corps gras qui est un lieu de stockage des métabolites (protéines, glucides et lipides), mais aussi de synthèse de la majorité des protéines hémolympatiques (Roma *et al.*, 2010), et sécrétée dans l'hémolymphe puis captée par les ovocytes en voie de développement (Gilbert *et al.*, 2000). Des travaux antérieurs ont confirmé la présence de récepteurs sur la membrane des ovocytes pour les vitéllogénines (Amdam *et al.*, 2002). Toute modification dans la concentration en protéines au cours de la vitellogénèse peut conduire à une altération de la reproduction (Robker *et al.*, 2009). Nos résultats révèlent une réduction hautement significative des taux de protéines ovariennes chez les traitées par rapport aux témoins. Des résultats similaires ont été rapportés chez *B. orientalis* (Tine *et al.*, 2011) et *D. melanogaster* (Boulahbel *et al.*, 2015) traitées avec différentes formulations commerciales d'azadirachtine.

Le méthoxyfénozide réduit le contenu ovarien en protéines chez *E. kuehniella* (Bakli *et al.*, 2016). Le traitement avec d'autres analogues de l'hormone de mue (le tébufénozide et le halofénozide) provoquent une réduction hautement significative du taux des protéines (Khebbeb, 2008 ; Soltani-Mazouni et Hami, 2010). Le même effet réducteur a été enregistré après le traitement des femelles d'*E. kuehniella* avec le captopril (Yezli-Touiker *et al.*, 2016). Des doses sublétales de chlorfluazuron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, en application topique sur les chenilles du dernier stade de *S. litura* réduisent significativement les taux des différents métabolites ovariens (Perveen, 2011).

Cette diminution dans les taux des protéines ovariennes implique une réduction de l'accumulation du vitellus indispensables à l'accroissement et la maturation des ovocytes. Cette diminution est corrélée avec la réduction du nombre d'ovocyte par paire d'ovaires ainsi que la taille et le volume de l'ovocyte basal. La diminution peut être attribuée également à l'effet anti appétant de l'azadirachtine qui affecte l'apport alimentaire et l'activité des enzymes digestives dans l'intestin moyen, chez *D. melanogaster* (Kilani-Morakchi *et al.*, 2017).

L'étude électrophorétique menée *in vivo* sur les femelles adultes d'*E. kuehniella* a permis de séparer 12 fractions protéiques chez les témoins, dont le poids moléculaires varient de 29,04 kDa à 233,88 kDa. La comparaison des profils électrophorétiques révèle que l'azadirachtine utilisé à deux doses (DI₂₅, DI₅₀) réduit le nombre de fractions protéiques ; on note l'absence de 3 fractions : 3,6 et 9 dont les poids moléculaires sont respectivement 206,06 kDa, 124,45 kDa et 70,30 kDa chez les traités avec la DI₂₅, et de 6 fractions : 2, 3, 5, 6, 9 et 10 dont les poids moléculaires sont respectivement 219,78 kDa, 206,06 kDa, 150,31 kDa, 124,45 kDa, 70,30 kDa et 42,46 kDa chez les traités avec la DI₅₀.

Des résultats similaires ont été trouvés lors du traitement avec le méthoxyfénozide ; en effet le RH-2485 affecte le profil des protéines hémolympatiques et ovariennes chez *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) (Rajathi *et al.*, 2010) et *S. mauritia* (Resmitha *et al.*, 2014) et *E. kuehniella* (Kirane-Amrani *et al.*, 2018). L'application d'autres mimétiques de l'hormone de mue affecte le profil des protéines, tel que le holofénozide, testé sur des femelles adultes de *T. molitor*, qui entraîne l'absence de 2 fractions protéiques (Taïbi *et al.*, 2003) et affecte le profil des protéines hémolympatiques chez les nymphes de la même espèce (Lakbar, 1999). Soltani-Mazouni *et al.*, 2004, ont montré que, le holofénozide, le tébufénozide et le méthoxyfénozide affectent le profil électrophorétique en diminuant le nombre de fractions protéiques chez *T. molitor*. Le KK-42, un antagoniste de l'hormone de mue, administré *in vivo* (Zerguine, 1998) et *in vitro* (Benlabiod-Boudraa, 1997) chez les femelles de *T. molitor* réduit aussi le nombre de fractions protéiques ovariennes. Récemment (Yezli-Touiker *et al.*, 2018) a prouvé que le captopril entraîne l'absence de trois fractions protéiques chez les adultes femelles d'*E. kuehniella*. Selon Perveen (2011), le chlorfluazuron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, diminue la quantité des protéines testiculaires chez *S. litura*, ce qui suggère une interférence avec la spermatogenèse. Contrairement à nos résultats, le traitement avec le RH-2485 est sans effet significatif sur la qualité des protéines testiculaires chez *E. kuehniella* (Bouzeraa et Soltani-Mazouni, 2014).

La chute des taux des protéines ovariennes, et la modification de l'aspect des ces protéines après traitement avec l'azadirachtine peuvent être attribués à son effet perturbateur de l'équilibre hormonal.

En effet, l'azadirachtine, agit comme un régulateur de croissance en perturbant par ses effets antagonistes sur les ecdystéroïdes et l'HJ, les processus physiologiques comme le développement et la reproduction (Mordue *et al.*, 2005 ; Morgan, 2009).

4.7. Effets de l'azadirachtine sur la morphométrie des ovaires

Chez les insectes, le développement et la reproduction sont contrôlés par des facteurs externes (température, nutrition, photopériode) mais aussi internes comme les hormones et les neurohormones (Gilbert *et al.*, 2002 ; Lafont *et al.*, 2005 ; Gruntenko et Rauschenbach, 2008 ; Hiruma et Kaneko, 2013). De nombreuses études réalisées sur divers ordres d'insectes ont démontré l'implication de l'HJ, de l'ecdysone ainsi que certaines neurohormones dans le contrôle de la physiologie reproductive (Engelmann, 1979 ; Davis *et al.*, 1990 ; Cusson *et al.*, 1994 ; Gäde et Hoffmann, 2005).

Le traitement par application topique des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* nouvellement exuviées avec l'azadirachtine perturbe l'ovogénèse en provoquant une réduction du poids frais des ovaires et du nombre d'ovocytes. L'azadirachtine réduit également la taille de l'ovocyte basal (longueur, largeur et volume).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés après l'application topique de la même molécule sur *B. orientalis* (Tine *et al.*, 2011).

Le Neem-Azal, administré par application topique à la DL₅₀ (0,63 µg) le jour de l'émergence des femelles de *D. melanogaster*, diminue significativement le nombre d'ovocytes par ovaire ainsi que le volume de l'ovocyte basal (Oulhaci *et al.*, 2018). Un blocage de l'ovogénèse et une dégénérescence des cellules folliculaires ont été rapportés chez *Anopheles stephensi* (Diptera : Culicidae) après traitement au Neem-Azal (Lucantoni *et al.*, 2006).

De plus, l'application topique de certains agonistes des ecdystéroïdes (tébufénozide, halophénozide et méthoxyphénozide) réduit le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et la longueur de l'ovocyte basal chez *E. kuehniella* (Hami *et al.*, 2005 ; Khebbab *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012 ; Bakli *et al.*, 2016).

L'halofénozide, affecte la morphométrie des ovaires chez *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001 ; Taïbi, 2007) et chez *B. germanica* (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009a , 2014). Le tébufénozide perturbe la morphométrie des ovaires chez *P. interpunctella* (Silhacek *et al.*, 1990 ; Auzoux-Bordenave, 2005) ; *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera : Noctuidae) (Smagghe et Degheele, 1992) ; *Spodoptera exempta* (Lepidoptera : Noctuidae) (Smagghe et Degheele, 1994) ; *Mamestra brassicae* (Lepidoptera : Noctuidae) et *Pieris brassicae* (Lepidoptera : Pieridae) (Darvas *et al.*, 1992) et chez *Choristoneura fumifirana* (Lepidoptera : Tortricidae) (Dhadialla *et al.*, 2005).

Le dibenzoylhydrazine, un agoniste des ecdystéroïdes provoque une perturbation du développement des ovaires chez *P. interpunctella* et *T. molitor* (Aller et Ramsay, 1988 ; Salem *et al.*, 1997 ; Hami *et al.*, 2005).

Le méthoprène, un régulateur de croissance, analogue de l'hormone juvénile, réduit le nombre d'ovocytes dans les ovaires des femelles de *B. germanica* (Maiza *et al.*, 2004). Le pyriproxifène, un autre analogue de l'hormone juvénile inhibe la croissance des ovaires et entraîne l'immaturité de l'oothèque chez *B. germanica* (Kawada, 1988) ; il provoque une diminution du nombre d'ovocytes par paire d'ovaires et cause une augmentation du volume de l'ovocyte basal chez *T. molitor* (Lakbar, 1999).

L'application du KK-42, dérivé de l'imidazole, inhibiteur de la biosynthèse de l'hormone de mue, réduit le nombre d'ovocyte et la longueur de l'ovocyte basal chez *T. molitor* (Amrani *et al.*, 2004). Des effets similaires sur la morphométrie ont été obtenus chez *B. germanica* avec un insecticide inorganique, l'acide borique, administré par voie orale (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009b) mais aussi, par injection (Habes *et al.*, 2013).

La diminution du poids frais des ovaires, du nombre d'ovocytes ainsi que la taille des ovocytes basaux chez les femelles traitées d'*E. kuehniella* avec l'azadirachtine, pourrait être expliquer par le fait que le processus de la vitellogénèse chez les insectes est sous le contrôle de la 20E et l'hormone juvénile (Engelmann, 1979 ; Davis *et al.*, 1990 ; Cusson *et al.*, 1994 ; Gäde et Hoffman, 2005) ; L'azadirachtine agit comme antagoniste de ces deux hormones (Stark *et al.*, 1990 ; Stark *et al.*, 1992 ; Mordue *et al.*, 2005), et toute interférence dans l'homéostasie de ces hormones avec des sources exogènes (agonistes ou antagonistes) peut entraîner des anomalies dans la croissance des ovocytes, la formation des œufs, et l'embryogenèse (Smaghe *et al.*, 2003). En effet, les ecdystéroïdes permettent la réinitiation méiotique des ovocytes (Lanot *et al.*, 1987) et l'ovulation (Ruegg *et al.*, 1992), alors que l'hormone juvénile contrôle la vitellogénèse mais également la transcription des gènes nécessaires à ce processus (Hoffman et Sorge, 1996 ; Hoffman *et al.*, 1999).

4.8. Effets de l'azadirachtine sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire

Chez *E. kuehniella*, l'ovaire est de type méroïstique polytrophique. Il comprend de 8 à 10 ovarioles, il est constitué par un tube épithélial mésodermique dans lequel les ovocytes sont en succession linéaire reflétant leur développement (William, 1971), chaque ovariole est caractérisée par l'existence de deux zones fonctionnelles, le germanium apical et le vitellarium (Cassier *et al.*, 1997). Le germanium se différencie le premier, il contient des cellules germinales primordiales qui engendrent par division deux catégories de cellules sœurs, des ovocytes et des cellules nourricières ou trophocytes et des cellules somatiques (Cassier *et al.*, 1997). Le vitellarium permet aux ovocytes, entourés par une assise de cellules folliculaires, dont l'ensemble forme un follicule, d'accumuler des réserves (vitellus) et d'acquérir des enveloppes protectrices, sécrétées par le follicule, appelées enveloppe vitelline et chorion (Raikhel et Dhadialla, 1992).

Comme chez toutes les espèces animales, la vitellogénèse comprend deux phases successives: la phase de pré-vitellogénèse (premier accroissement des ovocytes) et la phase de vitellogénèse (phase du dépôt du vitellus). La croissance ovocytaire déterminée par la

longueur de l'ovocyte basal conduit à citer les différentes étapes du développement ovarien (Gerber, 1975).

Les femelles adultes d'*Ephestia kuehniella* débutent leur vitellogénèse à 4 jours après la mue nymphale (Zimowska *et al.*, 1995 ; Beckemeyer et Shirk, 2004). Dans certains cas comme chez les lépidoptères, la sécrétion des enveloppes de l'œuf nécessite l'action conjointe de deux hormones, l'hormone de mue et l'hormone juvénile (Cassier *et al.*, 1997 ; Kidokoro *et al.*, 2006).

Chez les adultes femelles, les cellules folliculaires produisent des ecdystéroïdes (Rees *et al.*, 2010) qui jouent un rôle important dans le développement des ovaires, la vitellogénèse et la maturation des œufs. Ces ecdystéroïdes sont absorbés et accumulés dans des œufs matures et servent comme un substrat hormonale pour les mues embryonnaires au cours de l'embryogénèse (Hagedorn, 1985 ; Lafont *et al.*, 2005). Des expériences *in vitro* ont permis de démontrer que les ovaires produisent des ecdystéroïdes chez des espèces de différents ordres d'insectes comme *S. gregaria* (Rees et Isaac, 1984), *L. migratoria* (Lagueux *et al.*, 1981), *M. sexta* (Thompson *et al.*, 1987), *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al.*, 1999). Martin *et al.*, 2001 ont démontré que la 20E maintenait l'expression des gènes de la vitellogénine dans les corps gras, la protéine étant par la suite acheminée et incorporée aux ovocytes (Koller et Raikhel, 1991). Par ailleurs, la 20E induit la différenciation folliculaire des ovaires (Sahlen, 1994 ; Lafont *et al.*, 2005) et pourrait agir au cours de la choriogénèse (Lin *et al.*, 1993).

Les mesures de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez les séries traitées, ont montré que l'application de l'azadirachtine (DI₂₅, DI₅₀), provoque une diminution hautement significative de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire par rapport aux témoins. Ceci est en accord avec les résultats de Bakli *et al.*, 2016, montrant que le méthoxyfénozide réduit significativement l'épaisseur de l'épithélium folliculaire à différents âges chez *E. kuehniella*. Pareillement, les résultats obtenus *in vivo* par Taïbi *et al.*, 2003, indiquent que le RH-0345 réduit l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez les adultes de *T. molitor*. De même, l'application du diflubenzuron réduit l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez *C. pomonella* (Soltani et Soltani-Mazouni, 1992), *T. molitor* (Soltani-Mazouni, 1994). Le chlorfuazuron affecte également l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez *S. litura* (Farzana et Tadishi, 2000).

Ces effets peuvent être liés à la présence de l'azadirachtine dans les ovaires d'*E. kuehniella*, ce qui exerce une action antagoniste des ecdystéroïdes sur la vitellogénèse et son contrôle endocrine ce qui se traduit par une réduction de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire ; cependant chez les Lépidoptères où la vitellogénèse s'effectue au stade nymphal,

comme *E. kuehniella*, les ecdystéroïdes stimulent la vitellogénèse, mais à des concentrations bien déterminées, une forte dose ou une concentration élevée de la 20E inhibe ce processus (Tsuchida *et al.*, 1987). En effet, l'administration de forte dose de la 20E inhibe la vitellogénèse chez *Lymantria dispar* (Lepidoptera : Erebidæ) (Davis *et al.*, 1990).

4.9. Effets de l'azadirachtine sur l'épaisseur du chorion

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

Les résultats obtenus dans notre expérimentation menée *in vivo* sur les ovaires d'*E. kuehniella* montrent que l'azadirachtine (DI₂₅, DI₅₀) réduit significativement l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux. Nos résultats sont en accord avec ceux de Hami *et al.*, 2005 montrant que le tebufenozide et le holofenozide réduisent significativement l'épaisseur du chorion chez *E. kuehniella*. Le diflubenzuron (DFB), paraît agir sur l'incorporation de précurseurs vitellogéniques dans les ovocytes au cours de leur maturation et sur la synthèse et l'épaisseur du chorion (Soltani et Soltani-Mazouni, 1997). Le KK-42, antagoniste des ecdystéroïdes réduit significativement l'épaisseur du chorion sur les ovocytes de *T. molitor* (Taïbi, 2000 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2000 a et b ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2001). Le captopril appliqué topiquement aux femelles d'*E. kuehniella* réduit significativement l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux (Yezli-Touiker *et al.*, 2016).

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

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

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

4.10. Effets de l'azadirachtine sur le potentiel reproducteur

Le potentiel reproducteur des insectes reste un des facteurs les plus importants de leur indéniable pullulation et l'étude de la reproduction est nécessaire pour toute approche raisonnée visant une diminution sensible des dégâts causés par les déprédateurs (Soltani-Mazouni et Soltani, 1995). Chez *E. kuehniella*, les étapes de la vitellogénèse s'effectuent pendant la vie nymphale, l'accouplement et la fécondation ont lieu pendant les 12 premières heures après l'exuviation adulte (période de préoviposition) et la période d'oviposition dure 3 à 4 jours (Taïbi, 2007 ; Khebbeb *et al.*, 2008 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2011 ; Yezli-Touiker *et al.*, 206).

Nos résultats montrent que l'azadirachtine affecte significativement le potentiel reproducteur des femelles d'*E. kuehniella*. En effet, le traitement des chrysalides femelles dès leur exuviation nymphale augmente la période de préoviposition, réduit la durée de la période d'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs. Radwan *et al.*, 2019 ont rapporté que l'azadirachtine a réduit l'oviposition de la tordeuse du riz, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera : Crambidae). Les effets de l'azadirachtine sur la fécondité et l'oviposition ont également été rapportés chez *D. melanogaster* (Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016 ; Boulahbel *et al.*, 2015 ; Oulhaci *et al.*, 2018). L'impact de l'azadirachtine sur la fécondité et la fertilité est aussi retrouvé chez *L. migratoria* (Mordue *et al.*, 2005), *Musca domestica* (Diptera : Muscidae) (Ghoneim *et al.*, 2007), *S. littoralis* (Pineda *et al.*, 2009), *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae) (Irigaray *et al.*, 2010), *H. armigera* (Abedi *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2015) et *A. stephensi* (Dembo *et al.*, 2015 ; Evans et Hallett, 2016).

Des études antérieures ont révélé que l'administration des agonistes des ecdystéroïdes par voie orale ou par application topique peut produire à long terme des effets toxiques chez les adultes des espèces cibles. En effet, le tébufénozide, le méthoxyfénozide et le halofénozide affectent négativement la fécondité et la fertilité chez plusieurs lépidoptères et coléoptères comme *Choristoneura rosaceana*, *C. pomonella*, *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*,

Leptinotarsa decemlineata, *T. molitor* et *E. kuehniella* (Farinos *et al.*, 1999 ; Knight, 2000 ; Sun *et al.*, 2000 ; Taïbi *et al.*, 2003 ; Osorio *et al.*, 2008 ; Pineda *et al.*, 2009 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

L'impact sur le potentiel reproducteur a été mis en évidence aussi avec les analogues de l'hormone juvénile chez de nombreuses espèces. En effet, le pyriproxifène utilisé *in vivo* par application topique chez les femelles adultes de *T. molitor* affecte significativement leur potentiel reproducteur. Il augmente la durée de la période de préoviposition et diminue la fécondité et la durée du développement embryonnaire (Lakbar, 1999). Aussi, le traitement des œufs par le pyriproxifène et le buprofézine (inhibiteur de la synthèse de la chitine) réduisent la viabilité des œufs, la période d'oviposition et la production d'œufs chez un Coléoptère prédateur d'Homoptères *Delphatus catalinae* (Tong-Xian *et al.*, 2004). Le fénoxycarbe, agoniste de l'hormone juvénile, prolonge la période de préoviposition, réduit la période d'oviposition, la fécondité des femelles et supprime à 100% l'éclosion des œufs (Taïbi, 2000).

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

L'ovogénèse, la vitellogénèse, la maturation des œufs et l'oviposition sont contrôlés par les ecdystéroïdes et l'HJ (Swevers *et al.*, 2005 ; Jagadeeshan *et al.*, 2015). En effet, l'azadirachtine empêche la ponte en inhibant l'ovogénèse et la synthèse des ecdystéroïdes (Linton *et al.*, 1997). De plus, l'azadirachtine module les titres d'ecdystéroïdes et d'hormones juvéniles, qui se manifestent bien par une altération perceptible de la croissance, de la mue, du développement ovarien, de l'ultra structure des ovocytes, de la fécondité et de la viabilité des œufs (Mordue et Blackwell, 1993 ; Su et Mulla, 1999 ; Lucantoni *et al.*, 2006 ; Suman *et al.*, 2010). En outre, l'azadirachtine pourrait affecter chez les femelles le système reproducteur et la vitellogénèse ; en effet, il est cité des altérations morphologiques des ovocytes, une importante dégénérescence des cellules folliculaires mais aussi une fragmentation dans les vésicules germinales et l'inversion de leur localisation (Mordue *et al.*, 2005 ; Lucantoni *et al.*, 2006 ; Ghazawi *et al.*, 2007 ; Denardi *et al.*, 2010 ; 2011 ; Remedio *et al.*, 2015).

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a évalué l'effet d'une formulation commerciale de l'azadirachtine (Neem Azal) antagoniste de l'hormone juvénile « HJ » et des ecdystéroïdes, sur la reproduction d'un Lépidoptère ravageur des denrées stockées : *Ephestia kuehniella* (Zeller 1879).

Des essais insecticides ont été réalisés afin de tester l'efficacité de l'azadirachtine. La mortalité a été relevée à l'émergence de l'adulte. Les doses sublétales et létales (DI₂₅, DI₅₀), déterminées à partir de la régression non linéaire sont de 0,4277 µg et 1,063 µg respectivement. L'azadirachtine affecte le développement nymphal d'où l'apparition de quatre types morphologiques (adulte normaux, adulte malformés au niveau des ailes, une mue partielle et une mue bloquée). Il affecte également la croissance pondérale des chrysalides durant la métamorphose (0, 1, 3, 5, 7 et 9 jours). L'azadirachtine évalué sur les vitélogénines dans le corps gras induit une diminution avec une relation dose-réponse à tous les jours testés (0, 1, 3, 5 et 7 jours). De plus, une diminution du taux des vitellines ovariennes a été noté. La formulation commerciale a également diminué le taux de protéines dans les ovaires, et l'étude électro-phorétique révèle une réduction des fractions chez les individus traités par rapport aux témoins. La chute des taux des protéines ovariennes, et la modification de l'aspect des ces protéines après traitement avec l'azadirachtine peuvent être attribués à son effet perturbateur de l'équilibre hormonal. Des effets sur la morphologie de l'ovaire ont également été notés, à savoir : diminution du poids frais, réduction du nombre d'ovocytes, diminution de la longueur, la largeur ainsi que le volume de l'ovocyte basal, et une diminution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux. Ceci est probablement lié aux interactions endocrines de l'azadirachtine avec les ecdystéroïdes ovariens au cours de la choriogénèse. L'azadirachtine a affecté également la période de préoviposition, l'oviposition, la fécondité et la viabilité des œufs.

Tous ces résultats pourraient être expliqués par le fait que l'azadirachtine agit comme un régulateur de croissance en perturbant par ses effets antagonistes sur les ecdystéroïdes et l'HJ, les processus physiologiques comme le développement et la reproduction.

Ainsi, à l'avenir il serait intéressant de : réaliser une analyse qualitative et quantitative des ecdystéroïdes dans les ovaires et les œufs pondus ; réaliser une analyse quantitative des constituant énergétique ovariens ; suivre la survie des adultes de la première génération ; faire des Westerns blot pour voir exactement quelles sont les protéines qui disparaissent après traitement.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Abbott WS., 1925.** A method for computing the effectiveness of insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
2. **Abedi Z., Saber M., Gharekhani G., Mehrvar A. & Kamita SG. 2014.** Lethal and sublethal effects of azadirachtin and cypermethrin on *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* **107 (2)**: 638- 645.
3. **Abhay P., Nalini SC., Drishtant S., Anup KK., Saneddeep K. & Satwinder KS. 2021.** Effect of gallic acid on the larvae of *Spodoptera litura* and its parasitoid *Bracon hebetor*. *Sci. Rep.* **11**: 531.
4. **Acheuk F., Cusson M. & Doumandji-Mitiche B. 2012.** Effects of a methanolic extract of the plant *Haplophyllum tuberculatum* and of teflubenzuron on female reproduction in the migratory locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Oedipodinae). *J. Insect Physiol.* **58 (3)**: 335-341.
5. **Adel MM. & Sehnal F. 2000.** Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* **46**: 267-74.
6. **Agbo B., Nta A. & Ajaba M. 2019.** Propriétés bio-pesticides du Neem (*Azadirachta indica*). Livre : Progrès et Tendances des Sciences Agricoles. Editeur : *Book Publisher International.* **1**: 17-26.
7. **Ahmad S., Ansari MS. & Muslim M. 2015.** Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Crop. Protection.* **68**: 72-78.
8. **Aller HE. & Ramsay JR. 1988.** RH-5849 - A novel insect growth regulator with a new mode of action. *Brighton. Crop. Prot. Conf.* **2**: 511-512.

9. **Alouani A., Rehim N. & Soltani N. 2009.** Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the republic of Algeria. *Jordan J. Biol. Sci.* **2** (1): 15-22.

10. **Alouani A., Rehim N. & Soltani N. 2018.** Ovicidal activity of Azadirachtin and *Bacillus thuringiensis israelensis* against eggs of mosquito *Culex pipiens*. *Mint. J. Pharma. Med. Sci.* **7**: 8-12.

11. **Amdam A., Norberg K., Hagen A. & Omholt S. 2002.** Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (4): 1799-1802.

12. **Amrani L., Zerguine K., Farine JP., Smagghe G. & Soltani-Mazouni N. 2004.** Imidazole derivative KK-42 reduces ecdysteroid titers and interferes with reproductive processus in adult females of *Tenebrio molitor*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **80**: 163-172.

13. **Amtul JS., 2014.** *Azadirachta indica* derived compounds as inhibitors of digestive alphaamylase in insect pests: Potential bio-pesticides in insect pest management. *Europ. J. Exp. Biol.* **4** (1): 259-264.

14. **Anuradha A., Annadurai RS. & Shashidhara LS. 2007.** Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **37** (6): 627-634.

15. **Attardo GM., Hansen IA. & Raikhel AS. 2005.** Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implication for anaautogeny. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **35**: 661-675.

16. **Auzoux-Bordenave S., Solvar M., Queguiner I., Bozzolan F., Mottier V., Siaussat D., Porcheron P. & Debernard S. 2005.** Comparative effects of a non-steroidal ecdysone agonist RH-5992 and 20-hydroxyecdysone in a Lepidopteran cell line (IAL-PID2). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **35** (9): 1033-1042.

17. **Aylin E., Deniz T. & Olga S. 2016.** Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Biol. Sci.* **69**: 335-344.

B

18. **Bai H., Gelman DB. & Palli SR. 2010.** Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Pest. Manag. Sci.* **66 (9)**: 936-943.
19. **Bakli D., Kirane-Amrani L., Soltani-Mazouni N. & Soltani N. 2016.** Methoxyfenozide, an ecdysteroid agonist insecticide, alters oocyte growth during metamorphosis of *Ephestia kuehniella* Zeller. *Afr. Entomol.* **24 (2)**: 453–459.
20. **Balashowsky K., 1972.** Blood sucking ticks (Ixodidae) - Vectors of diseases of man and animals. *Mix. Publ. Ent. Soc. Am.* **(8)**: 161-376.
21. **Banerjee A., Manna S. & Saha SK. 2014.** Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaf on oocyte maturation, oviposition, reproductive potentials and embryonic development of a freshwater fish ectoparasite *Argulus bengalensis* Ramakrishna, 1951 (Crustacea: Branchiura). *Parasitol. Res.* **113 (12)**: 4641-4650.
22. **Baozhu Z., Chaojun L. & Weiquan Q. 2017.** Effectiveness of the botanical insecticide azadirachtin against *Tirathaba rufivena* (Lepidoptera: Pyralidae). *Fla. Entomol.* **100**: 215-218.
23. **Barbosa WF., De Meyer L., Guedes RNC. & Smagghe G. 2015.** Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology.* **24 (1)**: 130-142.

24. **Barnby MA. & Klocke JA. 1987.** Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Noctuidae). *J. Insect Physiol.* **133**: 69.
25. **Batabyal B., 2021.** Les microbes du sol en tant que pesticides biologiques: applications et environnements agricoles. *Journal international de pharmacie et des sciences de la vie.* **12 (1)**: 34-42.
26. **Beckemeyer EF. & Shirk PD. 2004.** Development of the larval ovary in the moth, *Plodia interpunctella*. *J. Insect Physiol.* **50**: 1045-1051.
27. **Bellés X., Cassier P., Cerdà X., Pascual N., André M., Rosso Y. & Piulasha MD. 1993.** Induction of choriogenesis by 20-hydroxyecdysone in the German cockroach *In*: Schal, C., Holbrook, G.L., Bachmann, J.A.S., V.L., Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica*: Juvenile hormone as a pleiotrophic master regulator. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **35**: 405-426.
28. **Bellés X. & Piulachs MD. 2015.** Ecdysone signalling and ovarian development in insects: from stem cells to ovarian follicle formation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1849 (2)**: 181-186.
29. **Benelli G., Canale A. & Toniolo C. 2017.** Neem (*Azadirachta indica*): toward the ideal insecticide. *Nat. Prod. Res.* **31**: 369–386.
30. **Bendjedid H., Yezli-Touiker S., Taffar A. & Soltani N. 2021.** Phytochemical composition and insecticidal activities of essential oil of *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) aerial parts and its properties against biomarkers of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* **24 (4)**: 792-807.
31. **Benlabiod-Boudraa I., 1997.** Activité *in vitro* d'un inhibiteur de la biosynthèse des ecdystéroïdes, KK-42, sur le développement des ovaires de *Tenebrio molitor* L: Aspects morphométrique et biochimiques. Mémoire de Magister. Université d'Annaba. Algérie.

32. **Bernardes RC., Tomé HV., Barbosa WF., Guedes RN. & Lima MAP. 2016.** Azadirachtin-induced antifeeding in neotropical stingless bees. *Apidologie*. **48 (3)**: 275-285.
33. **Bezzar-Bendjazia R., Kilani-Morakchi S. & Aribi N. 2016.** Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. *Pest. Bioch. Physiol.* **133**: 85-90.
34. **Bhumi T., Urvi C. & Pragna P. 2017.** Biopesticidal potential of some Plant Derived Essential Oils Against The Stored Grain Pests. *Int. J. Zool. Invest.* **3**: 188-197.
35. **Blaney WM., Simmonds MSJ., Ley SV., Anderson JC. & Toogood PL. 1990.** Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.* **55 (2)**: 149-160.
36. **Bliss CI., 1938.** The transformation of percentages for use in the analysis of variance. *Ohio J. Sci.* **38**: 9-12.
37. **Boggs CL., 2009.** Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct. Ecol.* **23**: 27-37.
38. **Boulahbel B., Aribi N., Kilani-Morakchi S. & Soltani N. 2015.** Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20- hydroxyecdysone. *Afr. Entomol.* **23 (1)**: 224-233.
39. **Bouzeraa H. & Soltani-Mazouni N. 2014.** Comparative effects of two moulting hormone agonists (methoxyfenozide and tebufenozide) on the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae): Ecdysteroids amounts of testes and reproductive events. *World Appl. Sci. J.* **31 (11)**: 1903-1910.
40. **Bradford MM., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities on protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72 (1-2)**: 248-254.

41. **Butterworth JH. & Morgan ED. 1968.** Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J. chem. Soc. Chem. Commun.* **1**: 23-24.

C

42. **Camarda A., Pugliese N., Bevilacqua A., Circella E., Gradoni L., George D., Sparagano O. & Giangaspero A. 2018.** Efficacy of a novel neem oil formulation (RP03™) to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Med. Vet. Entomol.* **32**: 290-297.
43. **Capinera JL. & Froeba JG. 2007.** Behavioral responses of *Schistocerca Americana* (Orthoptera: Acrididae) to azadirachtin (neem)-treated host plants. *J. Econ. Entomol.* **100** (1): 117-122.
44. **Cassier P., 1996.** L'exploitation de deux milieux. Le passage de la vie imaginaire chez les insectes. Le contrôle endocrinien. *Bull. Soc. Zool.* **17**.
45. **Cassier P., Descamps M., Lafont R., Porchet M. & Soyez D. 1997.** La reproduction des invertébrés : Stratégies, modalités et régulation intérêt fondamental et appliqué. *Edition Masson*. Paris. 354.
46. **Celestino D., Braoios GI., Ramos RS., Gontijo LM. & Guedes RNC. 2014.** Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallescens*. *Biol. Control.* **59** (6): 697-705.
47. **Charleston DS., Kfir R., Dicke M. & Vet LE. 2005.** Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth. *J. Chem. Ecol.* **32** (2): 325-49.
48. **Charleston DS., Kfir R., Dicke M. & Vet LE. 2006.** Impact of botanical extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella*

- xylostella* and its natural enemies: A field test of laboratory findings. *Biol. Control.* **39** (1): 105- 114.
49. **Chaudhary S., Kanwar RK., Sehgal A., Cahill DM., Barrow CJ., Sehgal R. & Kanwar JR. 2017.** Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Front. Plant. Sci.* **8**: 610.
50. **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*. *Int. J. Genomics.* 426025.
51. **Chutulo EC. & Chalannavar RK. 2018.** Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *Azadirachta indica*: a comprehensive review. *J. Fungi.* **4**: 42.
52. **Cordeiro EMG., Corrêa AS., Venzon M. & Guedes RNC. 2010.** Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. *Chemosphere.* **81** (10): 1352-1357.
53. **Cranna N. & Quinn L. 2009.** Impact of steroid hormone signals on *Drosophila* cell cycle during development. *Cell Div.* **4**: 3.
54. **Cusson MCG., Carruthers K., Wyatt GR., Tobe SS. & Mc Neil JN. 1994.** Regulation of vitelogenin production in army word moth, *Seudaletia unipuncta*. *J. Insect Physiol.* **40**: 183-199.
- D**
55. **Da Costa JT., Forim MR., Costa ES., De Souza JR., Mondego JM. & Junior ALB. 2014.** Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. *J. Stored Prod. Res.* **56**: 49-53.

56. **Darabian K. & Yarahmadi F. 2017.** Field efficacy of azadirachtin, chlorfenapyr, and *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on Sugar Beet Crop. *J. Entomol. Res. Soc.* **19**: 45–52.

57. **Darvas B., Polgar L., Tag El-Din MH., Katalin E. & Wing KD. 1992.** Developmental disturbances in different insect orders caused by an ecdysteroid agonist, RH-5849. *J. Econ. Entomol.* **85**: 2107-2112.

58. **Davis RE., Kelly TJ., Masler EP., Fescemeyer HW., Thyagaraja BS. & Borkovec AB. 1990.** Hormonal control of vitellogenesis in the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): suppression of hemolymph vitellogenin by the juvenile hormone analog, methoprene. *J. Insect. Physiol.* **36**: 231-238.

59. **Delanoue R., Slaidina M. & Leopold P. 2010.** The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *Drosophila* fat cells. *Dev. Cell.* **18** (6): 1012-1021.

60. **Delhoum H., Aribi N., Kilani-Morakchi S. & Soltani N. 2016.** Effects of 20-Hydroxyecdysone and insulin application on reproduction in *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Anim. Plant Sci.* **26** (3): 823-832.

61. **Dembo EG., Abay SM., Dahiya N., Ogboi JS., Christophides GK., Lupidi G., Chianese G., Lucantoni L. & Habluetzel A. 2015.** Impact of repeated NeemAzal®-treated blood meals on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Parasites & Vectors.* **8** (1): 94.

62. **Denardi SE., Bechara GH., Oliveira PR. & Camargo-Mathias MI. 2010.** *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Exp. Parasitol.* **126** (4): 462–470.

63. **Denardi SE., Bechara GH., Oliveira PR., Nunes ET. & Camargo-Mathias MI. 2011.** Inhibitory Action of Neem Aqueous Extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the

- Vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Ticks. *Microsc. Res. Techn.* **74** (10): 889-899.
- 64. Deravel J., Krier F. & Jacques P. 2014.** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **18** (2): 220-232.
- 65. Dere B., Ulya Nurulloğlu Z. & Altuntaş H. 2019.** Effets de l'azadirachtine sur le développement d'insectes modèles *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Université des sciences et technologies d'Anadolu - C: *Sci Vie biotech.* **8** (1): 85-91.
- 66. Dhadialla TS., Carlson GR. & Le DP. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 545 -569.
- 67. Dhadialla TS., Retnakaran A. & Smagghe G. 2005.** Insect growth and development disrupting insecticides. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comp. Insect Mol. Sci. Elsevier*, Oxford, UK. **6**: 55–116.
- 68. Dhadialla TS., Retnakaran A. & Smagghe G. 2010.** Insect growth and development disrupting insecticides. In: Gilbert L.I. & Gill S.S. (Eds). *Insect Control. Elsevier*, New York. USA. 121-166.
- 69. Downer RGH., 1985.** Lipid metabolism. In comprehensive Insect physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 10 (G. A .Kerkert. & L.I. Gilbert, eds). Pergamon Press, Oxford. 77-113.
- 70. Drabo SF., Coulibaly YA., Romba R., Balboné M. & Gnankiné O. 2019.** Biochemical resistance to insecticides in *Bemisia tabaci* field population from Burkina Faso, West Africa. *Phytoparasitica.* **47** (5).
- 71. Duarte JP., Redaelli LR., Jahnke SM. & Trapp S. 2019.** Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and adults. *Fla. Entomol.* **102**: 408–412.

72. **Dubrovsky EB., 2005.** Hormonal cross talk in insect development. *Trends. Endocrinol. Metab.* **16** (1): 6-11.
73. **Dureau R., 2020.** Gestion collective d'un risque ravageur pour améliorer la résilience des systèmes fourragers. Modélisation bioéconomique de la gestion des pullulations de campagnols terrestres. Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne, 255 pages.

E

74. **Eissa EE., Radwan EH., Abdel Hakeem N., Abdel Aziz KK., Hashem HO. & Radwan KH. 2020.** Impact of Chlorpyrifos on the Second Instar Mosquito Larvae as Bioindicator in El-Beheira Governorate, Egypt. *Inter. J. Immol.* **1** (1): 1-13.
75. **Engelmann F., 1979.** Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. In: Treherne J E., Berridge M J., Wigglesworth V B. (Eds). Advances in insect physiology, New York, *Academic Press.* 49-108.
76. **Evans BG. & Hallett RH. 2016.** Efficacy of biopesticides for management of the swede midge (Diptera: Cecidomyiidae). *J. Econ. Entomol.* **109** (5): 2159-2167.

F

77. **Fabre MC., Descamps M. & Baert JL. 1990.** Identification and Partial Characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulata* Latreille (Myriapoda Chilopoda). In Proceedings of the 8th International Conference on Myriapodology, Innsbruck, Austria. *Ber. nat.-ined. Verein. Innsbruck.* 117-121.
78. **Farder-Gomes CF., Saravanan M., Martínez LC., Plata-Rueda A., Zanuncio JC. & Serrão JE. 2021.** Azadirachtin-based biopesticide affects the respiration and digestion in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Rev.*
<https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1892764>.

- 79. Farinões GP., Smaghe G., Tirry L. & Castanera P. 1999.** Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeonnymus mariaefranciscas* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **41**: 201-213.
- 80. Farzana P. & Tadishi M. 2000.** Effects of Sublethal Dose of Chlorfluazuron on Ovarian Development and Oogenesis in the Common Cutworm *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **93** (5): 1131-1137.
- 81. Feder D., Valle D., Rembold H. & Garcia ES. 1988.** Azadirachtin-Induced Sterilization in Mature Females of *Rhodnius prolixus*. *Zeitschrift für Naturforschung.* **43**: 908-913.
- 82. Ferdenache M., Bezzar-Bendjazia R., Marion-Poll F. & Kilani-Morakchi S. 2019.** Transgenerational effects from single larval exposure to azadirachtin on life history and behavior traits of *Drosophila melanogaster*. *Sci. Rep.* **9**: 17015.
- 83. Fernadez SR., Barreiros L. & Oliveira RF. 2019.** Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State of the art. *Fitoterapia.* **134**: 141–150.
- 84. Fisher RA. & Yates F. 1957.** Statical tables for biological agricultural and medical research. 5^{ème} edition, Olivier et Boyd. London. 64-66.

G

- 85. Gäde G. & Hoffmann KH. 2005.** Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol. Entomol.* **30**: 103-12.
- 86. Ganter GK., Walton KL., Merriman JO., Salmon MV., Brooks KM., Maddula S. & Kravitz EA. 2007.** Increased male-male courtship in ecdysone receptor deficient adult flies. *Behav. Genet.* **37** (3): 507–512.

87. **Gerber GH., 1975.** Reproduction behaviour and physiology of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Egg development and oviposition in young females and effects of mating. *Can. Entomol.* **107**: 551-559.
88. **Gilbert LI., Granger NA. & Roe RM. 2000.** The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Bioch. Mol. Biol.* **30**: 617-644.
89. **Gilbert LI., Rybczynski R. & Warren JT. 2002.** Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 883–916.
90. **Gilbert LI., Serafin RB., Watkins NL. & Richard DS. 1998.** Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *J. Insect Physiol.* **44 (7-8)**: 637-644.
91. **Gnanamani R. & Dhanasekaran S. 2013.** Growth inhibitory effects of Azadirachtin against *Pericallia ricini* (Lepidoptera: Arctiidae). *World J. Zool.* **8**: 185-191.
92. **Ghazawi NA., El-Shranoubi ED., El-Shazly MM. & Abdel Rahman KM. 2007.** Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). *J Orthopt. Res.* **16 (1)**: 57-65.
93. **Ghoneim KS., Amer MS., Bream AS., AL-Dali AG. & Hamadah KHSH. 2007.** Effectiveness of Margosan-O and Jojoba on Some Reproductive Aspects of the House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Int. J. Agri. Biol.* **9 (2)**: 338-341.
94. **Gougbe Semako A., Aboudou K., Chatigre KO., Noukpozoukou MSP. & Soumanou MM. 2021.** Optimisation *in vitro* de l'efficacité des biopesticides dans la lutte contre les principaux ravageurs du niébé par la méthode des surfaces de réponse. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **15 (1)**: 41-53.
95. **Govindachari T., Narasimhan N., Suresh G., Partho P. & Gopalakrishnan G. 1996.** Insect antifeedant and growth-regulating activities of salannin and other C-seco limonoids from neem oil in relation to azadirachtin. *J. Chem. Ecol.* **22**: 1453-1461.

- 96. Govindarajan M. & Rajeswary M. 2015.** Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* **114** (5): 1949-1961.
- 97. Gruntenko NE. & Rauschenbach IY. 2008.** Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J. Insect. Physiol.* **54**: 902-908.
- 98. Gruntenko NE. & Rauschenbach IY. 2009.** 20-hydroxyecdysone, juvenile hormone and biogenic amines: Mechanisms of interaction in control of *Drosophila* reproduction under normal and stressful conditions. In: Smagghe, G. (Ed). *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 317-332.
- 99. Gujar GT. & Mehrotra KN. 1983.** Juvenilizing effect of azadirachtin on a noctuid moth, *Spodoptera litura* Fabr. *Indian J. Exp. Biol.* **21**: 292-293.
- 100. Gulzer A., Ali MM., Tariq M., Bodlah I., Tariq K. & Ali A. 2019.** Lethal and sub lethal effects of *Azadirachta indica* seed extract on the development of spotted bollworm *Earias vittella* (Fab.). *Gesunde Pflanzen.* **71**: 19-24.
- 101. Gupta RC. & Milatovic D. 2014.** Insecticides. In: Gupta, R.C. (Ed). Biomarkers in Toxicology. *Academic Press, Elsevier*, Amsterdam. 389-407.

H

- 102. Habes D., Messiad R., Gouasmia S. & Grib L. 2013.** Effects of an inorganic insecticide (boric acid) against *Blattella germanica*: Morphometric measurements and biochemical composition of ovaries. *Afr. J. Bio.* **12** (18): 2492-2497.

- 103. Hagedorn HH., 1985.** The role of ecdysteroids in reproduction. Dans *Comprehensive insect physiology, Biochemistry and pharmacology*. Kerkut G. A. et Gilbert, L. I. (Eds), Pergamon, Oxford. **8**: 205- 262.
- 104. Hagstrum DW. & Subramanyam B. 2009.** Stored-Product Entomology Information Sources: *Revue. Am. Entomol.* **55 (3)**: 174-183.
- 105. Hami M., Taibi F. & Soltani-Mazouni N. 2004.** Toxicité comparée de quelques mimétiques de l'hormone de mue à l'égard des chrysalides d'*Ephestia kuehniella*. *Euro Mediterranean Workshop on Animal Ecology*. 22-24.
- 106. Hami M., Taibi F., Smaghe G. & Soltani-Mazouni N. 2005.** Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides against the Mediterranean flour moth. *Comm. Appl. Sci. Ghent University.* **70 (4)**: 767-773.
- 107. Hamilton Jamora A., Wada-Katsumata A., Ko A. & Schal C. 2020.** Effets de l'ingestion et de l'application topique de novaluron sur le développement et la reproduction de blattes allemandes (*Blattella germanica*). *Pest Manag Sci.* **77 (2)**: 877-885.
- 108. Hao F., Kumar S., Yadav N. & Chandra D. 2014.** Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Rev. on Cancer.* **1846 (1)**: 247-257.
- 109. Hasan F. & Ansari MS. 2011.** Toxic effects of neem-based insecticides on *Pieris brassicae* (Linn.). *Crop Prot.* **30 (4)**: 502-507.
- 110. Hiruma K. & Kaneko Y. 2013.** Hormonal Regulation of Insect Metamorphosis with Special Reference to Juvenile Hormone Biosynthesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **103**: 73-100.

- 111. Hoffmann KH. & Sorge D. 1996.** Vitellogenin levels in allectomized female crickets *Gryllus bimaculatus* de geer (Ensifera, Gryllidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **32**: 549 -558.
- 112. Hoffmann KH., Meyering-Vos. & Lorenz WM. 1999.** Allatostatins and allatotropins : is the regulation of corpora allata activity their primary function. *Eur. J. Entomol.* **96**: 255-266.
- 113. Huang JF., Shui KJ., Li HY., Hu MY. & Zhong GH. 2011.** Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SI-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. *Pest. Biochem. Physiol.* **99 (1)**: 16- 24.
- 114. Huang X., Warren JT. & Gilbert LI. 2008.** New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J. Genet. Genomics.* **35**: 1–10.
- 115. Hummel HE., Langner SS., Hein DF., Sanguanpong U. & Schmutterer H. 2016.** Unusually versatile plant genus *Azadirachta* with many useful and so far incompletely exploited properties for agriculture, medicine and industry. *Acta Fytotechn. Zootechn.* **18 (5)**: 1269-175.

I

- 116. Irigaray FJ., Moreno-Grijalba F., Marco V. & Pérez-Moreno I. 2010.** Acute and reproductive effects of Align®, an insecticide containing azadirachtin, on the grape berry moth, *Lobesia botrana*. *J. Insect. Sci.* **10**: 33.
- 117. Isam MB., 1999.** Neem and related natural products. In: Hall F.R., Menn J.J., editors. Method in Biotechnology and Biopesticides: Use and Delivery. *Humana Press Inc.* NJ. 139-153.
- 118. Isman MB., 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* **51**: 45-66.

- 119. Isman MB. & Grieneisen ML. 2014.** Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends Plant Sci.* **19 (3)**: 140-145.
- 120. Isman MB., Koul O., Luczynski A. & Kaminski A. 1990.** Insecticidal and antifeedant bioactivities of Neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agr. Food. Chem.* **38**: 1406-1411.

J

- 121. Jacob F. & Monod J. 1961.** Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Biol. Med.* **3**: 318-321.
- 122. Jagadeeshan S., Shah U., Chakrabarti D. & Singh RS. 2015.** Female choice or male sex drive? The advantages of male body size during mating in *Drosophila melanogaster*. *PloS. One.* **10 (12)**: 0144672.
- 123. Jagannadh V. & Nair V. 1992.** Azadirachtin-induced effects on larval-pupal transformation of *Spodoptera mauritia*. *J. Physiol. Entomol.* **17**: 56-61.
- 124. Jayaraj R., Magha P. & Sreedev P. 2016.** Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol.* **29(3-4)**: 90-100.

K

- 125. Kaufman PB., Wu W., Kim D. & Cseke LJ. 1995.** Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. *In. CRC. Press. INC.* 109.
- 126. Kaur HG. & Garg H. 2014.** Pesticides: Environnemental Impacts and Management Strategies, Pesticides - Toxic Aspects. *In Tech.* **10**: 5772-57399.

- 127. Kawada H., 1988.** An insect growth regulator against cockrochers. In: Ishaaya, and Horowitz, A.R. (eds). Novel phenoxy juvenile analog (Pyriproxyfen) suppresses embriogenesis and adult emergence of the sweet potato whitefly (Homptera, Aleurodidae). *J. Entomol.* **85 (6)**: 2113-2117.
- 128. Khebbeb MEH., Gaouaoui R. & Bendjeddou F. 2008.** Tebufenozide effects on the reproductive potentials of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Afr. J. Biotechnol.* **7 (8)**: 1166-1170.
- 129. Kidokoro K., Iwata KI., Fujiwara Y. & Takeda M. 2006.** Effects of juvenile hormone analogs and 20-hydroxyecdysone on diapauses termination in eggs of *Locusta migratoria* and *Oxya yezoensis*. *J. Insect. Physiol.* **52**: 473- 479.
- 130. Kilani-Morakchi S., Aribi N., Farine JP., Smaghe G. & Soltani N. 2009 a.** Halofenozide affects sexual behavior, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroaches *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Belg. J. Biotech.* **8 (4)**: 704-708.
- 131. Kilani-Morakchi S., Aribi N. & Soltani N. 2009 b.** Activity of boric acid on German cockroaches: Analysis of residues and effects on reproduction. *Afr. J. Biotechnol.* **8**: 703-708.
- 132. Kilani-Morakchi S., Badi A., Aribi N., Farine JP. & Soltani N. 2014.** Toxicity of Tebufenozide, an Ecdysteroid Agonist, to *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *Afr. Entomol.* **22 (2)**: 337-342.
- 133. Kilani-Morakchi S., Bezzar-Bendjazia R., Ferdenache M. & Aribi N. 2017.** Preimaginal exposure to azadirachtin affects food selection and digestive enzymes in adults of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pest. Biochem. Physiol.* **140**: 58-64.

- 134. Kirane-Amrani L., Bakli D., Tazir A. & Soltani N. 2018.** Effect of methoxyfenozide on synthesis of major proteins in ovaries of *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Biosci.* **12** (4): 16-22.
- 135. Knight AL., 2000.** Tebufenozide targeted against codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) adults, eggs, and larvae. *J. Econ. Entomol.* **93**: 1760-1767.
- 136. Koodalingam A., Deepalakshmi R., Ammu M. & Rajalakshmi A. 2014.** Effects of Neem Azal on marker enzymes and hemocyte phagocytic activity of larvae and pupae of the vector mosquito *Aedes aegypti*. *J. Asia Pac. Entomol.* **17** (2): 175-181.
- 137. Koller CN. & Raikhel AS. 1991.** Initiation of vitellogenin uptake and protein synthesis in the mosquito (*Aedes aegypti*) ovary in response to a blood meal. *J. Insect. Physiol.* **37**: 703–711.
- 138. Koriem KMM., 2013.** Review on pharmacological and toxicological effects of oleum azadirachtin oil . *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3** (10): 834–840.
- 139. Kozlova T. & Thummel CS. 2003.** Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Sci.* **301** (5641): 1911-1914.
- 140. Kreutweiser DP., Back RC., Sutton TM., Thompson DG. & Scarr TA. 2002.** Community-level disruptions among zooplankton of pond mesocosms treated with a neem (azadirachtin) insecticide. *Aquat. Toxicol.* **56**: 257–273.
- 141. Kurtuluş A., Pehlivan S., Denis AT. & Atakan E. 2020.** Influence of different diets on some biological parameters of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.* **85**: 101554.

ℒ

142. **Laemmli VK., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
143. **Lafont R., Dauphin-Villemant C., Warren JT. & Rees H. 2005.** Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier, Oxford, UK. **3**: 125–195.
144. **Lagueux M., Harry P. & Hoffman JA. 1981.** Ecdysteroids are bound s of to vitelling in newly laid eggs of *Locusta*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 224- 325.
145. **Lai D., Jin X., Wang H., Yuan M. & Xu H. 2014.** Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *J. Biotechn.* **185**: 51-56.
146. **Lakbar C., 1999.** Effets de deux régulateurs de croissance, le RH-0345 et le pyriproxylene sur le développement de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Mag., Université d'Annaba, Algérie.
147. **Lanot R., Thiebold J., Lagueux M., Goltzene F. & Hoffmann JA. 1987.** Involvement of ecdysone in the control of meiotic reinitiation in oocytes of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera). *Dev. Biol.* **12**: 174-181.
148. **Lemoine A., 1980.** Ces protéines cuticulaires de *T. molitor* quelques méthodes de quantification et d'identification. Rapport DEA et entomologie. Université de Dijon.
149. **Li Y., Hernandez-Martinez S. & Noriega FG. 2004.** Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in mosquitoes, effect of allatostatic head factors, PISCF and YXFCLAmid- allatostatins. *Regul. pept.* **118 (3)**: 175-182.

- 150. Li Y., Unnithan GC., Veenstara JA., Feyerisen R. & Noriega FG. 2003.** Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti* *in vitro*: Effect of farnesoic acid and Aedesallatotropin. *J. Exp. Biol.* **206**: 1825-1832.
- 151. Lim TK., 2014.** *Azadirachta indica*. In: Lim, T.k (Eds). *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*. Springer, Dordrecht, Netherlands. **8**: 409-455.
- 152. Lima DB., Melo JWS., Guedes NMP., Gontijo LM., Guedes RNC. & Gondim Jr MGC. 2015.** Bioinsecticide-predator interactions: azadirachtin behavioral and reproductive impairment of the coconut mite predator *Neoseiulus baraki*. *PloS One.* **10** (2): e0118343.
- 153. Lin Y., Hamblin MT., Edwards MJ., Barillas-Mury C., Kanost MR., Knipple DC., Wolfner MF. & Hagedorn HH. 1993.** Structure, expression, and hormonal control of genes from the mosquito, *Aedes aegypti*, which encode proteins similar to the vitelline membrane proteins of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **155** (2): 558-568.
- 154. Linton YM., Nisbet AJ. & Mordue AJ. 1997.** The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *J. Insect Physiol.* **43**: 1077–1084.
- 155. Louat F., 2013.** Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*. Thèse de doctorat. Sciences agricoles. Université d'Orléans.
- 156. Lucantoni L., Giusti F., Cristofaro M., Pasqualini L., Esposito F., Lupetti P. & Habluetzel A. 2006.** Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocytes ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and Cell.* **38** (6): 361- 371.
- 157. Lumbreas CI., Galante E. & Mena I. 1991.** Ovarian condition as an indicator of the phenology of *Bubas bubas*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **84**: 190-194.

- 158. Luna-Cruz A., Rodríguez-Leyva E., Lomeli-Flores JR., Ortega-Arenas LD., Bautista-Martínez N. & Pineda S. 2015.** Toxicity and residual activity of insecticides against *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *J. Econom. Entomol.* **108** (5): 2289-2295.
- 159. Lynn OM., Kim JE. & Lee KY. 2012.** Effects of azadirachtin on the development and gene expression of fifth instar larvae of Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *J. Asia Pac. Entomol.* **15** (1): 101-105.

M

- 160. Ma DL., Gordh G. & Zalucki MP. 2000.** Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on cotton and artificial diet. *Aust. J. Entomol.* **39** (4): 301-304.
- 161. Maamcha Z., 1997.** Etude bioécologique de la pyrale de farine *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Effet du Flucycloxuron à l'égard des nymphes sur la sécrétion cuticulaire. Mag., Université d'Annaba, Algérie.
- 162. Maiza A., Aribi N., Smaghe G., Kilani-Morakchi S., Bendjedid M. & Soltani N. 2013.** Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad and indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*. *Bull. Insectology.* **66** (1): 11-20.
- 163. Maiza A., Kilani S., Fraine JP., Aribi N. & Soltani N. 2004.** Reproductive effects in German cockroach by ecdysteroid agonist RH- 0345, juvenile hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **69** (3): 257-266.
- 164. Manna B., Maiti S. & Das A. 2020.** Sex dimorphic adaptive responses against Azadirachtin toxicity in gut tissues of *Spathosternum prasiniferum prasiniferum* (Orthoptera; Acridoidea). *Int. J. Trop. Insect Sci.* **41**: 107–114.

- 165. Margaritis LH., 1985.** Structure and the physiology of the eggshell. In: Gilbert L.H., Kerkut G. a. (Eds). *Comprehensive Insect Physiology. Biochem. Pharm.* Vol. 6. Pergamon Press, Oxford. UK. 151-230.
- 166. Margaritis LH. & Mazzini M. 1998.** Structure of the egg. In: Harrison. F. W., Loke M. (Eds), *Microscopic Anatomy of invertebrates. Insecta.* Vol. 11 c. Wiley-Liss, New York. 995-1037.
- 167. Martin D., Wang SF. & Raikel AS. 2001.** The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor. *Mol. Cell. Endocrin.* **173**: 75-86.
- 168. Martinez SS. & Emden HFV. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* **30(1)**: 113-125.
- 169. Martoja R. & Martoja M. 1967.** Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale. *Masson* ; Paris. 345 p.
- 170. Mauer HR., 1991.** Diselectrophoresis and related tecnic of polyacrylamid gel electrophoresis. Walter degoryter. Berlin.
- 171. Medina P., Budia F., Del Estal P. & Viñuela E. 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *J. Econ. Entomol.* **97 (1)**: 43-50.
- 172. Meiselman M., Lee SS., Tran RT., Dai H., Ding Y. & Rivera-Perez C. 2017.** Réseau endocrinien essentiel au succès de la reproduction chez *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114 (19)**: 3849-3858.
- 173. Min-Li Z. & Shin-Foon C. 1987.** The effects of azadirachtin on the ecdysteroid titre in the larvae of *Ostrinia furnacalis* Guenée. *J. App. Entomol.* **103 (1-5)**: 355-359.

- 174. Momen FM. & El-Laithy AY. 2007.** Suitability of the flour moth *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) for three predatory phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) in Egypt. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **27 (02)**: 102.
- 175. Montauban C., Mas M., S.Wangensteen O., Sarto IMV., Gisbert FD., Ferré M. & Lopez-Baucells A. 2021.** Les chauves-souris comme échantillonneurs naturels: Premier signalement du charançon de l'eau du riz, ravageur envahissant, *Lissorhoptrus oryzophilus* dans la péninsule ibérique. *Prot. Cult.* **141**: 105427.
- 176. Mordue AJ. & Blackwell A. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect. Physiol.* **39 (11)**: 903- 924.
- 177. Mordue LAJ., Morgan ED. & Nisbet AJ. 2005.** Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, UK. **6**: 117–135.
- 178. Mordue LAJ., Morgan ED. & Nisbet AJ. 2010.** Addendum: Azadirachtin, a natural product in insect control: An update. In: Gilbert, L.I. et Gill, S.S. (Eds). *Insect Control*. Elsevier, Oxford, UK. 204–206.
- 179. Morgan ED., 2009.** Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.* **17 (12)**: 4096- 4105.
- 180. Mossa A., 2016.** Green Pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J. Environ. Sci. Technol.* **9 (5)**: 354-378.
- 181. Muhammad UA., Raza M., Waseem A., Mubasshir S., Javed AT. & Muhammad I. 2018.** Comparative efficacy of Neem derivatives and imidacloprid against some cotton pests. *J. Entomol. Zool. Stud.* **6 (3)**: 113-117.

N

182. **Narendra G., Khokhar S. & Ram P. 2013.** Effet des insecticides sur certains paramètres biologiques de *Trichogramma chilonis* Ishii (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J. Cont. Bio.* **27 (1)** : 1-9.
183. **National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2018.**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>
184. **Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P. & Hens L. 2016.** Chemical pesticides and Human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health.* **4**: 148.
185. **Nouri-Ganbalani G., Borzoui E., Abdolmaleki A., Abedi Z. & George KS. 2016.** Effets individuels et combinés de *Bacillus Thuringiensis* et de l'azadirachtine sur *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Insect Sci.* **16 (1)**: 95.

O

186. **Ochi DO., Umezuegbu JC., Mahmud H., Ekebafé LO. & Ani MO. 2020.** Transesterification of neem (*Azadirachta indica*). *Niger. Res. J. Chem. Sci.* **8 (1)**: 91-103.
187. **Ono H., Rewitz KF., Shinoda T., Itoyama K., Petryk A., Rybczynski R., Jarcho M., Warren JT., Marqués G., Shimell MJ., Gilbert LI. & O'Connor MB. 2006.** Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Bio.* **298 (2)**: 555–570.
188. **Osorio A., Martínez AM., Schneider MI., Díaz O., Corrales JL., Avilés MC., Smagghe G. & Pineda S. 2008.** Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. *Pest. Manag. Sci.* **64**: 1001-1007.

- 189. Oulhaci CM, Denis B. & Kilani-Morakchi S. 2018.** Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Pest. Manag. Sci.* **74**: 174–180.
- 190. Ozer M., 1953.** Etude anatomique et biologique d'*Ephestia kuehniella* Z. La teigne des farines. Comportement de ponte et alimentation des chenilles. *Inst. National de la Recherche Agronomique*. Paris.

P

- 191. Pakyari H., Amir-Maafi M. & Moghadamfar Z. 2016.** Oviposition model of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econom. Entomol.* **109** (5): 2069- 2073.
- 192. Pakyari H., Amir-Maafi M., Moghadamfar Z. & Zalucki M. 2018.** Estimating development and temperature thresholds of *Ephestia kuehniella*: Toward improving a mass production system. *Bull. Entomol. Res.* 1-8.
- 193. Pandey S., Pandey JP. & Tiwari RK. 2011.** Effet de certains insecticides à base de neem sur la forme et la pigmentation des ailes chez le papillon citronné, *Papilio demoleus* L. *Revue Mond. Sci. App.* **13**(6): 1356-1360.
- 194. Pandir D., Sahingoz R. & Ercan FS. 2013.** Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* eggs and larvae exposed to a static magnetic field and preference by *Trichogramma embryophagum*. *Biocontrol Sci. Technol.* **23** (12): 1402-1411.
- 195. Payne ND., 1966.** The differential effects of environmental factors Upon *Micibracon hebetor* and its most *Ephestia kuehniella*. *Bull. Mar. Biol. Lab.*
- 196. Pener MP. & Dhadialla TS. 2012.** An overview of insect growth disruptors; applied aspects. *Adv. Insect. Physiol.* **43**: 1-162.
- 197. Perveen F., 2011.** Effects of sublethal doses of chlorfluazuron on the testicular biochemical constituents of *Spodoptera litura*. *Afr. J. Biotech.* **10**: 8956-8964.

- 198. Peter WK., Sonya Baird MA. & Ramaswamy B. 2002.** Morphology and formation of the eggshell in the tarnished plang bug, *Lygus lineolans* (Palisot de beauvois) (Hemiptera: Miridea). *Arthropod Struct. Dev.* **31**: 131-146.
- 199. Petryk A., Warren JT., Marqués G., Jarcho MP., Gilbert LI., Kahler J., Parvy JP., Li Y., Dauphin-Villemant C. & O'Connor MB. 2003.** Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Of Sc. USA.* **100 (24)**: 13773–13778.
- 200. Phambala K., Tembo Y., Kasambala T., Kabambe VH., Stevenson PC. & Belmain SR. 2020.** Bioactivity of common pesticidal plants on Fall armyworm larvae (*Spodoptera frugiperda*). *Plants.* **9**: 112.
- 201. Pineda S., Martínez AM., Figueroa JI., Schneider MI., Del Estal P., Viñuela E., Gómez B., Smagghe G. & Budia F. 2009.** Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **102 (4)**: 1490-1496.
- 202. Pinto LZ., Bitondi MMG. & Simões ZLP. 2000.** Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect. Physiol.* **46 (2)**: 153-160.
- 203. Pintong AR., Ampawong S., Komalamisra N., Sriwichai P., Popruk S. & Ruangsittichai J. 2020.** Insecticidal and Histopathological Effects of *Ageratum conyzoides* Weed Extracts against Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *Insects.* **11 (4)**: 224.
- 204. Popp J., Peto K. & Nagy J. 2013.** Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **33**: 243-255.
- 205. Postlethwait JH., Bownes M. & Jowett T. 1980.** Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **79 (2)**: 379-387.

Q

- 206. Qiao J., Zou X., Lai D., Yan Y., Wang Q., Li W., Deng S., Xu H. & Gu H. 2014.** Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. *Pest Manag. Sci.* **70** (7): 1041- 1047.
- 207. Qin D., Zhang P., Zhou Y., Liu B., Xiao C., Chen W. & Zhang Z. 2019.** Antifeeding effects of azadirachtin on the fifth instar *Spodoptera litura* larvae and the analysis of azadirachtin on target sensilla around mouthparts. *Cambre. Insect Biochem. Physiol.* 103p.
- 208. Qin D., Zheng Q., Zhang P., Lin S., Huang S., Cheng D. & Zhang Z. 2021.** L'azadirachtine affecte directement ou indirectement l'abondance de la flore intestinale des *Spodoptera litura* et la conversion énergétique du contenu intestinal médie l'équilibre énergétique de l'axe intestin-cerveau, et avec une diminution de l'expression CREB dans les neurones du cerveau. *Pestic. Biochem. Phys.* **173**: 104778.

R

- 209. Radwan EH., Hashem HO., Youssef NS. & Shalaby AM. 2019.** The effects of Zanzalacht on the gonotrophic cycle of the adult house fly *Musca domestica*. *J. Plant Anim. Eco.* **1** (2): 23-39.
- 210. Rahardjo IB., Marwoto B. & Budiato K. 2020.** Efficacy of selected plant extracts to control leafminer (*Liriomyza* spp.) in chrysanthemum. *Agrivita J. agric. Sci.* **42**: 2245-2256.
- 211. Raikhel AS. & Dhadialla TS. 1992.** Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Ann. Rev. Entomol.* **37**: 217-251.

- 212. Rajathi A., Pandiarajan J. & Krishnan M. 2010.** Effect of RH-2485 on development, metamorphosis and synthesis of major proteins in female silkworm *Bombyx mori*. *Biologia Warsaw, Poland.* **65:** 903–913.
- 213. Rao PJ. & Subrahmanyam B. 1986.** Azadirachtin induced changes in development, food utilization and haemolymph constituents of *Schistocerca gregaria* Forskel. *J. Appl. Entomol.* **102:** 217-224
- 214. Rees DA., Giles P., Lewis MD. & Ham J. 2010.** Adenosine regulates thrombomodulin and endothelial protein C receptor expression in folliculo stellate cells of the pituitary gland. *Purinergic signal.* **6:** 19-29.
- 215. Rees HH. & Isaac RE. 1984.** Biosynthesis of ovarian ecdysteroid phosphates and their metabolic fate during embryogenesis in *Schistocerca gregaria*. In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of invertebrate hormones (Hoffmann J.A. & Porchet M., Eds) Springer, Berlin. 181-185.
- 216. Remedio RN., Nunes PH., Anholeto LA., Oliveira PR. & Camargo-Mathias MI. 2015.** Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* **114 (2):** 431-444.
- 217. Remedio RN., Nunes PH., Anholeto LA., Oliveira PR., Sá ICG. & Camargo-Mathias MI. 2016.** Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. *Micron.* **83:** 19-31.
- 218. Resmitha C., Reshma RM., Punathumpambath B. & Vadakkadath Meethal K. 2014.** The ecdysone mimic, methoxyfenozide, alters the level of major haemolymph proteins in the larvae of *Spodoptera mauritia* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Biologica Indica.* **3 (2):** 726-730.

- 219. Richard DS., Watkins NL., Serafin RB. & Gilbert LI. 1998.** Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *J. Insect Physiol.* **44 (7-8):** 637–644.
- 220. Robker RL., Akison LK., Bennett BD., Thrupp PN., Chura LR., Russell DL., Lane M. & Norman RJ. 2009.** Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94 (5):** 1533-1540.
- 221. Roma GC., Bueno OC. & Camargo-Marthias MI. 2010.** Morpho-physiological analysis of the insect fat body. *Micron.* **41 (5):** 395-401.
- 222. Ruegg RP., Orchard I. & Davey KG. 1992.** 20-hydroxyecdysone as a modulator of activity in neurosecretory cells of *Rodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.* **28:** 243- 248.

S

- 223. Saber M., Hejazi MJ. & Hasan SA. 2004.** Effects of azadirachtin / NeemAzal on different stages and adult life table parameters of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J. Econ. Entomol.* **97 (3):** 905–910.
- 224. Sahlen G., 1994.** Ultrastructure of eggshell of *Aeshna juncea* (L.) (Odonata. Aeshnidae). *Int. J. Embryol.* **23:** 345-354.
- 225. Sahrudi G., Kumar A., Puppala M. & Shankar AG. 2021.** Comparative efficacy of certain commercial and natural neem products against leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) on paddy. *J. Entomol. Zool. Stud.* **9 (1):** 1540-1542.
- 226. Saleem S., Muhammad G., Hussain MA. & Bukhari SNA. 2018.** A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytother. Res.* **32:** 1241–1272.

- 227. Salem H., Smagghe G. & Degheele D. 1997.** Effects of tebufenozide on oocytes growth in *Plodia interpunctella*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **62** (1): 9-13.
- 228. Saxena A. & Kesari VP. 2016.** Lack of genotoxic potential of pesticides, spinosad, imidacloprid and neem oil in mice (*Mus musculus*). *J. Environ. Bio.* **37** (2): 291.
- 229. Sayah F., Fayet C., Idiomar M. & Karlinsky A. 1996.** Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermaptera). *Tissue Cell.* **28** (6): 741–749.
- 230. Schmutterer H., 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* **35**: 271-297.
- 231. Schmutterer H. & Singh RP. 1995.** List of insect pests susceptible to neem products. The neem tree: *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceae plants. *VCH*, New York. 326-365.
- 232. Sedlacek JD., Weston PA. & Barney RJ. 1995.** Lépidoptères et psocoptères. Dans «Gestion intégrée des insectes dans les produits stockés» (Bh. Subramanyam et DW Hagstrum, Eds.). Marcel Dekker., Inc, New York. 40-70.
- 233. Senthil-Nathan S., Choi MY., Seo HY., Paik CH., Kalaivani K. & Kim JD. 2008.** Effect of azadirachtin on acetylcholine esterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Sta^ol). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **70** (2): 244–250.
- 234. Shahriari M., Zibae A., Sahebzadeh N. & Shamakhi L. 2018.** Effets de l' α -pinène, du trans-anéthol et du thymol en tant que constituants de l'huile essentielle sur le système antioxydant et l'acétylcholine estérase de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pestic. Biochem. Phys.* **150**: 40-47.
- 235. Shao X., Lai D., Zhang L. & Xu H. 2016.** Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by Azadirachtin A in *Spodoptera litura* Cells. *Sci. Rep.* **6**: 35-48.

- 236. Shaurub ESH., El-Meguid AA. & El-Aziz NMA. 2014.** Quantitative and ultrastructural changes in the haemocytes of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) treated individually or in combination with *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV) and azadirachtin. *Micron*. **65**: 62-68.
- 237. Shelton AM. & Nault BA. 2004.** Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop. Prot.* **23**: 497–503.
- 238. Shu B., Yu H., Li Y., Zhong H., Li X., Cao L. & Lin J. 2021.** Identification des gènes sensibles à l'azadirachtine chez les larves de *Spodoptera frugiperda* sur la base de l'ARN-seq. *Bioch. Phys. Pestic.* **172**: 104745.
- 239. Shu B., Zhang J., Cui G., Ranran S., Yi X., Zhong G., 2018.** L'azadirachtine affecte la croissance de *Spodoptera litura* Fabricius en induisant l'apoptose dans l'intestin moyen des larves. *Front. Physiol.* **9**: 137.
- 240. Silhacek DL., Oberlander H. & Porcheron P. 1990.** Action of RH-5849, a nonsteroidal ecdysteroid mimic, on *Plodia interpunctella* (Hubner) *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Insect. Biochem. Phys.* **15**: 201-212.
- 241. Smagghe G. & Degheele D. 1992.** Effects of the non steroidal ecdysteroid agonist, RH-5849 on production of *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitica.* **48**: 23-29.
- 242. Smagghe G. & Degheele D. 1994.** Action of the non steroidal ecdysteroid mimic RH-5849 on larval development and adulte reproduction of insects of differents order. *Invert. Reprod. Dev.* **25**: 227- 236.
- 243. Smagghe G., Braeckman BP., Huys N. & Raes H. 2003.** Cultured mosquito cells *Aedes albopictus* C6/36 (Diptera: Culicidae) responsive to 20-hydroxyecdysone and non-steroidal ecdysone agonist. *J. Appl. Ent.* **127**: 167–173.

- 244. Smagghe G., Gomez LE. & Dhadialla TS. 2012.** Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. In: Dhadialla, T.S. (Ed). *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, Burlington, MA, USA. **43**: 163–249.
- 245. Soltani N. & Soltani-Mazouni N. 1992.** Diflubenzuron and oogenesis in colding moth, *Cydia pomonella* L. *Pest. Sci.* **34**: 257-261.
- 246. Soltani N. & Soltani-Mazouni N. 1997.** Oogenesis in mealworms: Cell density of germarium, thickness of chorion and ecdysteroid production. Effect of regulator. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **62 (2B)**: 565- 571.
- 247. Soltani-Mazouni N. & Hami M. 2010.** Effets de deux agonistes des ecdystéroïdes sur la reproduction chez *Ephestia kuehniella* (Insectes, Lépidoptères) : dosage des acides nucléiques et des protéines ovariens. Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat, N° 47, Tome I, 153-156.
- 248. Soltani-Mazouni N., 1994.** Effects of ingested diflubenzuron on ovarian development during the sexual maturation of *Tenebrio molitor* (L.). *Tissue & Cell.* **26 (3)**: 439-445.
- 249. Soltani-Mazouni N., Amrani L., Boudraa I. & Zerguine K. 2000.** Inhibitory activity of an imidazole compound on ecdysionsynthetic organs in mealworm under *in vivo* and *in vitro* contions. *Revue Sci. Techno.* **14**: 125-128.
- 250. Soltani-Mazouni N., Boukachabia A. & Smagghe G. 2004.** Biological activity of some moulting hormone agonists in mealworm: ecdysteroïd and protein analysis in ovaries. *Revue Synthèse.* **14**: 7-10.
- 251. Soltani-Mazouni N., Hami M. & Gramdi H. 2011.** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction and Development*. DOI : 10.1080/07924259.582695.

- 252. Soltani-Mazouni N., Hami M. & Gramdi H. 2012.** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* (Zeller). *Invertebr. Reprod. Dev.* **56 (2)**: 157-163.
- 253. Soltani-Mazouni N., Khebbeb MEH. & Soltani N. 1999.** Production d'ecdystéroïdes ovarien durant la maturation des ovocytes chez *Tenebrio molitor*. *Ann. Soc. Entomol. France.* **35**: 82-86.
- 254. Soltani-Mazouni N. & Soltani N. 1995.** Effet du Diflubenzuron en traitement *in vivo* et *in vitro* sur la morphométrie de l'ovaire de *Tenebrio molitor*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **60 (35)**: 961-967.
- 255. Soltani-Mazouni N., Taïbi F. & Zerguine K. 2001.** Evaluation de deux régulateurs de croissance sur le potentiel reproducteur d'un ravageur des denrées stockées. *Revue Synthèse.* **9**: 95-103.
- 256. Soltani-Mazouni N., Taïbi F., Smaghe G. & Soltani N. 2000.** Comparative action of two insect growth regulators, RH-0345 and KK-42, on reproductive events in adult females of mealworm. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **65 (2a)**: 453-450.
- 257. Soulages JL. & Wells MA. 1994.** Lipophorin: The structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv. Prot. Chems.* **45**: 371-415.
- 258. Sporleder M. & Lacey LA. 2013.** Biopesticides. In: Giordanengo, P. Vincent, C. Alyokhin, A. (Eds). *Insect pests of potato: Global perspectives on biology and management*. Elsevier, Oxford, UK. 463-497.
- 259. Sridhara S. & Lee VH. 2013.** Tebufenozide disrupts ovarian development and function in silkworms. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43 (12)**: 1087-1099.
- 260. Stanley-Samuelson DW. & Pedibhotla VK. 1996.** What can we learn from prostaglandins and related eicosanoids in insects? *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**: 223-234.

- 261. Stanley-Samuelson DW., Jurenka RA., Cripps C., Blomquist GJ. & de Renobales M. 1988.** Fatty acids in insects: composition, metabolism, and biological significance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **9**: 1-33.
- 262. Stark JD., Vargas RI. & Thalman RK. 1990.** Azadirachtin: effects on metamorphosis, longevity and reproduction of three tephritid fruit fly species. *J. Econ. Entomol.* **83** (6): 2168-2174.
- 263. Stark JD., Wong TTY., Vargas RI. & Thalman RK. 1992.** Survival, Longevity and reproduction of tephritid fruit fly parasitoids (Hym. Braconidae) reared from fruit flies exposed to azadirachtin. *J. Econ. Entomol.* **85**: 1125-1129.
- 264. Su T. & Mulla MS. 1999.** Oviposition bioassay responses of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* to neem products containing azadirachtin. *Entomol. Exp. Appl.* **91**: 337-345.
- 265. Suman DS., Parashar BD. & Prakash S. 2010.** Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **47** (6): 996-1002.
- 266. Sun X., Barrett BA. & Biddinger DJ. 2000.** Fecundity and fertility reductions in adult leafrollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonist tebufenozide and methoxyfenoside. *Entomol. Exp. Appl.* **94**: 75-83.
- 267. Swevers L., 2019.** Une mise à jour sur la signalisation de l'ecdysone pendant l'ovogenèse des insectes. *Curr. Opin. Insect Sci.* **31**: 8-13.
- 268. Swevers L., Raikhel AS., Sappington TW., Shirk P. & Iatrou K. 2005.** Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, U.K. **6**: 87-156.

- 269. Taffar A., Yezli-Touiker S., Bendjedid H. & Soltani N. 2021.** Evaluation of azadirachtin, a biopesticides, on growth, development and cuticle secretion of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *J. Entomol. Res.* **45 (3)**: 436-443.
- 270. Taïbi F., 2000.** Activités de quelques effecteurs de la biosynthèse de l'hormone de mue sur la production d'ecdysteroids des ovariens, la ponte et la viabilité des œufs chez *Tenebrio molitor*. Thèse de Magister. Université d'Annaba. Algérie.
- 271. Taïbi F., 2007.** Etude comparée du développement et de la reproduction chez deux ravageurs des denrées stockées *Ephestia kuehniella* et *Tenebrio molitor*: Aspect endocrinien en rapport avec l'impact d'un mimétique de l'hormone de mue, le RH-0345. Thèse de doctorat en Biologie et Physiologie Animale. Université d'Annaba. Algérie.
- 272. Taïbi F., Smaghe G., Amrani L. & Soltani-Mazouni N. 2003.** Effect of ecdysone agonist RH- 0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol Part C.* **135**: 257- 267.
- 273. Tarlack P., Mehrkhou F. & Mousavi M. 2014.** Life history and fecundity rate of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) on different wheat flour varieties. *Arch. Phytopathol Plant Prot.* **48 (1)**: 95-103.
- 274. Telfer WH., 2009.** Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect. Sci.* **9**: 50.
- 275. Thompson MJ., Rees HH. & Wilzer KR. 1987.** Isolation and identification of 26-hydroxyecdysone 2-phosphate: An ecdysteroid conjugate of egg and ovaries of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Physiol.* **4**: 183.
- 276. Tine S., 2013.** Etude de la biodiversité des blattes dans la région semi-arides et arides et évaluation de l'impact d'insecticides chez *Blattella germanica* et *Blatta orientalis* (Dictyoptera, Blattellidae). Thèse de doctorat. Université d'Annaba. Algérie.

- 277. Tine S., Aribi N. & Soltani N. 2011.** Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera: Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *Afr. J. Biotech.* **10 (85)**: 19816-19824.
- 278. Toivonen JM. & Partridge L. 2009.** Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **299 (1)**: 39-50.
- 279. Tomé HVV., Martins JC., Corrêa AS., Galdino TVS., Picanço MC. & Guedes RNC. 2013.** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Protection.* **46**: 63-69.
- 280. Tong-Xian L. & Stansly A. 2004.** Lethal and sublethal effects of two insect growth regulators on adult *Delphastus catalinae* (Coleoptera; Coccinellidae), a predator of whiteflies (homoptera: aleyrodidae) Elsevier. *Sci. Biological. Control.* **30**: 298-305.
- 281. Trematerra P. & Gentile P. 2010.** Five years of mass trapping of *Ephestia kuehniella* Zeller: a component of IPM in a flour mill. *J. Appl. Entomol.* **134**: 149-156.
- 282. Trougakos IP. & Margaritis LH. 2002.** Novel morphological and physiological aspects of insect Eggs. In: Hiker M. Meiners T. (Eds), *Chemioecology of insect Eggs and Egg Deposition* Blackwell Verlag Gmbh, Berlin, Vienna. 3-36.
- 283. Tsuchida K., Nagata M. & Suzuki A. 1987.** Hormonal control of ovarian development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **5**: 167-177.
- 284. Tufail M., Nagaba Y., Elgendy AM. & Takeda M. 2014.** Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomol. Sci.* **17 (3)**: 269–282.
- 285. Tunca H., Kilincer N. & Ozkan C. 2012.** Side-effects of some botanical insecticides and extracts on the parasitoid, *Venturia canescens* (Grav.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Turk Entomol. Derg.* **36**: 205-14.

- 286. Turchen LM., Golin V., Butnariu AR., Guedes RNC. & Pereira MJB. 2016.** Lethal and sublethal effects of insecticides on the egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae). *J. Eco. Entomol.* **109 (1)**: 84-92.

U

- 287. Ureña E., Manjón C., Franch-Marro X. & Martín D. 2014.** Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111 (19)**: 7024-7029.

V

- 288. Vieira V., Tavares J. & Daumal L. 1992.** Influence des températures alternees sur le developpement larvaire d'*Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Açoreana.* **7 (3)**: 471-477.

W

- 289. Wang L., Phan DDK., Zhang J., Ong PS., Thuya WL., Soo R., Wong A LA., Yong WP., Lee SC., Ho PCL., Sethi G. & Goh BC. 2016.** Anticancer properties of nimbolide and pharmacokinetic considerations to accelerate its development. *Oncotarget.* **7 (28)**: 44790.
- 290. Wang Z., Cheng X., Meng Q., Wang P., Shu B., Hu Q., Hu M. & Zhong G. 2015.** Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **4 (64)**: 126-135.
- 291. White NJ., Pukrittayakamee S., Hien TT., Faiz MA., Mokuolu OA. & Dondorp AM. 2014.** Paludisme. *Lancet.* **383 (9918)**: 723-735.
- 292. William JCK., 1971.** Follicle cell protein synthesis in moth, *Ephestia kuehniella* oocytes. *Insect Physiol.* **17**: 217-232.

- 293. Wismar J., Habtemichael N., Warren JT., Dai JD., Gilbert LI. & Gateff E. 2000.** The mutation without children (rgl) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **226** (1): 1-17.

Υ

- 294. Yamanaka N., Rewitz KF. & O'Connor MB. 2013.** Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu. Rev. Entomol.* **58**: 497-516.
- 295. Yezli-Touiker S. & Soltani-Mazouni N. 2011.** Profil des ecdystéroïdes durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae). *Synthèse.* **22**: 49–55.
- 296. Yezli-Touiker S., Soltani-Mazouni N., Kirane-Amrani L. & Soltani N. 2016.** Delayed effects of caproptil on the mediterranean flour moth: reproductive events, of ovaries. Biochemical composition and molting hormone contents of ovaries. *Fresenius Environ. Bull.* **25** (4): 1190-1205.
- 297. Yezli-Touiker S., Taffar A., Meskache R. & Soltani N. 2018.** Impact of captopril on *Ephestia kuehniella*: Ovarian Nucleic Acid Amounts and Protein Analysis. *Tunis. J. Plant Prot.* **13**: 77-85.
- 298. 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. *Dev.* **133** (13): 2565-2574.

Z

- 299. Zeller PC., 1879.** Lepidopterologische Bemerkungen. *Entomologische Zeitung herausgegeben von dem entomologischen vereine zu Stettin.* **40**: 462-473.

- 300. Zerguine K., 1998.** Activité *in vivo* d'un inhibiteur de la biosynthèse des ecdystroïdes, dérivé de l'imidazole, (KK-42) sur la reproducteur de *Tenebrio molitor*. Thèse de Magister en physiologie animale: option application agronomique et médicales. ISN. Université d'Annaba. Algérie.
- 301. Zhou Y., Qin DQ., Zhang PW., Chen XT., Liu BJ., Cheng DM. & Zhang ZX. 2020.** Integrated LC–MS and GC–MS-based untargeted metabolomics studies of the effect of azadirachtin on *Bactrocera dorsalis* larvae. *Sci. Rep.* **10**: 2306.
- 302. Zimowska G., Shirk, PD., Silhacek DL. & Shaaya E. 1995.** Termination of vitellogenesis in follicles of the moth, *Plodia interpunctella*: changes in oocyte and follicular epithelial cell activities. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**: 357-380.
- 303. Zimowska G., Silhacek DL., Schaaya E. & Shirk P. 1991.** Immuno-fluorescent analysis of follicular growth and development in whole ovaries of the Indian meal moth. *J. Morphol.* **209**: 215-228.

ANNEXE 1 :
TABLEAU ET FIGURES

ANNEXE 1 : TABLEAU ET FIGURES

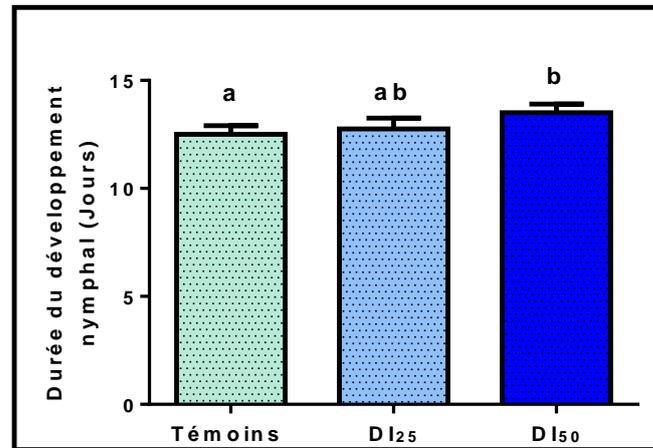


Figure 16. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella* sur la durée du développement nymphal ($m \pm sd$; $n = 12$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Tableau 28. Types morphologiques induits des nymphes témoins et traitées à l'azadirachtine aux deux doses (DI₂₅ et DI₅₀) d'*Ephestia kuehniella* nouvellement exuviées. (3 répétitions, $n = 60$). **N** : Adulte Normal ; **M** : Adulte Malformé ; **MP** : Mue Partielle ; **MB** : Mue Bloquée.

Répétitions	Types morphologiques (Témoins)				Effectifs
	N	M	MP	MB	
1	85,71 (12)	7,14 (1)	0 (0)	7,14 (1)	14
2	78,57(11)	7,14 (1)	0 (0)	14,28(2)	14
3	84,37(27)	9,37 (3)	0 (0)	6,25 (2)	32
m \pm sd	82,88 \pm 3,79	7,88 \pm 1,28	00 \pm 00	9,22 \pm 4,40	60
Types morphologiques (Traitées DI ₂₅)					
1	53,33 (16)	20 (6)	3,33 (1)	23,33 (7)	30
2	46,66 (7)	26,66 (4)	0 (0)	26,66 (4)	15
3	53,33 (8)	20 (3)	0 (0)	26,66 (4)	15
m \pm sd	51,10 \pm 3,85	22,22 \pm 3,84	1,11 \pm 1,92	25,55 \pm 1,92	60
Types morphologiques (Traitées DI ₅₀)					
1	34,48 (11)	22,58 (7)	12,90 (4)	29,03 (9)	31
2	35,71 (5)	21,42 (3)	7,14 (1)	21,42 (3)	14
3	46,66 (7)	33,33 (5)	6,66 (1)	26,66 (4)	15
m \pm sd	39,28 \pm 6,38	25,77 \pm 6,56	8,90 \pm 3,47	25,70 \pm 3,89	60

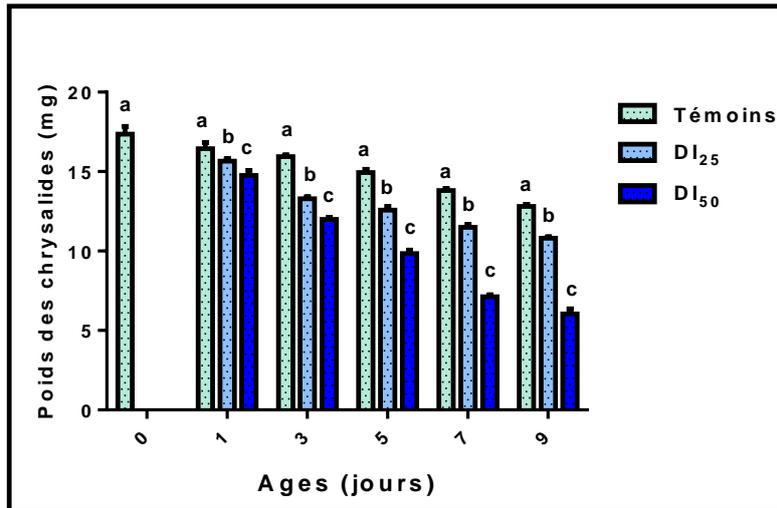


Figure 17. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) sur l'évolution pondérale (mg) des chrysalides femelles d'*Ephestia kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ($m \pm sd$; $n = 6$). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

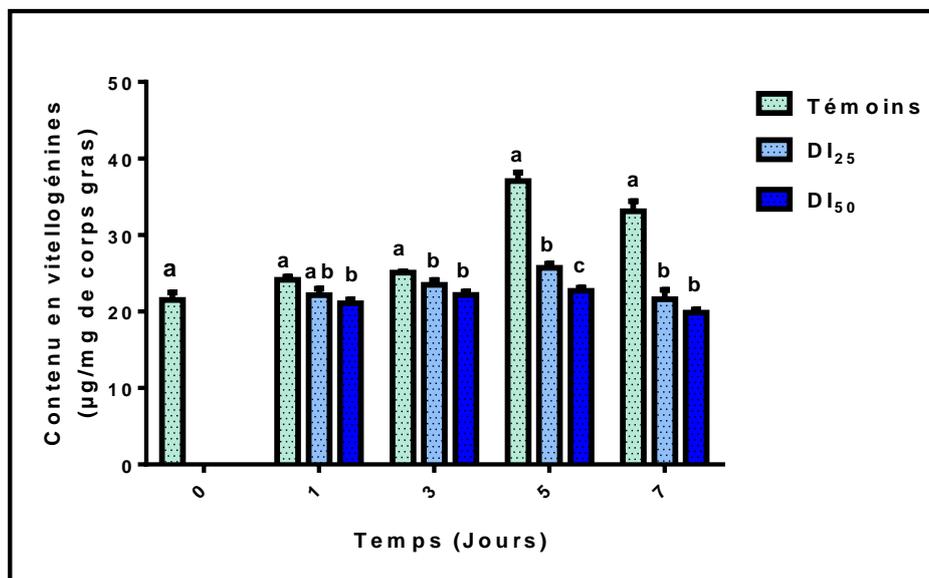


Figure 18. Effets de l'azadirachtine, administrée par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) le jour de l'exuviation nymphale, sur le contenu en vitellogénines (μ g/mg de tissu) dans les corps gras au cours du stade nymphal chez les femelles d'*Ephestia kuehniella* ($m \pm sd$; $n = 12$). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

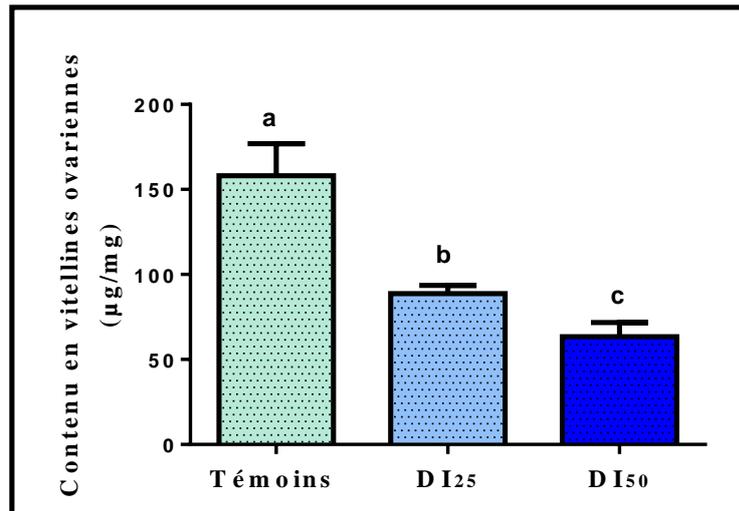


Figure 19. Effet *in vivo* de l'azadirachtine (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg), sur le contenu en vitellines ovariennes (µg/mg) à l'émergence chez les adultes femelles d'*Ephestia kuehniella*. (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p < 0,05.

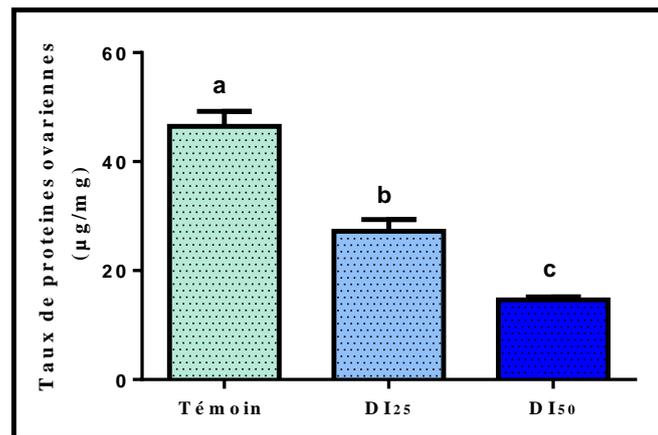


Figure 20. Effet *in vivo* de l'azadirachtine (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) administré par application topique à l'exuviation nymphal d'*Ephestia kuehniella* sur le taux des protéines ovariennes (µg/mg) mesuré à l'émergence adulte (<8h). (m ± sd ; n = 6, p < 0,0001). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à p > 0,05.

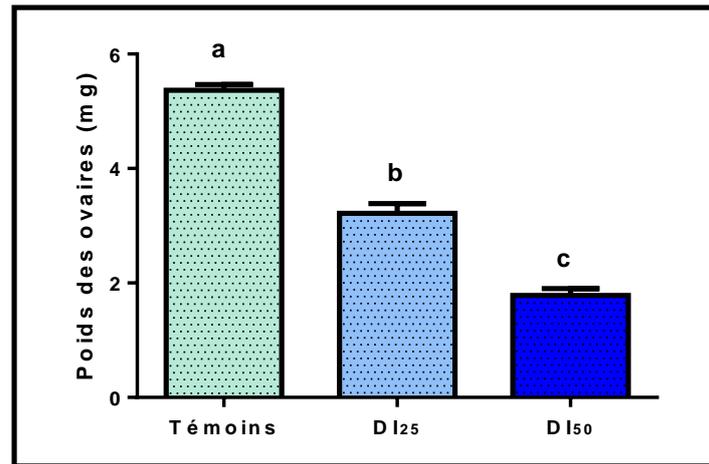


Figure 21. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) à l'exuviation nymphale chez *Ephestia kuehniella* sur le poids frais (mg) des ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm sd$; $n = 12$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

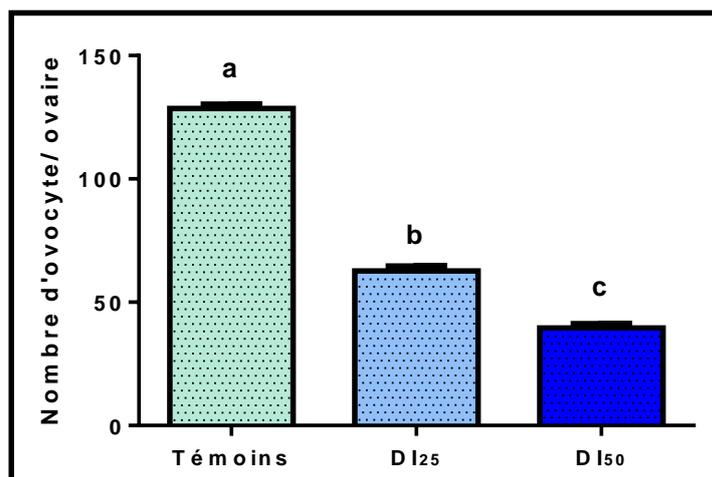


Figure 22. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella* sur le nombre d'ovocyte par paire d'ovaires, mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm sd$; $n = 12$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

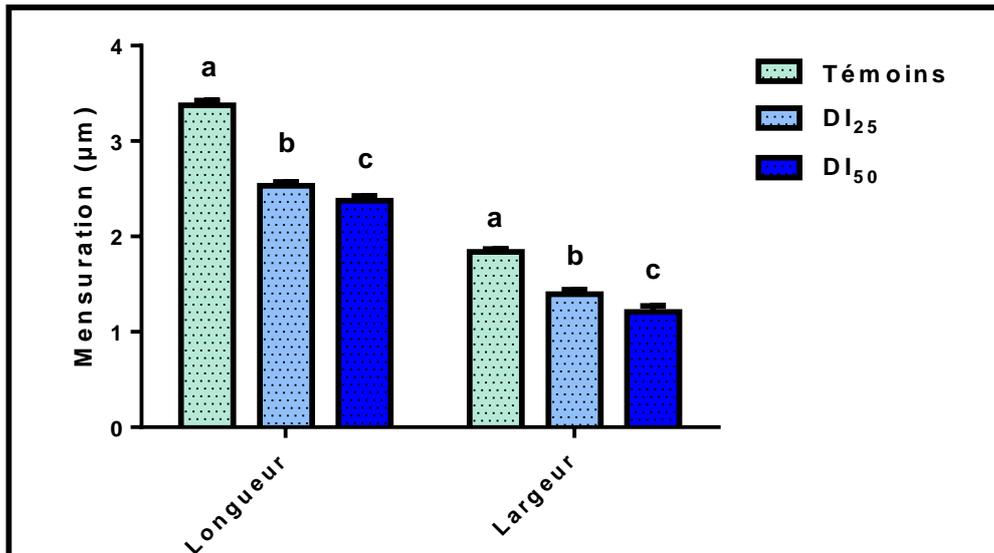


Figure 23. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez *Ephesia kuehniella* sur la longueur et la largeur de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm sd$; $n = 12$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

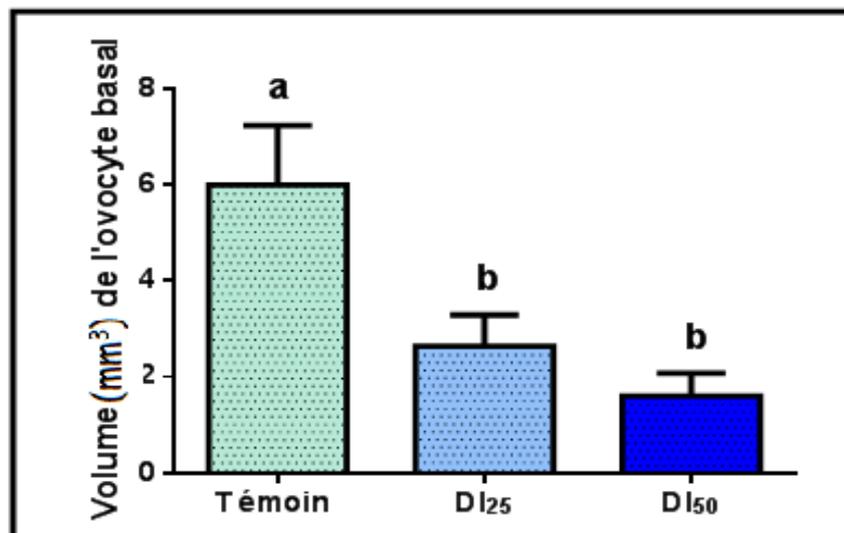


Figure 24. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale chez *Ephesia kuehniella* sur le volume de l'ovocyte basal, mesuré à l'émergence adulte (<8h) ($m \pm sd$; $n = 12$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

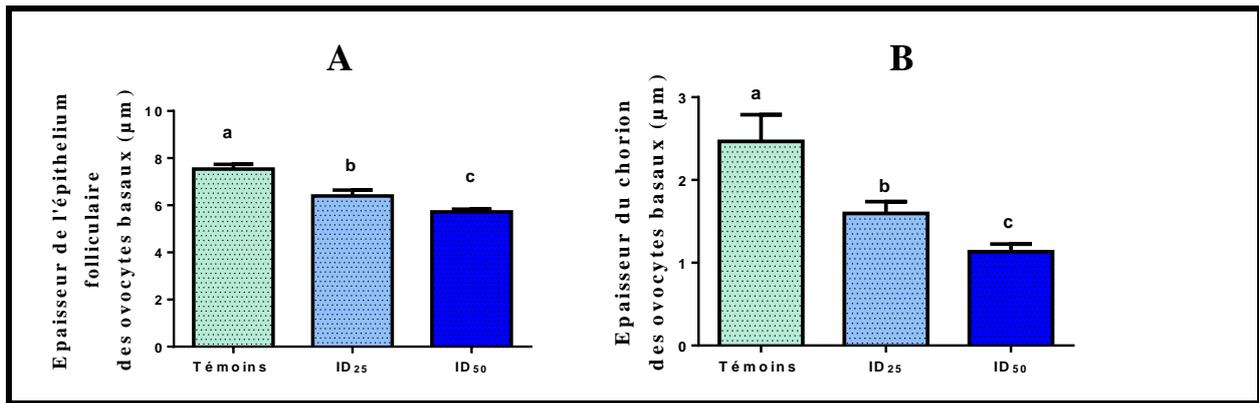


Figure 25. Effet *in vivo* de l'azadirachtine administré par application topique (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) à l'exuviation nymphale d'*Ephestia kuehniella* sur l'épaisseur de l'épithélium folliculaire (A) et sur l'épaisseur du chorion (B) (µm) des ovocytes basaux mesuré à l'émergence adulte (m ± sd ; n= 6). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05

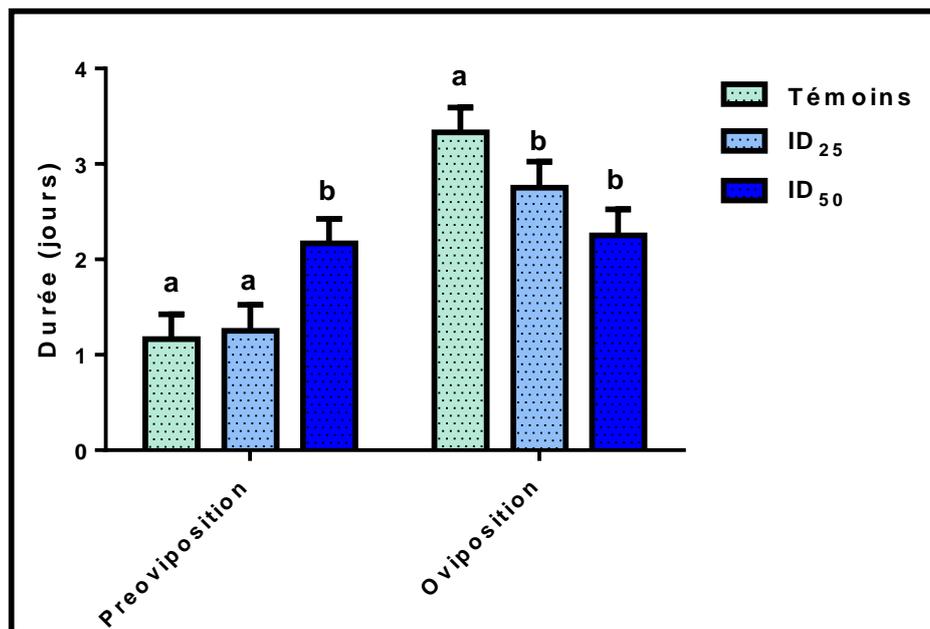


Figure 26. Effet *in vivo* de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI₂₅ : 0,427µg et DI₅₀ : 1,063µg) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d'*Ephestia kuehniella* sur la durée (jours) des périodes de préoviposition et d'oviposition (m ± sd ; n = 12). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p <0,05

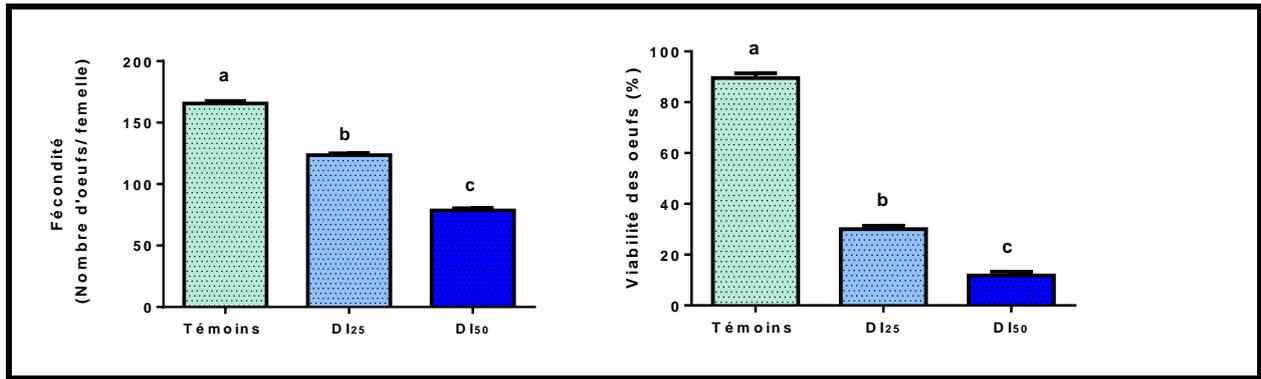


Figure 27. Effet *in vivo* de l'azadirachtine appliquée topiquement (DI₂₅ : 0,427 μ g et DI₅₀ : 1,063 μ g) sur des chrysalides femelles nouvellement exuviées d'*Ephestia kuehniella* sur la fécondité (nombre d'œufs pondus / femelle) et la viabilité des œufs (pourcentage d'éclosion %) ($m \pm sd$; $n = 12$). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

ANNEXE 2 :
PRODUCTION SCIENTIFIQUE

ANNEXE 2 : PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications :

1. **TAFFAR A.**, YEZLI-TOUIKER S., BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2021. Evaluation of azadirachtin, a biopesticides, on growth, development and cuticle secretion of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Journal of Entomological Research*. Vol. 45 (3), SI : 436-443.
2. YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.**, MESKACHE R. & SOLTANI N. 2018. Impact of Captopril on *Ephestia kuehniella*: Ovarian Nucleic Acid Amounts and Protein Analysis. *Tunisian Journal of Plant Protection*. Vol. 13, SI : 77-85.
3. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2021. Phytochemical composition and insecticidal activities of essential oil of *Thymus munbyanus* (Lamiales : Lamiaceae) aerial parts and its proprieties against biomarkers of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae). *Journal of Essential Oil-bearing Plants*. Vol. 24 (4), SI: 792-807.

Communications internationales et nationales :

Communications internationales :

1. **TAFFAR A.**, YEZLI-TOUIKER S. & SOLTANI N. 2018. Effets d'un biopesticide l'azadirachtine sur la biochimie de l'ovaire d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées, *Ephestia kuehniella*. 6^{ème} Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie 119^{èmes} Journées annuelles de la SZF Maison De La Tunisie – Paris 13 – France 21-23 Novembre 2018. (**Communication affichée**).
2. **TAFFAR A.**, YEZLI-TOUIKER S. & SOLTANI N. 2018. Evaluation de l'efficacité d'un biopesticide l'azadirachtine sur le potentiel reproducteur d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées, *Ephestia kuehniella*. 6^{ème} Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie 119^{èmes} Journées annuelles de la SZF Maison De La Tunisie – Paris 13 – France 21-23 Novembre 2018. (**Communication affichée**).
3. **TAFFAR A.**, YEZLI-TOUIKER S. & SOLTANI N. 2019. Effet d'un biopesticide l'azadirachtine sur le taux des vitellogenines d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*. Premier Colloque International sur la Lutte Biologique et Intégrée en Algérie, du 4 au 6 février 2019 à L'Université Mostefa Ben Boulaid (Batna 2). (**Communication affichée**).

ANNEXE 2 : PRODUCTION SCIENTIFIQUE

4. **TAFFAR A., YEZLI-TOUIKER S., BENDJEDID H. & SOLTANI N.** 2019. Effets letaux d'un biopesticide l'azadirachtine sur la fécondité et la morphométrie des œufs d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées, *Ephestia kuehniella*. Séminaire International Environnement et Toxicologie « SINENTOX 2019 », Université Frères Mentouri Constantine 1, Du 18 au 19 février 2019. (**Communication affichée**).
5. **TAFFAR A., YEZLI-TOUIKER S., MESKACHE R. & SOLTANI N.** 2017. Effets d'un biopesticide l'Azadirachtine, sur la morphométrie de l'ovocyte basal d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées, *Ephestia kuehniella*. Premier Symposium Maghrébin sur la Protection Intégrée des Plantes, Sousse (Tunisie) 30-1^{er} Novembre 2017. (**Communication orale**).
6. **YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A., MESKACHE R. & SOLTANI N.** 2017. Impact d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur le profil électrophorétique des protéines ovariennes et le taux des acides nucléiques ovarien d'*Ephestia kuehniella*. Premier Symposium Maghrébin sur la Protection Intégrée des Plantes, Sousse (Tunisie) 30-1^{er} Novembre 2017. (**Communication affichée**).
7. **YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A. & SOLTANI N.** 2018. Effet d'un biopesticide l'azadirachtine sur le développement d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*. 6^{ème} Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie 119^{èmes} Journées annuelles de la SZF Maison De La Tunisie – Paris 13 – France 21-23 Novembre 2018. (**Communication affichée**).
8. **YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A. & SOLTANI N.** 2018. Effet du Captopril sur la morphométrie et la structure semi fine de l'ovocyte basal d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*. 6^{ème} Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie 119^{èmes} Journées annuelles de la SZF Maison De La Tunisie – Paris 13 – France 21-23 Novembre 2018. (**Communication affichée**).
9. **YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A., BENDJEDID H. & SOLTANI N.** 2019. Impact de l'exposition nymphale à un biopesticide l'azadirachtine sur la survie des adultes d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*. Premier Colloque International sur la Lutte Biologique et Intégrée en Algérie, du 4 au 6 février 2019 à L'Université Mostefa Ben Boulaid (Batna 2). (**Communication orale**).
10. **YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A., BENDJEDID H. & Soltani N.** 2019. Toxicity of azadirachtin against Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. 18th International Conference on Organic Agriculture, Food Security and Public Health (OAFPH-19) Sept. 17-19, 2019 Istanbul (Turkey). (**Communication affichée**).

11. YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A., BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2020. Lethal effects of a biopesticide Azadirachtin on development of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller: The 20th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region, Greece October 26-27, 2020. **(Communication affichée).**
12. YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A., BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2020. Evaluation d'un bio-pesticide, l'azadirachtine à l'égard d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* : Effets toxicologiques. International Conference on Biodiversity in service of Biotechnologies Université Mila Février 2020. **(Communication affichée).**
13. YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A., BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2021. Impacts of pupal exposure to azadirachtin on a biomarker of damage vitellogenin and effects on the oviposition a lepidopteron pest of stored products, *Ephestia kuehniella*. International Seminar on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems: (In support of sustainable development) Mohamed Boudiaf University of M'sila Faculty of Sciences, March 28 - 29, 2021. **(Communication affichée).**
14. YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A., BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2021. Impacts d'un insecticide naturel, l'azadirachtine, sur la reproduction d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*: Profil électrophorétique des protéines ovariennes. Pour le Congrès du Groupe Français de recherche sur les Pesticides, Tenue en ligne les 20 et 27 mai 2021. **(Communication affichée).**
15. MESKACH R., YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A. & SOLTANI N. 2017. Effets de deux régulateurs de croissance RH-0345 et RH-2485 sur les testicules d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Premier Symposium Maghrébin sur la Protection Intégrée des Plantes, Sousse (Tunisie) 30-1^{er} Novembre 2017. **(Communication affichée).**
16. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A. & SOLTANI N. 2019. Etude des infestations d'un insecte ravageur des denrées stockées (*Ephestia kuehniella*) sur la qualité de la farine. The international conférence (SINAAN 2019) – progress in natural antioxydants : sources. Mechanisms of actions ans valorisation in health, du 16-17 octobre 2019 université de Béjaia. Algérie. **(Communication affichée).**
17. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., TAFFAR A. & SOLTANI N. 2019. Contrôle de la qualité de la farine par des analyses physico-chimiques suite à une infestation par un insecte ravageur (*Ephestia kuehniella*). The 3rd Mediterranean congress on bio-analysis from 13th to 15th December, 2019 in Mahdia TUNISIA. **(Communication orale).**

18. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2021. Toxicité de l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* à l'égard d'un d'insectes ravageurs des denrées stockés, la pyrale méditerranéenne de la farine *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). SÉMINAIRE INTERNATIONAL SUR LES SCIENCES NATURELLES ET DE LA VIE en ligne (webinaire), organisé par International Journal of Human Settlements le 19 et 20 Février 2021, avec un poster. **(Communication affichée).**

19. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2021. Mesure d'un biomarqueur, la Glutathione-S-Transferases (GSTs) chez un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) traitée par l'huile essentielle de *Thymus munbyanus*. SÉMINAIRE INTERNATIONAL SUR LES SCIENCES NATURELLES ET DE LA VIE en ligne (webinaire), organisé par International Journal of Human Settlements le 19 et 20 Février 2021, avec un poster. **(Communication affichée).**

20. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2021. Consequences of an essential oil treatment of Thyme on the life cycle of an insect pest of stored products Mediterranean flour moth. International Seminar on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems: (In support of sustainable development) 28/29.04.2021. **(Communication affichée).**

21. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2021. Evaluation de la toxicité de l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* chez un Lépidoptère ravageur des denrées stockées, *Ephestia kuehniella* : Réponses des biomarqueurs d'effet et de dommage. le Congrès du Groupe Français de recherche sur les Pesticides, Tenue en ligne les 20 et 27 mai 2021. **(Communication orale).**

Communication nationales :

1. **TAFFAR A.**, YEZLI-TOUIKER S., BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2019. Effets létaux d'un bio-pesticide : l'azadirachtine sur le taux des protéines ovariennes d'un ravageur des denrées stockées : *Ephestia kuehniella* (Lépidoptère : Pyralidae). 1^{er} Séminaire National : L'Apport des Biotechnologies sur la Protection de l'Environnement : Le 15-16 décembre à l'Université Mohamed Boudiaf de M'sila (SNABPE2019). (**Communication affichée**).
2. **TAFFAR A.**, YEZLI-TOUIKER S., BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2019. Effets sublétaux d'un Biopesticide l'azadirachtine sur le potentiel reproducteur d'un ravageur des denrées stockées, *Ephestia kuehniella* (Lépidoptère : Pyralidae). Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale le 30-31 octobre 2019 à l'Université 20 Aout 1955 (SNBBMEE 2019). (**Communication orale**).
3. YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.**, BENDJEDID H. & SOLTANI N. 2019. Toxicity of Azadirachtin against Mediterranean Flour Moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. 18th International Conference on Organic Agriculture, Food Security and Pulic Health (OAFPH-19) ; Istanbul (Turkey). (**Communication affichée**).
4. YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2018. Evaluation de l'edfficacité d'un biopesticide l'azadirachtine sur la reproduction d'un lépidoptère ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*. Séminaire National Biologie Environnement et Santé SNBES 8-9 Octobre 2018. (**Communication Orale**).
5. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2019. Contrôle de la qualité de la farine par des analyses physico-chimiques suite à une infestation par un insecte ravageur (*Ephestia kuehniella*). Séminaire national de biodiversité, biologie médicale et Ecotoxicologie Environnementale Skikda le 30-31 Octobre 2019. (**Communication orale**).
6. BENDJEDID H., YEZLI-TOUIKER S., **TAFFAR A.** & SOLTANI N. 2019. Evaluation de l'activité insecticide d'une huile essentielle du thym contre un ravageur de denrées stockées *Ephestia kuehniella*. 1^{er} séminaire national : L'apport des Biotechnologies sur la Protection de l'Environnement, le15-16 Décembre 2019 a M'sila (**Communication affichée**).

RÉSUMÉS

RÉSUMÉ

L'azadirachtine (Neem Azal) a été utilisé *in vivo* par application topique sur des chrysalides nouvellement exuviées d'*E. kuehniella*. Dans un premier temps, la formulation commerciale a été évaluée sur l'inhibition de l'émergence adulte, la durée du développement nymphale, les types morphologiques induits et l'évolution pondérale des chrysalides. L'azadirachtine a été testé, ensuite, en traitement simple sur le taux des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires), la qualité et la quantité des protéines ovariennes, la morphométrie de l'ovaire, l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux et enfin sur le potentiel reproducteur.

L'azadirachtine entraîne une inhibition de l'émergence adulte avec une relation dose-réponse. Les doses d'inhibition (DI) DI₂₅ et DI₅₀ déterminées, grâce à une régression non linéaire, sont de l'ordre de 0,4277 µg et 1,063 µg respectivement. L'azadirachtine perturbe le développement d'*E. kuehniella* en entraînant une augmentation de la durée du développement nymphale, l'apparition de quatre différents types morphologiques à la mue imaginale et une diminution du poids des chrysalides au cours du temps durant la métamorphose. Le traitement, appliqué le jour de l'exuviation nymphale, entraîne une perturbation du taux des vitéllogénines (dans le corps gras) et des vitellines (dans les ovaires) ; une diminution des taux des protéines ovariennes, et l'étude électro-phorétique révèle une modification aux niveaux des fractions protéiques chez les traités comparativement aux témoins. L'azadirachtine affecte également le poids frais des ovaires, le nombre d'ovocyte par paire d'ovaire, la longueur, la largeur et le volume de l'ovocyte basal. L'étude histologique révèle une diminution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire et l'épaisseur du chorion des ovocytes basaux. Le Neem Azal augmente la période de pré-oviposition et diminue la période d'oviposition, la fécondité ainsi que la viabilité des œufs.

Tous ces résultats pourraient être expliqués par le fait que l'azadirachtine agit comme un régulateur de croissance en perturbant le développement et la reproduction chez *E. kuehniella*, par ses effets antagonistes sur les ecdystéroïdes et l'hormone juvénile.

Mot clés : *Ephestia kuehniella*, Azadirachtine, Toxicité, Reproduction.

ABSTRACT

Azadirachtin (Neem Azal) has been used *in vivo* by topical application to newly exuviated pupae of *E. kuehniella*. First, the commercial formulation was evaluated on the inhibition of adult emergence, the duration of pupal development, the morphological types induced and the weight development of the pupae. Azadirachtin was then tested as a simple treatment on the rate of vitellogenins (in the fatty body) and vitellins (in the ovaries), the quality and quantity of ovarian proteins, the morphometry of the ovary, the thickness of the follicular epithelium and the thickness of the chorion of basal oocyte and finally on the reproductive events.

Azadirachtin inhibits adult emergence with a dose-response relationship. The ID₂₅ and ID₅₀ inhibition doses (ID) determined by nonlinear regression are of the order of 0.4277 µg and 1.063 µg, respectively. Azadirachtin interferes with the development of *E. kuehniella* by causing an increase in the duration of pupal development, the appearance of four different morphological types at imaginal moult and a decrease in the weight of the pupae over time during metamorphosis. The treatment, applied the day of pupal exuviation, disrupts the level of vitellogenins (in the fatty body) and vitellins (in the ovaries); decreased levels of ovarian proteins, and electrophoretic study revealed a change in protein fraction levels in treated compared to controls. Azadirachtin also affects the fresh weight of the ovaries, the number of oocytes per pair of ovaries, the length, width and volume of the basal oocyte. Histological study reveals a decrease in the thickness of the follicular epithelium and the thickness of the chorion of the basal oocytes. Neem Azal increases the pre-oviposition period and decreases the oviposition period, fertility and egg viability.

All of these results could be explained by the fact that azadirachtin acts as a growth regulator by disrupting development and reproduction in *E. kuehniella*, by its antagonistic effects on ecdysteroids and juvenile hormone.

Keywords: *Ephestia kuehniella*, Azadirachtin, Toxicity, Reproduction.

الملخص

تم استخدام Azadirachtin (Neem Azal) في الجسم الحي عن طريق التطبيق الموضعي للشرانق الخارجة حديثاً من *E.*

kuehniella.

أولاً ، تم تقييم المستحضر التجاري بناءً على تثبيط ظهور الحشرات البالغة ، ومدة نمو العذراء ، والأنواع المورفولوجية المُحدثة وتطور الوزن للعذارى ، ثم تم اختبار Azadirachtin كعلاج بسيط على معدل vitéllogénines (في الجسم الدهني) vitelline (في المبايض) ، ونوعية وكمية بروتينات المبيض، وقياس شكل المبيض، وسماكة ظهارة جرابي وسمك من مشيم البويضة القاعدية وأخيراً على الأحداث الإنجابية.

Azadirachtine يمنع ظهور البالغين بعلاقة الاستجابة للجرعة. جرعات تثبيط ID₂₅ و ID₅₀ المحددة بواسطة الانحدار غير الخطي هي من أجل 0.4277 ميكروغرام و 1.063 ميكروغرام على التوالي. يتدخل Azadirachtine مع تطور *E. kuehniella* عن طريق التسبب في زيادة مدة نمو العذراء ، وظهور أربعة أنواع شكلية مختلفة عند الانسلاخ الوهمي وانخفاض وزن الشرانق بمرور الوقت أثناء التحول. العلاج المطبق في يوم نضح العذارى ، يعطل مستوى vitéllogénines (في الجسم الدهني) و vitelline (في المبايض) ؛ انخفضت مستويات بروتينات المبيض ، وأظهرت دراسة الرحلان الكهربائي تغييراً في مستويات البروتينات في المعالجة مقارنةً بالضوابط. يؤثر Azadirachtine أيضاً على الوزن الطازج للمبيضين وعدد البويضات لكل زوج من المبايض وطول وعرض وحجم البويضة القاعدية. كشفت الدراسة النسيجية عن انخفاض في سمك الظهارة الجريبية وسماكة مشيمة البويضات القاعدية. Neem Azal يزيد فترة ما قبل البيض ويقلل من فترة وضع البيض والخصوبة وحيوية البويضة.

يمكن تفسير كل هذه النتائج من خلال حقيقة أن Azadirachtine يعمل كمنظم للنمو من خلال تعطيل النمو والتكاثر في *E.*

kuehniella ، من خلال تأثيره العدائي على l'hormone juvénile و ecdystéroïdes.

الكلمات المفتاحية : Azadirachtin ، *Ephestia kuehniella* ، السمية ، التكاثر.

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Evaluation of azadirachtin, a biopesticides, on growth, development and cuticle secretion of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller

Asma Taffar, Samira Yezli-Touiker*, Hadjira Bendjedid and Nouredine Soltani

Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University
23000-Annaba, Algeria

ABSTRACT

The current study examined the lethal and sublethal effects of azadirachtin on pest of stored food *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Firstly, several doses were tested by topical application on newly molted pupae and the doses of inhibition (ID) of adult emergence were determined then, two doses, 0.42 µg/pupa and 1.06 µg/pupa, corresponding to ID₂₅ and ID₅₀, the doses required for 25 and 50% inhibition of adult emergence, respectively. They were tested on different development parameters and cuticular thicknesses during metamorphosis. Results showed that azadirachtin significantly increased the duration of pupal development and decreased pupal weight. In addition, treatment disrupted metamorphosis and several morphogenetic types have been observed (malformed adults, partial molt and blocked molt). Lastly, azadirachtin also affected cuticular secretion by reducing the thickness of the old and the new cuticle at different ages during metamorphosis.

Key words : Azadirachtin, cuticle secretion, development, *Ephestia kuenniella*, molting disruption.

INTRODUCTION

The pyralid Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller, is a major pest of stored grain products as well as flour and other milled products (Caspari and Gottlieb, 1975; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012), and considered as a significant model to study interactions between pesticides and insects because it has a short life cycle, a high reproductive potential and simple rearing in laboratory conditions (Shahriari *et al.*, 2018). Many storage systems rely on the use of synthetic insecticides and fumigants to control stored-product pests. These synthetic insecticides and fumigants are the most economical and convenient tools for managing these pests (Campos *et al.*, 2016). Despite their satisfying results, the use of chemical fumigants is being restricted in many countries because of the fumigants dangerous side effects such as the conventional pesticides could induce pest resistance (Ahmad *et al.*, 2013). In addition, the residues of pesticides also confer negative consequences on human health and environment (Cox and Sorgan, 2006). Combined, these issues have created an urgent need for sustainable, effective pest control solutions (Moshi and Matoju, 2017; Patil *et al.*, 2017; Reddy and Chowdary, 2021). The botanical pesticides could be considered as

an alternative tool for integrated pest management due to the advantages of rapid degradation in environment and low toxicity to mammals (Ahmad *et al.*, 2015). Currently, the most promising effective botanical insecticide for integrated pest management is azadirachtin and it is the most active insecticide found in the seeds and leaves of neem (Butterworth and Morgan, 1968; Tomé *et al.*, 2013). Through the years, attempts to evaluate the exact molecular mechanism of insecticidal activity of azadirachtin increased (Lin *et al.*, 2016). This insecticide presents a set of characteristics such as no toxicity for humans or environment as well as a wide spectrum of activity (Morgan, 2009). It has a high toxicity against several insect pests such as dictyoptera, diptera and lepidoptera (Mordue *et al.*, 2005; Rehim *et al.*, 2011; Tine *et al.*, 2011; Tomé *et al.*, 2013; Alouani *et al.*, 2018). Azadirachtin acts as an antagonist of juvenile hormone (JH) and ecdysteroids (20-hydroxyecdysone, 20E), two major developmental hormones (Mordue *et al.*, 2005; Chaudhary *et al.*, 2017). The reduction in ecdysone synthesis is caused by the effect of azadirachtin on the neuroendocrine system via an interference with the release of prothoracicotropic hormone (PTTH) from neurosecretory cells (Cortez *et al.*, 2012). This hormone has several missions but the major one is to coordinate molt process and insect's development (Yamanaka *et al.*, 2013).

*Corresponding author's E-mail : yezlitouikersamira@yahoo.fr

This biopesticides acts with an antagonistic action of both juvenile hormones (JH) and molting hormone (ecdysteroids) (Mordue *et al.*, 2010; Oliveira, 2019). *E. kuehniella* has been extensively used as a model species to better understand the mode of action of pesticides (Yezli-Touiker and Soltani-Mazouni, 2011; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). *The objectives of this study were to determine the sublethal and lethal doses of azadirachtin applied topically to newly molted pupae of E. kuehniella as well as their effects on the duration of pupal development, the weight of the pupae and the morphological types induced by treatment. Finally, the effect of azadirachtin was investigated on the cuticular secretion by the thickness of the old and the new cuticles during the pupal development.*

MATERIALS AND METHODS

Insect : *Epehstia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) is a major pest of stored food all over the world. In Algeria, it is particularly abundant in grains stores and wheat flour (Yezli-Touiker *et al.*, 2019). The insect was reared in the laboratory at a temperature of 27°C and a humidity of 80% in almost continuous darkness as previously described (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012). Pupae were staged according to their age in days from pupal ecdysis.

Azadirachtin and topical bioassays : Neem Azal-TS, a commercial formulation of azadirachtin (1% EC; Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany) was used throughout all experiments. The product was dissolved in acetone and topically applied (2 µl per insect) on newly ecdysed pupae (<8 h old) of *E. kuehniella*. Control groups were treated with 2µl of solvent (Acetone). Six doses (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3.5 µg/pupa) were tested (three replicates per dose were done each consisting of 30 insects). The inhibition percentages of adult emergence were corrected in accordance with Abbott (1925). The inhibition doses (ID) ID₂₅ and ID₅₀ (doses causing inhibition of adult emergence in 25 and 50% of the treated insects, respectively) were determined together with their corresponding 95% fiducial limits (95% FL) and the Hill slope.

Determination of pupal development and morphological study : Azadirachtin was tested *in vivo* by topical application on newly molted pupae of *E. kuehniella* (<8 h old) at two doses (ID₂₅: 0.427 µg; ID₅₀: 1.063 µg/pupa) in order to determine its effects on the duration of pupal development and the weight of pupae. The morphological types induced following treatment were done on newly emerged adults (0 day). The percentages of each observed phenotype

were calculated. Each experiment used 60 individuals and was replicated three times. Adult aberrations were classified as follow: malformed adult, partially emerged and total inhibition of adult emergence.

Histology : The thicknesses of the total pupal cuticle (old cuticle) and of the new cuticle (pre-exuvial adult cuticle) were estimated on histological sections of the peripheral integument at different ages during the pupal stage (from 0 to 9 days). Histological methods of Martoja and Martoja (1967) were performed. Azadirachtin was administrated topically at its ID₂₅ and ID₅₀ on newly molted female pupae (<8h old). The abdomens were dissected and fixed in 10% formol. A series of graded ethanol are used for dehydration then the samples were passed through three washes in xylene before being embedded in paraffin wax. Transverse sections (4 µm) obtained using a Leica RM2125T (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) manual rotary microtome, were stained with hematoxylin-eosin. Observations were made using a Leica DM500 microscope equipped with a Leica ICC50 HD camera and the thicknesses were determined using EZ Leica software.

Statistical analysis : Results are given as means ± standard deviation (SD). Levene's tests were used to check the homogeneity of variances. Data were subjected to one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a posthoc Tukey test HSD. All statistical analyses were done using Prism v 6.01 for Windows (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com). Differences were declared significant at p < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Topical bioassay of azadirachtin against pupae : Azadirachtin caused inhibition of adult emergence with dose-response effects (Fig. 1). Indeed, the corrected inhibition values were 38.88 ± 1.92% for the lowest dose (0.5 µg) and 89.88 ± 3.17% for the highest tested dose (3.5 µg). The inhibition recorded in controls was 6 ± 1%. Statistical analysis indicated that the insecticide is toxic with a significant (p < 0.0001) effect of doses. The Tukey HSD test indicates that there was a significant difference between the different tested doses. The inhibition doses (ID µg) of adult emergence with their corresponding 95% fiducial limits (95% FL) were: ID₁₀, 0.17 (0.06-0.48); ID₂₅, 0.42 (0.22-0.79); ID₅₀, 1.06 (0.78-1.43); ID₉₀, 6.56 (3.01-14.28). The non linear regression used shows a Hill slope of 1.20 (0.63-1.77).

This bioinsecticide has been largely used and has different impacts on the biology of insects including

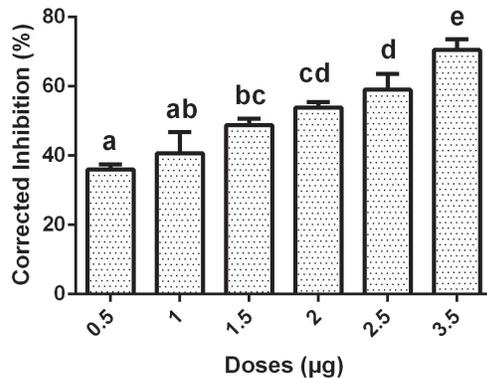


Fig. 1. Effect of azadirachtin (μg) topically applied to newly ecdysed pupae of *E. kuehniella* on the adult exuviation inhibition (%) (mean \pm SD; $n = 3$ replicates containing each 30 pupae; values affected by different letters are significantly different by HSD test at $p < 0.001$).

food stew, growth and development in *Drosophila melanogaster* (Bezzar *et al.*, 2017). Many studies showed that even very low doses of azadirachtin were highly toxic on insects (Barnby *et al.*, 1987; Dere *et al.*, 2015) and had anti-feedant effects or caused developmental anomaly on the various Lepidopteran species (Mordue *et al.*, 2000). It additionally reduces pupation and eclosion rates of various insects like *Plodiainter punctella* (Lynn *et al.*, 2012), *Aedes aegypti* (Koodalingam *et al.*, 2014) and affected larval hatch, larval development, pupal duration and adult longevity in *Tirathaba rufivena* (Boazhu *et al.*, 2017). This negative effects might be explained by the fact that azadirachtin is a growth regulator, or developmental disruptor (like ecdysteroid and juvenile hormone agonists or antagonists) and structurally similar to the insect ecdysone hormones which control the process of metamorphosis (Mordue *et al.*, 2005; Morgan, 2009).

Effect of azadirachtin on development : In the control series, the duration of pupal development is 12.5 ± 0.7 days. This duration increases to 12.75 ± 0.5 days for individuals treated at ID_{25} and to 13.5 ± 0.7 days for individuals treated at ID_{50} . Azadirachtin at the two doses tested (ID_{25} and ID_{50}) increased significantly ($p = 0.02$) the duration of pupal development (Fig. 2).

A delay in adult emergence caused by azadirachtin has been noted in different Lepidopteran species (Jagannadh *et al.*, 1992; Tunca *et al.*, 2012). Topical application of azadirachtin on the last instars of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) interferes with adult emergence time (Aylin *et al.*, 2016). It also prolonged larval development and duration of the pupal stage of *T. rufivena* (Lepidoptera: Pyralidae)

(Boazhu *et al.*, 2017). This could be explained by the strong insect growth-regulating activity of azadirachtin, due to interference with the ecdysteroid metabolism in insects (Mordue *et al.*, 2010).

Several morphological malformations resulted from treatment of newly molted pupae with azadirachtin. There are four different morphogenic types: normal adults (Fig. 3A) malformed adults (Fig. 3B) partial molt (Fig. 3C) and blocked molt (Fig. 3D). The rate of formation of normal adults is estimated at $51.10 \pm 3.85\%$ for the ID_{25} and $39.28 \pm 6.38\%$ for the ID_{50} against $82.88 \pm 3.79\%$ in controls; azadirachtin (ID_{25} and ID_{50}) caused a significant effect ($p < 0.0001$) in normal adults treated compared to controls. In malformed adults, azadirachtin caused a significant effect in pupae treated with ID_{25} ($p = 0.0004$) and ID_{50} ($p < 0.0001$); the rates are $22.22 \pm 3.84\%$ for the ID_{25} , $25.77 \pm 6.56\%$ for the ID_{50} compared to controls with a rate of $7.88 \pm 1.28\%$. For partial molt, azadirachtin had no significant effect ($p = 0.9$) for the ID_{25} , but a significant effect ($p = 0.02$) for the ID_{50} was recorded; the rates are $1.11 \pm 0.89\%$ for the ID_{25} and $8.9 \pm 3.47\%$ for the ID_{50} compared to $00.00 \pm 00\%$ for controls. For blocked molt, azadirachtin caused a significant effect ($p < 0.0001$) for the two doses ID_{25} and ID_{50} compared to the controls, the application of azadirachtin resulted in a rate of $25.55 \pm 1.92\%$ for the ID_{25} and $25.70 \pm 3.89\%$ for the ID_{50} of pupae blocked against the controls $9.22 \pm 4.40\%$. Two-way ANOVA confirmed these results and showed a significant effect of the compound as function of the dose ($F_{2,24} = 0.001$; $p = 0.9$), a significant effect on response ($F_{3,24} = 315.0$; $p < 0.0001$) and a significant

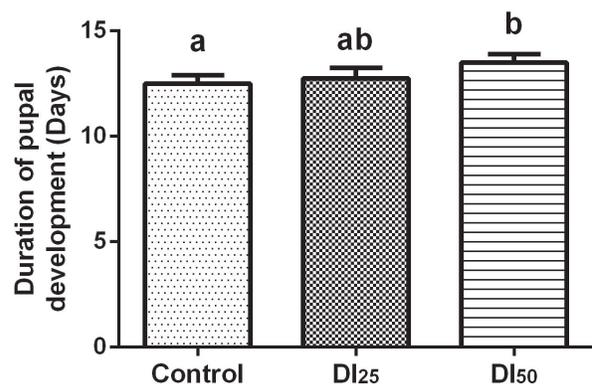


Fig. 2. Effect of azadirachtin (days) topically applied on newly ecdysed pupae of *E. kuehniella* (ID_{25} : $0.427 \mu\text{g}$ and ID_{50} : $1.063 \mu\text{g}$) on the duration of pupal development (days) (mean \pm S.D., $n = 12$). For each parameter values followed by different letters are significantly different at ($p < 0.05$).

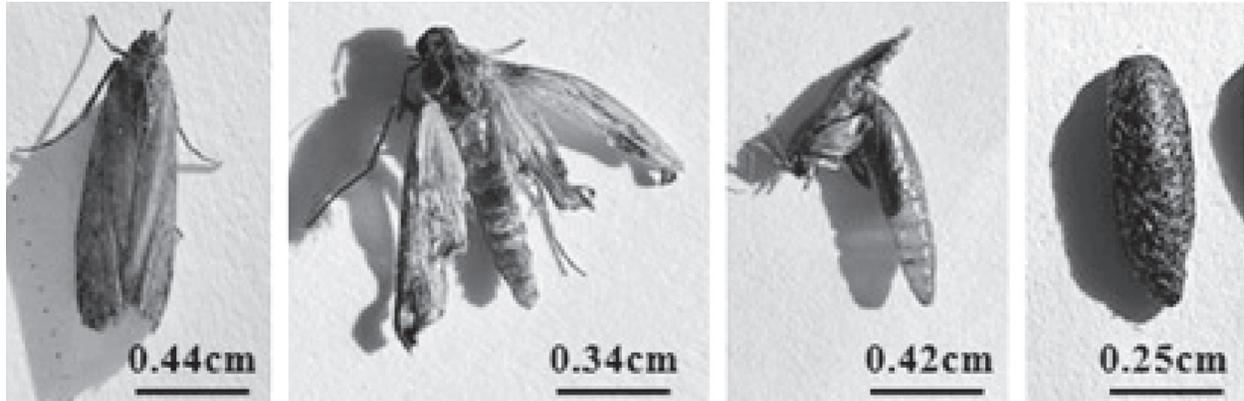


Fig. 3. Photographs showing morphological abnormalities in *E. kuehniella* induced after treatment of pupae with azadirachtin: (A) normal adult, (B) malformed adult, (C) partial molt and (D) blocked molt.

effect between these two parameters ($F_{6,24} = 46.49$; $p < 0.0001$) (Fig. 4).

Morphologic abnormalities were detected when fourth larval instar of *Spodoptera littoralis* treated with azadirachtin including deformity of larvae, pupae and adult, reduction of the protein synthesis of pupae, larvae gut, and cuticular protein level changes of larvae (Jeyasankar *et al.*, 2011; Yooboon *et al.*, 2015; Abd El-Aziz *et al.*, 2017). Similar effects were noted when last-instar larvae of *Pericallia ricini* treated with azadirachtin (Gnanamani *et al.*, 2013). Kraus and Grimminger (1981) reported that azadirachtin caused growth retardation and deformities in *Pieris brassicae* pupae (Lepidoptera: Pieridae). Methoxyfenozide and tebufenozide two non-steroidal ecdysteroid agonists induced precocious, lethal adult exuviations and caused several malformations in adults of *E.*

kuehniella (Bouzerea and Soltani-Mazouni, 2012). In a parental generation of *D. melanogaster*, early exposure to azadirachtin affects adult's development by reducing the number of descendants, delay in larval and pupal development, and induced morphological alterations (Ferdenache *et al.*, 2019). The appearance of these various malformations and the interrupted pupation program can be attributed to the lack of the necessary titer of ecdysteroids, essential to achieve normal larva-pupil transformation (Jagannadh *et al.*, 1992). In addition, the appearance of pupae deformed by the action of azadirachtin may also be due to alterations in ecdysteroid and juvenile hormone titers (Schluter *et al.*, 1985).

The weight of pupae decreases over time during metamorphosis. Indeed, the results show that the pupal weight in control series which is 17.35 ± 0.49 mg at day 0 decreases to reach a minimum of 12.8 ± 0.14 mg on day 9. In treated series, same profile was recorded with reduced values: a weight of 10.8 ± 0.08 mg for the ID_{25} , and 6.04 ± 0.30 mg for the ID_{50} on day 9. The comparison between the control and treated series (ID_{25} and ID_{50}) shows that azadirachtin decreases in a significant way ($p < 0.0001$) the weight of pupae during metamorphosis (1, 3, 5, 7 and 9 days). Two-way ANOVA confirmed these results and showed a significant effect of the compound as function of the dose ($F_{2,90} = 9210$; $p < 0.0001$), time ($F_{5,90} = 4358$; $p < 0.0001$) and between these two parameters ($F_{10,90} = 1507$; $p < 0.0001$) (Fig. 5).

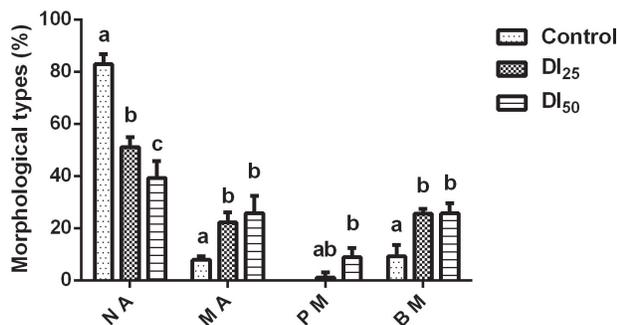


Fig. 4. Effect of azadirachtin topically applied on newly ecdysed pupae of *E. kuehniella* (ID_{25} : $0.427 \mu\text{g}$ and ID_{50} : $1.063 \mu\text{g}$) on the different morphological types during pupal development (%). (mean \pm S.D., $n = 3$ replicates for a total of 60 pupae each).

NA = normal adult, MA = malformed adult, PA = partial molt, BM = blocked molt. For each parameter values followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Similar results were reported by Boulahbel *et al.*, (2015) and Bezzar *et al.* (2016), where azadirachtin decreased the pupal weight of *D. melanogaster*. Rao and Subrahmanyam (1986) reported that azadirachtin caused reduction in body weight of final instar nymphs of *Schistocerca gregaria*. In another

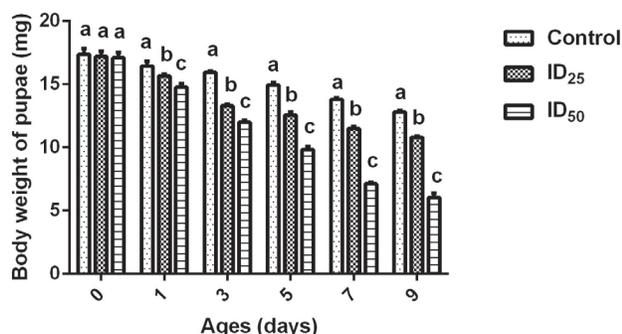


Fig. 5. Effect of azadirachtin (mg) topically applied on newly ecdysed pupae of *E. kuehniella* (ID₂₅: 0.427 µg and ID₅₀: 1.063 µg) on the body weight (mg) of pupae over time (days) during metamorphosis (mean ± S.D., n = 6). For each parameter values followed by different letters are significantly different at (p < 0.05).

experiment, azadirachtin caused a reduction in larval and pupal weight and increased the duration of the larval and pupal period on first and second instar larvae of *Helicoverpa armigera* (Abedi *et al.*, 2014). The decrease in pupal weight in *E. kuehniella* could be explained by the use of energy reserves acquired during the larval stages to detoxify the toxic product (Boggs, 2009).

Effects of azadirachtin on cuticular secretion : The thickness of the pupal cuticle increases significantly with age, reaching a maximum of 13.16 ± 0.78 µm on day 3 coinciding with apolysis for the control series. The same profile was recorded in treated series, with a peak of 14.53 ± 0.24 µm for the ID₂₅ and of 15.66 ± 0.28 µm for the ID₅₀ on day 3, then it decreases significantly thereafter due to the digestion of the deep layers of the old cuticle. Azadirachtin caused a significant increase on day 1 (p = 0.024) in treated with ID₂₅, and a significant increase (p = 0.0098) in treated

with ID₅₀ compared to the control series; no effect was noted on day 3 for the two doses tested. On day 5, a significant increase (p = 0.0190) was recorded only in the treated with ID₅₀; on day 7, a significant increase (p = 0.0004) was noted in treated with ID₅₀, and no effect (p = 0.0810) was noted in treated with ID₂₅ and a significant increase (p = 0.0292) was recorded on day 9 only in those treated with ID₅₀. Two-way ANOVA confirmed these results and showed a significant effect of the compound as function of the treatment (F_{1,458,2,916} = 86.04; p < 0.0027), time (F_{1,081,2,162} = 666.4; p < 0.0010) and a non-significant treatment-time interaction (F_{1,208,2,415} = 1.700; p = 0.3159) (Figs. 6A-7).

The new cuticle or adult pre-exuvial cuticle is secreted immediately after apolysis (day 3), the thickness of the new cuticle gradually increases to reach a maximum of 7.53 ± 0.07 µm on day 9 for control series. The same profile was recorded in the treated with an increase of 8.28 ± 0.04 µm for the ID₂₅, and of 8.74 ± 0.10 µm for the ID₅₀ on day 9 of pupal life (day before adult exuviation). Azadirachtin significantly increased (p = 0.04) the thickness of the new cuticle on day 5 only in those treated with ID₅₀. A significant increase (p = 0.0298) was recorded on day 7 for the ID₂₅ and a significant increase (p = 0.0057) for the ID₅₀. On day 9 a significant increase (p = 0.0001) was noted for ID₂₅ and a significant increase (p = 0.0120) for the ID₅₀ compared to controls. Two-way ANOVA confirmed these results and showed a significant effect of the compound as function of the treatment (F_{1,460,2,920} = 412.6; p < 0.0003), time (F_{1,048,2,096} = 5466; p < 0.0001) and a significant treatment-time interaction (F_{1,794,3,589} = 10.23; p = 0.0337) (Figs. 6B-7).

Molting is defined as the procedure which includes changes in hormones and behavior as well as changes in the epidermis and cuticle (Gullan and Cranston, 2005). This phenomenon takes place in two stages:

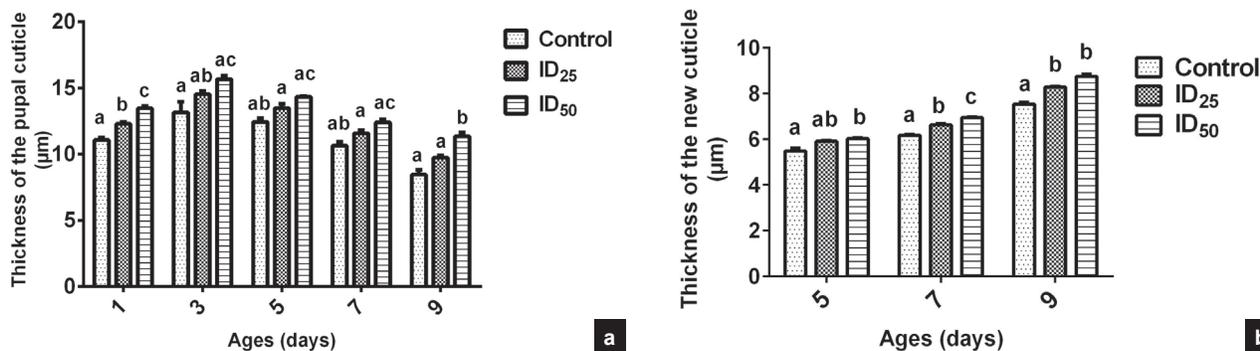


Fig. 6. Effect of azadirachtin (µg) topically applied on newly ecdysed pupae of *E. kuehniella* (ID₂₅: 0.427 µg and ID₅₀: 1.063 µg) on the cuticular thicknesses over time (days) during metamorphosis of old (A) and new cuticle (B). (mean ± S.D., n = 6). For each parameter values followed by different letters are significantly different at (p < 0.05).

The first stage where the epidermis separates from the cuticle of the previous stage (apolysis), and the second where the insect gets rid of the old cuticle (ecdysis) (Riddiford, 1985). Juvenile hormone (JH) and ecdysteroids (20-hydroxyecdysone, 20E) have an essential role in the programming of molting, the determinism of growth and development of insects (Dhadialla *et al.*, 2005). Indeed, the 20E initiates the molting process, while the JH determines the nature of the phenotype (Truman and Riddiford, 2007). A quantitative analysis of ecdysteroids during the pupal stage in whole body pupae of *E. kuehniella* reveals that hormonal levels increase significantly from day 3 of pupal life to reach a peak on day 5. This peak is responsible for imaginal development since it coincides with the synthesis of the adult pre-exuvial cuticle which begins on day 4 and continues until the day before adult exuviation (Yezli-Touiker and Soltani-Mazouni, 2011).

Administration of azadirachtin at two tested doses (ID_{25} and ID_{50}) significantly increases the thickness of the pupal cuticle and new cuticle at different ages during metamorphosis. In larvae of *G. mellonella* L. fed a diet containing azadirachtin, cuticle secretion was reduced by 21-24% compared with the control group (Ünsal and Emine Güner, 2016). The same results were found after treatment of *E. kuehniella* with two molting hormone mimetics: RH-5849 and tebufenozide (Tazir *et al.*, 2016) or in *D. melanogaster* after treatment of pupae with pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue (Bensebaa *et al.*, 2015). Our results can be explained by the fact that azadirachtin has a structure similar to insect ecdysones; it inhibits prothoracicotrophic hormone (Mordue and Blackwell, 1993) and allatotrophic hormone (Banken and Stark, 1997), stimulating ecdysteroids and JH, respectively; azadirachtin therefore acts as a growth regulator by interfering with its antagonistic

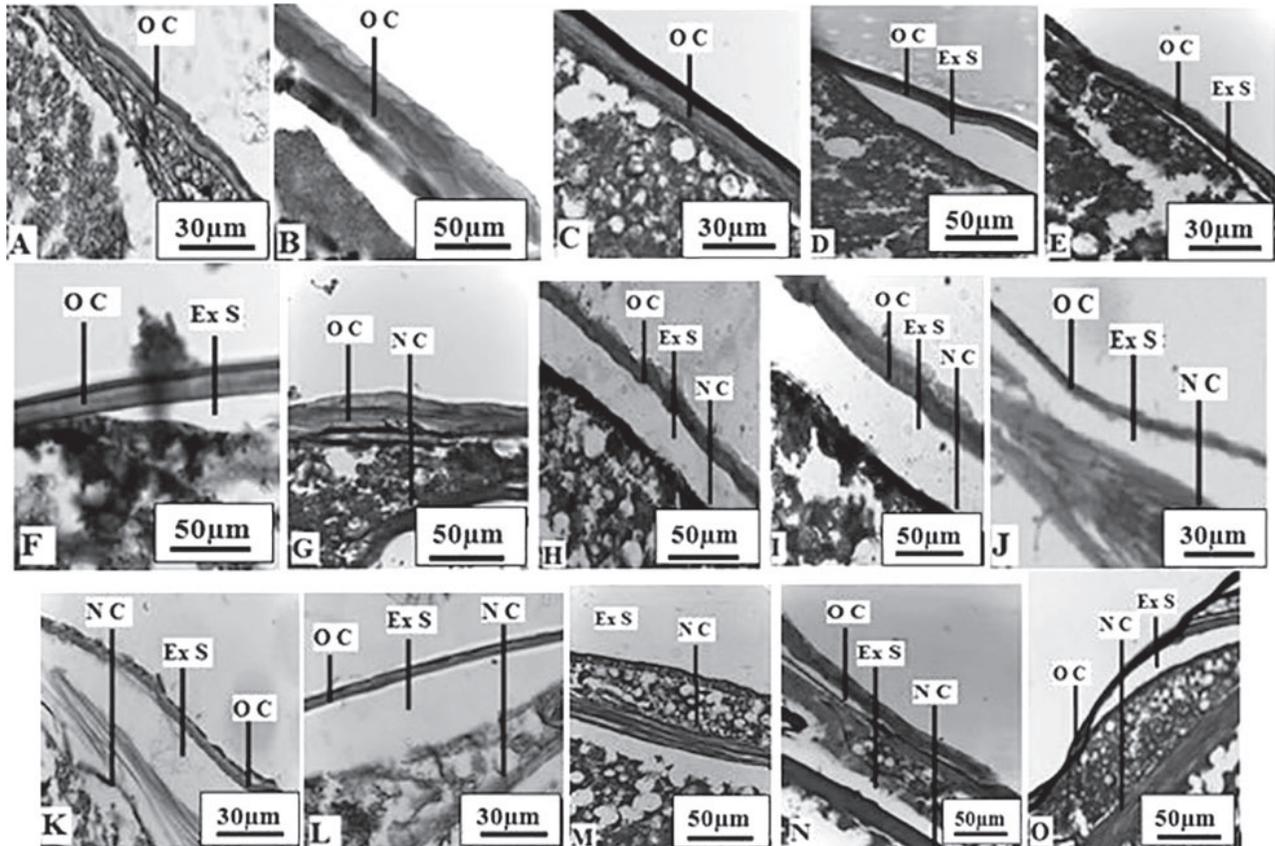


Fig. 7. Histological sections showing the *in vivo* effect of azadirachtin (ID_{25} : 0.427 µg and ID_{50} : 1.063 µg) on the thickness of the total pupal cuticle and the thickness of the new cuticle (adult) in *E. kuehniella* at different ages during the metamorphosis: (A) Control day 1, (B) Treated with ID_{25} day 1, (C) Treated with ID_{50} day 1, (D) Control day 3, (E) Treated with ID_{25} day 3, (F) Treated with ID_{50} day 3, (G) Control day 5, (H) Treated with ID_{25} day 5, (I) Treated with ID_{50} day 5, (J) Control day 7, (K) Treated with ID_{25} day 7, (L) Treated with ID_{50} day 7, (M) Control day 9, (N) Treated with ID_{25} day 9, (O) Treated with ID_{50} day 9.

OC = Old cuticle, Ex S = Exuvial Space, NC = New cuticle.

effects on the above hormones, physiological processes such as development and reproduction (Morgan, 2009; Mordue *et al.*, 2010).

Our findings indicate that azadirachtin negatively affects the hormones of metamorphosis causing perturbations in *E. kuehniella* development. Further research on the effect of azadirachtin on other development parameters over several generations can be evaluated to give further additional information.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the National Fund for Scientific Research of Algeria to Pr. N. Soltani and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (PRFU project D01N01UN230120180011to Dr. A. Hamdani). Thanks are given to Pr. S. Kilani-Morakchi (Badji Mokhtar University, Algeria) for providing us with the azadirachtin.

REFERENCES

- Abbott, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **18**: 265-67.
- Abd El-Aziz, N.M., Khamis, I.M. and Aly, A.A. 2017. Insecticidal activity of *Azadirachta indica* (Sapindales, Meliaceae) extracts against *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Curr. Sci. In.*, **6**: 891-99.
- Abedi, Z., Saber, M., Vojoudi, S., Mahdavi, V. and Parsaeyan, E. 2014. Acute, sublethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Sci.*, **14**: 30.
- Ahmad, S., Ansari, M.S. and Moraiet, M.A. 2013. Demographic changes in *Helicoverpa armigera* after exposure to neem azal (1% EC azadirachtin). *Crop Prot.*, **50**: 30-36.
- Ahmad, S., Ansari, M.S. and Muslim, M. 2015. Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Corp Prot.*, **68**: 72-78.
- Alouani, A., Rehim, N. and Soltani, N. 2018. Ovicidal activity of Azadirachtin and *Bacillus thuringiensis israelensis* against eggs of mosquito *Culex pipiens*. *Mint. J. Pharma. Med. Sci.*, **7**: 8-12.
- Aylin, E., Deniz, T. and Olga, Sak. 2016. Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Biol. Sci.*, **69**: 335-44.
- Banken, J.A.O. and Stark, J.D. 1997. Stage and age influence on the susceptibility of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) after direct exposure to Neemex, a neem insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **90**: 1102-05.
- Baozhu, Z., Chaojun L. and Weiquan Q. 2017. Effectiveness of the botanical insecticide azadirachtin against *Tirathaba rufivena* (Lepidoptera: Pyralidae). *Fla. Entomol.*, **100**: 215-18.
- Barnby, M.A., Klocke, J.A. 1987. Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Noctuidae). *J. Insect. Physiol.*, **133**: 69.
- Bensebaa, F., Kilani-Morakchi, S., Aribi, 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.*, **112**: 625-31.
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S. and Aribi, N. 2016. Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **133**: 85-90.
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S., Ferdenache, M., Aribi, N. 2017. Azadirachtin induced larval avoidance and antifeeding by disruption of food intake and digestive enzymes in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **143**: 135-40.
- Boggs, C.L. 2009. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct. Ecol.*, **23**: 27-37.
- Boulaibel, B., Aribi, N., Kilani-Morakchi, S. and Soltani, N. 2015. Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone. *Afr. Entomol.*, **23**: 224-33.
- Bouzeraa, H. and Soltani-Mazouni, N. 2012. Effets du méthoxyfenozone et du tébufénozone sur le développement et quelques paramètres de la reproduction d'*Ephestia kuehniella* après traitement des mâles et des femelles. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **137**: 153-63.
- Butterworth, J.H. and Morgan, E.D. 1968. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J. Chem. Soc.*, **1**: 23-24.
- Campos, D., Gravato, C., Quintaneiro, C., Koba, O., Randak, T., Amadeu, M.V.M. and João, L.T. 2016. *Chemosphere.*, **149**: 177-82.
- Caspari, E.W. and Gottlieb, F.J. 1975. The Mediterranean meal moth *Ephestia kuehniella*. In: *Handbook of Genetics*, Vol. 3. R.C. King (ed.). Plenum Press, New York, pp. 125-147.
- Chaudhary, S., Kanwar, R.K., Sehgal, A., Cahill, D.M., Barrow, C.J., Sehgal, R. and Kanwar, J.R. 2017. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Front. Plant. Sci.*, **8**: 610.
- Cortez, M.R., Provençano, A., Silva, C.E., Mello, C.B., Zimmermann, L.T. and Schaub, G.A. 2012. Effects of azadirachtin and ecdysone on the dynamic development in *Rhodnius prolixus* larvae. *Exp. Parasitol.*, **131**: 363-71.
- Cox, C. and Surgan, M. 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health. Persp.*, **114**: 1803-806.
- Dere, B., Altuntaş, H. and Nurullahoğlu, Z.U. 2015. Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **89**: 138-52.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A. and Smagghe, G. 2005. Insect growth and development-disturbing insecticides. In: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 6. Elsevier-Pergamon, Oxford, UK, p. 55-115.
- Ferdenache, M., Bezzar-Bendjazia, R., Marion-Poll, F. and Kilani-Morakchi, S. 2019. Transgenerational effects from single larval exposure to azadirachtin on life history and behavior traits of *Drosophila melanogaster*. *Sci. Rep.*, **9**: 17015
- Gnanamani, R. and Dhanasekaran, S. 2013. Growth inhibitory effects of Azadirachtin against *Pericallia ricini* (Lepidoptera: Arctiidae). *World J. Zool.*, **8**: 185-91.

- Gullan, P.J. and Cranston, P.S. 2005. Insects: An Outline of Entomology. 3rd Edition, Blackwell Publishing Ltd., Hoboken, University of California, Davis, USA. 505 p.
- Jagannadh, V., Nair, V.S.K. 1992. Azadirachtin-induced effects on larval-pupal transformation of *Spodoptera mauritra*. *Physiol. Entomol.*, **17**: 56-61.
- Jeyasankar, A., Raja, N. and Ignacimuthu, S. 2011. Insecticidal compound isolated from *Syzygium lineare* Wall. (Myrtaceae) against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Saudi. J. Biol. Sci.*, **18**: 329-32.
- Koodalingam, A., Deepalakshmi, R., Ammu, M. and Rajalakshmi, A. 2014. Effects of neem azal on marker enzymes and hemocyte phagocytic activity of larvae and pupae of the vector mosquito *Aedes aegypti*. *J. Asia Pacific Entomol.*, **17**: 175-81.
- Kraus, W. and Grimminger, W. 1981. Toonafolin, ein neues Tetrarortriterpenoid-B-lacton aus *Toona ciliata* MJ Roem. var. *australis* (Meliaceae). *Liebigs. Ann. Chem.*, pp. 1838-1843.
- Lin, T., Liu, Q. and Chen, J. 2016. Identification of differentially expressed genes in *Monochamus alternatus* digested with azadirachtin. *Sci. Rep.*, **6**: 33484.
- Lynn, O.M., Kim, J.E. and Lee, K.Y. 2012. Effects of azadirachtin on the development and gene expression of fifth instar larvae of Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *J. Asia Pacific Entomol.*, **15**: 101-105.
- Martoja, R. and Martoja, M. 1967. Initiation aux Techniques de l'histologie animale. Masson et Cie (ed.). Paris. 345 p.
- Mordue, L.A.J. and Blackwell, A. 1993. Azadirachtin: an update. *J. Insect. Physiol.*, **39**: 903-24.
- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D. and Nisbet, A.J. 2005. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S. (ed.). Elsevier, Oxford, UK, pp. 117-135.
- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D. and Nisbet, A.J. 2010. Addendum: Azadirachtin, a natural product in insect control: An update. In: Gilbert, L.I. and Gill, S.S. (ed.). Elsevier, Oxford, UK, pp. 204-206.
- Mordue, L.A.J. and Nisbet, A.J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Bras.*, **29**: 615-32.
- Morgan, E.D. 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**: 4096-105.
- Moshi, A.P. and Matoju, I. 2017. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. *Rev. Crop. Prot.*, **92**: 16-28.
- Oliveira, J.A., Cótica, L.F., Conte, H., Pamphile, J.A. 2019. Síntese biológica de nanopartículas mediada por microorganismos endofíticos. *Científico.*, **8**: 146-55.
- Patil, S.B., Goyal, A., Chitgupekar, S.S., Kumar, S. and El-Bouhssini, M. 2017. Sustainable management of chickpea pod borer. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, **37**: 20.
- Rao, P.J. and Subrahmanyam, B. 1986. Azadirachtin induced changes in development, food utilization and haemolymph constituents of *Schistocerca gregaria* Forskel. *J. Appl. Ent.*, **102**: 217-24.
- Reddy, D.S. and Chowdary, N.M. 2021. Botanical biopesticide combination concept: a viable option for pest management in organic farming. *Egypt. J. Biol. Pest Contr.*, **31**: 23.
- Rehimi, N., Alouani, A. and Soltani, N. 2011. Efficacy of Azadirachtin against Mosquito Larvae *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) under Laboratory Conditions. *Eur. J. Sci. Res.*, **57**: 223-29.
- Riddiford, L.M. 1985. Hormone action at cellular level. In: G.A. Kerkut and L. Gilbert (ed.) *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 8. Pergamon, Oxford, pp. 37-84.
- Schlüter, U. 1985. Occurrence of weight gain reduction and inhibition of metamorphosis and storage protein formation in last instars of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis*, after injection of azadirachtin. *Entomol. Exp. Appl.*, **39**: 191-95.
- Shahriari, M., Sahbzadeh, N., Zibae, A., Khani, A. and Senthil-Nathan, S. 2017. Metabolic response of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) to essential oil of Ajwain and thymol. *Toxin. Rev.*, **36**: 204-209.
- Soltani-Mazouni, N., Hami, M. and Gramdi, H. 2012. Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Invertebr. Reprod. Dev.*, **56**: 350-56.
- Tazir, A., Kirane-Amrani, L. and Soltani, N. 2016. Impact of two bisacylhydrazines on development of *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) with respect to cuticular thickness and protein. *J. Entomol. Zool. Stud.*, **4**: 626-31.
- Tine, S., Aribi, N. and Soltani, N. 2011. Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera: Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**: 19816-24.
- Tomé, H.V.V., Martins, J.C., Corrêa, A.S., Galdino, T.V.S., Picançon, M.C. and Guedes, R.N.C. 2013. Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Prot.*, **46**: 63-69.
- Truman, J.W., Riddiford, L.M. 2007. The morphostatic actions of juvenile hormone. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **37**: 761-70.
- Tunca, H., Kilincer, N., Ozkan, C. 2012. Side-effects of some botanical insecticides and extracts on the parasitoid, *Venturia canescens* (Grav.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Turk Entomol. Derg.*, **36**: 205-14.
- Ünsal, S. and Güner, E. 2016. The Effects of Biopesticide Azadirachtin on the Fifth Instar *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larval Integument. *Inter. J. Crop Sci. Tech.*, **2**: 60-68.
- Yamanaka, N., Rewitz, K.F. and O'Connor, M.B. 2013. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Ann. Rev. Ent.*, **58**: 497-516.
- Yezli-Touiker, S., Kirane-Amrani, L., Meskache, R. and Soltani, N. 2019. Effect of captopril on growth development and cuticular secretion in pupae of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Fresenius Environ. Bull.*, **28**: 526-531.
- Yezli-Touiker, S., Soltani-Mazouni, N. 2011. Profil des ecdystéroïdes durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Synthèse.*, **22**: 49-55.
- Yooboon, T., Pluemanupat, W., Koul, O. and Bulangpoti, V. 2015. Effects of azadirachtin on cuticular proteins of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) vis-à-vis the modes of application. *Comm. Agric. Appl. Biol. Sci.*, **80**: 169-77.

(Received : February 14, 2021; Accepted : August 18, 2021)