

**EFFETS DU PYRIPROXYFENE SUR
CERTAINS ASPECTS
PHYSIOLOGIQUES DU
DEVELOPPEMENT DE *TENEBRIO
MOLITOR*
(COLEOPTERA:TENEBRIONIDAE)**

**ARIBI
Nadia*
LAKBAR
Chanez***

RESUME

Le pyriproxifène, analogue de l'hormone juvénile (JH), a été testé sur le développement d'un insecte Coléoptère Tenebrio molitor. Le régulateur de croissance a été utilisé par application topique (0.01, 0.10 et 0.20 µg/ insecte) le jour de l'exuviation nymphale ou additionné dans le milieu de culture (1 et 10 µM) d'explants tégumentaires de nymphes nouvellement exuviées. Les effets in vivo du pyriproxifène ont été évalués, au cours de la métamorphose, sur la production des ecdystéroïdes hémolymphatiques et sur le profil des protéines de l'hémolymphe. Les résultats obtenus montrent que le pyriproxifène entraîne d'une part, une inhibition des taux hormonaux avec un effet dose dépendant et d'autre part, une augmentation des concentrations des protéines dans l'hémolymphe; cependant, l'analogue de l'hormone juvénile ne présente aucun effet sur le pattern électrophorétique. Les effets du pyriproxifène ont été également évalués in vitro sur la production d'ecdystéroïdes, libérés dans le milieu de culture par l'épiderme, et sur la sécrétion cuticulaire. Les données obtenues révèlent que le pyriproxifène inhibe la production hormonale et la sécrétion de la nouvelle cuticule.

ABSTRACT.

Pyriproxifen, growth regulatory, that mimics the action of juvenile hormone (JH) has been evaluated on development of Tenebrio molitor. The compound was applied topically (0.01, 0.10 and 0.20 µg/insect) at day pupal ecdysis or added to the culture medium (1 and 10 µM) of sternal integuments explanted from newly ecdysed pupae. The compound was first evaluated on ecdysteroid hemolymphatic production and also on concentration and profile of protein in hemolymph. Data obtained showed that the pyriproxifen decreases ecdysteroid titers with a dose effect and induces an increase in the proteins concentrations in

hemolymph; however, the pyriproxyfen presents no effects on electrophoretic pattern. The compound added to the culture medium was then tested on the production of ecdysteroid by integumental explants and the thickness of cuticle secreted in vitro. The amount of ecdysteroid released into the culture medium by integumental explants and adult cuticle synthesis were significantly inhibited by pyriproxyfen.

Mots-clés: mues, métamorphose, développement, tégument, ecdystéroïdes, hormone juvénile, métabolites hémolymphatiques, régulateur de croissance.

INTRODUCTION

La croissance et le développement chez les insectes sont régulés par deux principales hormones, la 20-hydroxyecdysone (20E), un stéroïde polyhydroxylé et l'hormone juvénile (JH), un sesquiterpène; au stade adulte, ces deux hormones sont aussi impliquées dans la régulation de la reproduction. (Koolman, 1990; Rees 1995; Gäde *et al.*, 1997). Chez les insectes holométaboles, l'initiation de la mue larve-nymphé (commitment) est induite par la 20E en absence de JH (Riddiford, 1996); par conséquent, la persistance de la JH à cette période du développement, entraîne des larves surnuméraires et, selon les doses utilisées et le moment d'application, des larves permanentes, des larves-nymphes ou encore des intermédiaires larves-adultes, incapables de donner l'adulte normal (Gadenne *et al.*, 1990; Hicks et Gordon, 1992; Dhadialla *et al.*, 1998; Aribi *et al.*, 1999). Les ecdystéroïdes peuvent représenter des sites cibles spécifiques potentiels pour lutter contre les différents organismes visés (pest control) ainsi, les premiers mimétiques des ecdystéroïdes à structure non stéroïdale, les bisacylhydrazines, développés par l'industrie pharmaceutique sont capables d'induire des mues précoces et incomplètes dans plusieurs ordres d'insectes (Dinan, 1989; Dhadialla *et al.*, 1998). Tout comme les bisacylhydrazines et après les travaux de Williams (1967), il a été suggéré que les composés qui miment l'action de la JH peuvent également être utilisés comme insecticides; plusieurs analogues de la JH (JHAs) ont été découverts et certains ont pu être commercialisés (Retnakaran *et al.*, 1985; Dhadialla *et al.*, 1998). Les premiers mimétiques de la JH ont pour la plupart, une structure terpénoïde comme le méthoprène ou l'hydropène (Staal, 1982) mais sans la fonction epoxide présente dans la JH (Retnakaran *et al.*, 1985). Ces dernières années, plusieurs composés très actifs mais de structure différente de la JH ont été synthétisés: le fenoxycarbe (Dorn *et al.*, 1981), le pyriproxifène (Hatakoshi *et al.*, 1986) et le diofenolan (Sechser *et al.*, 1994). Certains effets du fenoxycarbe et du pyriproxifène ont déjà fait l'objet de travaux (Grenier et Grenier, 1993; Miyamoto *et al.*, 1993). et, ce présent travail a pour but d'étudier, au cours de la métamorphose de *Tenebrio molitor*,

l'action *in vivo* du pyriproxifène sur les ecdystéroïdes et les protéines hémolymphatiques d'une part, et l'action *in vitro*, sur la sécrétion de la nouvelle cuticule et sur les ecdystéroïdes produits par l'épiderme d'autre part.

MATERIEL ET METHODES

Insectes: Les nymphes de *T. molitor* sont sexées puis séparées. Les adultes mâles et femelles sont collectés 0-4 heures après émergence puis sont déposés dans des boîtes (20 mâles et 20 femelles). L'élevage se fait dans une étuve à 27°C et à 80% r.h.

Traitements: Le Pyriproxifène a été gracieusement fourni par le Pr. Ishaaya (Département d'Entomologie, Agricultural Research Organisation, Israël). et les traitements ont été réalisés *in vivo* et *in vitro*. Dans le cas du traitement *in vivo*, le composé a été dissous dans l'acétone et utilisé par application topique (1 µl par nymphe) à trois doses (0.01, 0.10 et 0.20 µg) le jour de l'exuviation nymphale. Les séries témoins reçoivent 1 µl de solvant. Pour le traitement *in vitro*, le composé a été dissous dans de l'éthanol (1 et 10 µM) et additionné dans le milieu de culture (5 µl par puits). d'explants tégumentaires nymphaux. Dans les puits témoins de l'éthanol est ajouté (5 µl par puits).

Extraction des ecdystéroïdes: Les échantillons hémolymphatiques (3 µl par nymphe) sont collectés par des microcapillaires préalablement calibrés et dilués dans du méthanol (300 µl). Pour le dosage *in vivo* des ecdystéroïdes, les échantillons hémolymphatiques sont prélevés tous les jours au cours du stade nymphal (0 à 7 jours). Dans le cas des expérimentations *in vitro* un aliquot (50 µl) de chaque puits de culture est prélevé à différents temps de l'incubation (2, 4 et 6 jours) puis dilués dans du méthanol (300 µl). Après sonication et centrifugation (5000 g pendant 10 min), le surnageant est évaporé et les extraits secs sont repris dans du tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) puis stockés à -20°C jusqu'au dosage.

Culture *in vitro*. Les explants tégumentaires nymphaux sont mis en culture selon la méthode décrite par Soltani *et al.* (1996). Pour mesurer l'épaisseur de la cuticule sécrétée, 6 sternites abdominaux, prélevés le jour de l'exuviation nymphale, sont déposés dans un milieu de culture additionné de Pyriproxifène (1 et 10 µM) et de 20-hydroxyecdysone pour initier le cycle cuticulaire (10 µM); le temps d'incubation est de 6 jours. Pour le dosage des ecdystéroïdes produits par l'épiderme, quatre sternites abdominaux de nymphes nouvellement exuviées sont explantés et incubés sur une durée de 6 jours dans un milieu additionné de Pyriproxifène (1 et 10 µM) sans addition d'hormone exogène. Tous les explants sont débarassés des corps gras et autres tissus exogènes, rincés trois fois avec une solution saline puis incubés à 27°C dans 0,5 ml de milieu de Landureau (Landureau et Grellet, 1972) légèrement modifié (Quennedey *et al.*, 1983).

Mesure de l'épaisseur de la cuticule: Les explants tégumentaires nymphaux (trois sternites par répétition) sont retirés des milieux de culture à différents temps d'incubation (2, 4 et 6 jours), fixés selon Friend et Farqhar (1967), déshydratés puis inclus dans un mélange Epon-araldite (Andersen et Ellis, 1965). Des coupes semi-fines sont réalisées grâce à un ultramicrotome V (LKB) et colorées au bleu de toluidine. L'épaisseur de la cuticule préexuviale adulte secrétée *in vitro* est mesurée grâce à un micromètre oculaire et un microscope photonique.

Dosage des ecdystéroïdes: Tous les échantillons biologiques sont dosés en duplicata par une méthode immunoenzymatique (EIA) décrite par Porcheron *et al.* (1989) et De Reggi *et al.* (1992) qui utilise la peroxydase comme traceur enzymatique et la tétraméthyl benzidine comme réactif. Un anticorps monoclonal de rat (EC 19) présentant une forte affinité pour la 20-hydroxyecdysone (20E) a été utilisé pour le dosage des ecdystéroïdes hémolymphatiques; cependant, un anticorps polyclonal de Lapin (B) montrant une forte affinité pour l'ecdysone est utilisé pour l'analyse des ecdystéroïdes produits *in vitro*.

Dosage des protéines. Les échantillons hémolymphatiques (3 μ l par nymphe) sont collectés par des microcapillaires préalablement calibrés puis dilués dans du méthanol (300 μ l). Le dosage des protéines dans l'hémolymphe a été effectué selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise comme réactif le bleu brillant de Commassie et l'albumine de serum de Boeuf (BSA) comme standard.

Extraction des protéines de l'hémolymphe et électrophorèse: Les échantillons hémolymphatiques (pool de 14-50 μ l) sont prélevés chez des nymphes, âgées de 6 jours, témoins et traitées au pyriproxifène le jour de l'exuviation nymphale. Les échantillons sont dilués dans du phenyl methyl sulfonyl fluoride ou PMSF (45 mg/ml ethanol) à 0.1%. Les échantillons poolés puis lyophilisés sont repris dans un tampon (lysis buffer). L'électrophorèse est réalisée selon Laemmli (1970) sur gel de polyacrylamide PAGE à 30% additionné de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 10%.

RESULTATS

Effets *in vivo* du pyriproxifène sur les taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques

L'analyse des ecdystéroïdes hémolymphatiques, effectuée par EIA chez les nymphes de *T. molitor*, âgées de 0 à 7 jours, témoins et traitées au pyriproxifène (0.10 et 0.20 μ g), montre pour les différentes séries un pic qui se produit à 3 jours (figure 1); cependant, les valeurs maximales présentent une diminution significative chez les séries traitées comparativement aux témoins ($p < 0.002$). Les taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques chez les nymphes traitées au pyriproxifène (0.10 et

0.20 μg) montrent une réduction ($p < 0.05$) entre les jours 2 et 5 du stade nymphal comparés aux témoins. De même, les concentrations hormonales présentent une diminution significative à 3 et 4 jours du stade nymphal à la dose la plus forte de pyriproxifène ($p < 0.0006$). Le pyriproxifène inhibe donc, avec un effet dose, les taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques.

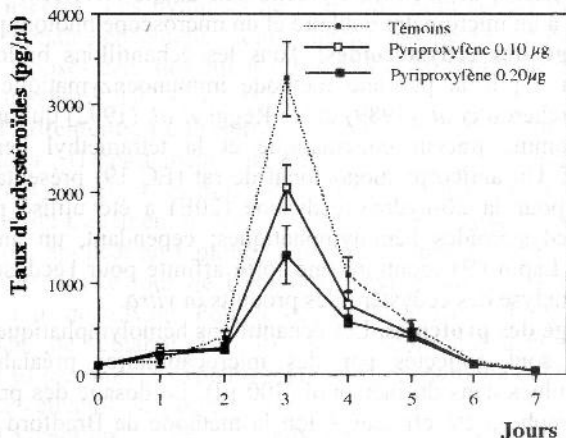


Figure 1: Effets *in vivo* du pyriproxifène (0.10-0.20 μg) sur les taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques (exprimés en picogrammes de 20-hydroxyecdysone équivalents par microlitre d'hémolymphe) au cours du stade nymphal de *T. molitor* (0 à 7 jours) après traitement par application topique le jour de l'exuviation nymphale ($m \pm s$; $n = 4 - 6$).

Effets *in vivo* du pyriproxifène sur les concentrations des protéines hémolymphatiques

Une analyse quantitative des protéines hémolymphatiques a été réalisée au cours du stade nymphal de *T. molitor* (0 à 7 jours) chez les séries témoins et traitées au pyriproxifène (0.01 et 0.10 μg). Les résultats, présentés dans les figures 2A, 2B, montrent une évolution de la protéinémie chez les nymphes témoins qui présente deux pics, l'un à 2 jours et le second à 6 jours. Les nymphes traitées à l'exuviation nymphale au pyriproxifène, montre un seul pic à 2 jours. puis une diminution significative dans la concentration des protéines se produit au jour 3, mais de 3 à 7 jours après l'exuviation nymphale, les valeurs ne montrent aucune différence significative. La comparaison des taux de protéines entre les nymphes témoins et traitées révèle que le pyriproxifène induit une augmentation des protéines de l'hémolymphe chez les séries traitées. Cette augmentation a lieu aux jours 2 ($p = 0.0053$) et 3 ($p = 0.0006$), mais aussi au jour 4 ($p = 0.038$) pour la plus forte dose. Le pyriproxifène affecte les concentrations des protéines de l'hémolymphe sans effet dose.

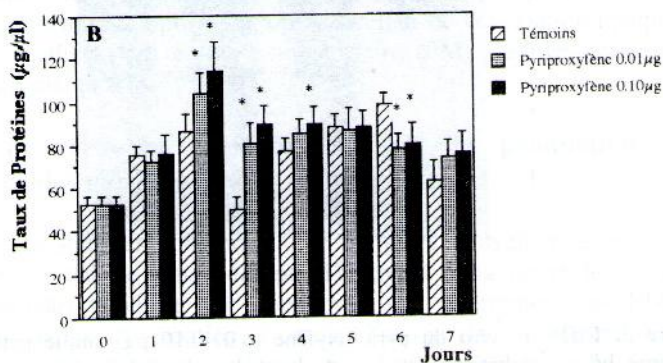
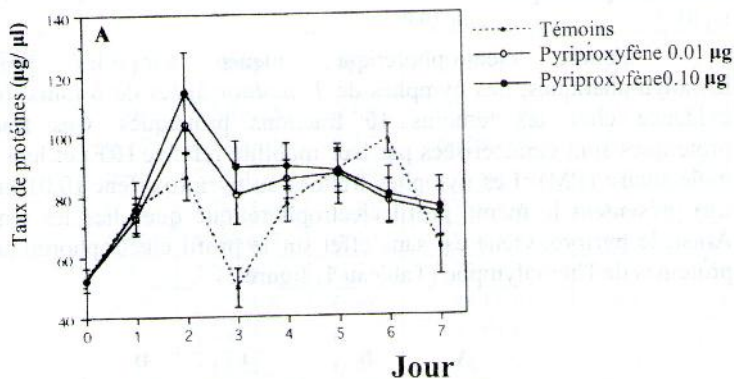


Figure 2: Effets *in vivo* du pyriproxyfène (0.01-0.10 µg) sur les taux des protéines hémolympatiques (µg/ µl) au cours du stade nymphal de *T. molitor* (0 à 7 jours) après traitement par application topique le jour de l'exuviation nymphale. **A:** Profil des taux des protéines au cours du stade nymphal chez les séries témoins et traitées. **B:** Evolution des taux des protéines entre les séries témoins et traitées ($m \pm s$; $n = 4 - 8$). L'astérisque indique une différence significative entre les témoins et les traitées.

Effets *in vivo* du pyriproxifène sur le profil des protéines hémolympathiques

L'étude électrophorétique, menée sur les protéines hémolympathiques, des nymphes de *T. molitor* âgées de 6 jours, met en évidence chez les témoins 10 fractions protéiques. Ces fractions protéiques sont caractérisées par leur mobilité relative (RF) et leur poids moléculaire (PM). Les nymphes traitées au pyriproxifène (0.01 et 0.10 μg) présentent le même profil électrophorétique que chez les témoins. Ainsi, le pyriproxifène est sans effet sur le profil électrophorétique des protéines de l'hémolymph (Tableau 1; figure 3)

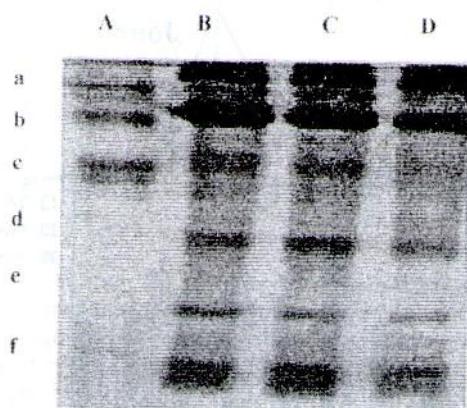


Figure 3: Effets *in vivo* du pyriproxifène (0.01-0.10 μg) sur le pattern des protéines hémolympathiques au jour 6 du stade nymphal de *T. molitor* après traitement par application topique le jour de l'exuviation nymphale: Séparation électrophorétique sur gel SDS-PAGE (12,5%) des protéines hémolympathiques (A: protéines marqueurs; B: témoins; C: 0,01 μg ; D: 0,10 μg) (a: phosphorylase B; b: serum albumine bovine; c: ovalbumine; d: anhydrase carbonique; e: inhibiteur de la trypsine de Soja; f: lysosyme).

TRAITEMENTS	TEMOINS		PYRIPROXYFENE 0.01 µg		PYRIPROXYFENE 0.10 µg	
	RF	PM	RF	PM	RF	PM
1	0.08	97400.00	0.08	97400.00	0.08	97400.00
2	0.17	66200.00	0.17	66200.00	0.17	66200.00
3	0.29	52480.74	0.29	52480.74	0.29	52480.74
4	0.32	47863.00	0.32	47863.00	0.32	47863.00
5	0.40	41686.93	0.40	41686.93	0.40	41686.93
6	0.51	32359.36	0.51	32359.36	0.51	32359.36
7	0.68	21873.61	0.68	21873.61	0.68	21873.61
8	0.72	19952.62	0.72	19952.62	0.72	19952.62
9	0.87	14454.39	0.87	14454.39	0.87	14454.39
10	0.95	11748.97	0.95	11748.97	0.95	11748.97

Tableau 1: Effets *in vivo* du pyriproxifène (0.01- 0.10 µg) sur le pattern des protéines hémolymphatiques au jour 6 du stade nymphal de *T. molitor* après traitement par application topique le jour de l'exuviation nymphale. Mobilité relative (RF) et poids moléculaire (PM, Da) des différentes fractions protéiques

Effets *in vitro* du pyriproxifène sur la production des ecdystéroïdes par les explants tégumentaires

Les sternites abdominaux de nymphes nouvellement exuviées sont mis en culture sans addition d'hormone exogène et la quantité d'ecdystéroïdes produite par l'épiderme est déterminée par EIA à différents temps d'incubation. Comme illustrée dans la figure 4, les résultats obtenus montrent que l'épiderme libère *in vitro* des ecdystéroïdes et que les taux hormonaux augmentent significativement aux différents temps de l'incubation (2, 4 et 6 jours). L'addition du pyriproxifène (1 et 10 µM) dans le milieu de culture inhibe la production hormonale comparativement aux témoins après 2 ($p=0.0005$), 4 ($p=0.0012$) et 6 ($p=0.0005$) jours d'incubation. La diminution significative des taux d'ecdystéroïdes est aussi observée entre les séries traitées après 4 ($p=0.0012$) et 6 ($p=0.0005$) jours d'incubation. Le pyriproxifène inhibe, avec un effet dose, la production des ecdystéroïdes *in vitro*.

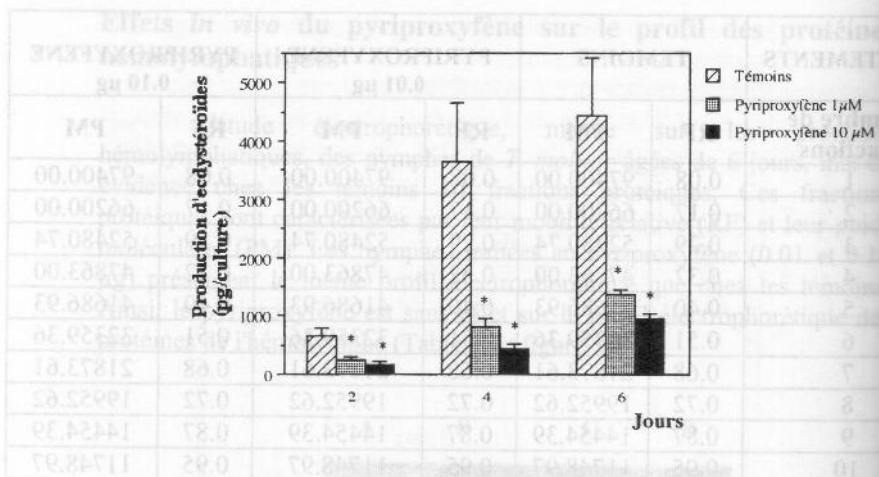


Figure 4: Effets *in vitro* du pyriproxyfène (1 - 10 µM) sur les taux d'ecdystéroïdes (exprimés en picogrammes d'ecdysone équivalents par culture) libérés dans le milieu de culture à divers temps d'incubation par les sternites, explantés le jour de l'exuviation, de nymphes de *T. molitor* ($m \pm s$; $n = 4 - 5$ cultures) L'astérisque indique une différence significative entre les témoins et les traitées.

Effets *in vitro* du pyriproxyfène sur la sécrétion cuticulaire par les explants tégumentaires

Les sternites abdominaux de nymphes nouvellement exuviées sont mis en culture, avec addition d'hormone exogène (initie un nouveau cycle cuticulaire) et l'épaisseur de la cuticule secrétée a été mesurée. Les résultats montrent que l'épiderme du tégument sternal sécrète la cuticule préexuviale adulte et que l'épaisseur de cette cuticule augmente significativement chez les témoins ($p < 0.05$) au jours 4 et 6 après incubation. Cependant, les explants tégumentaires traités au pyriproxyfène (1 et 10 µM) ne montre aucune différence de l'épaisseur de la cuticule pré-exuviale adulte aux divers temps d'incubation. La comparaison des données obtenues entre les séries témoins et traitées révèle une diminution significative de l'épaisseur de la cuticule secrétée aux jours 4 ($p = 0.015$) et 6 ($p = 0.0002$) après incubation, (figure 5) Le pyriproxyfène inhibe donc, sans effet dose, la synthèse de la cuticule adulte par les explants tégumentaires nymphaux.

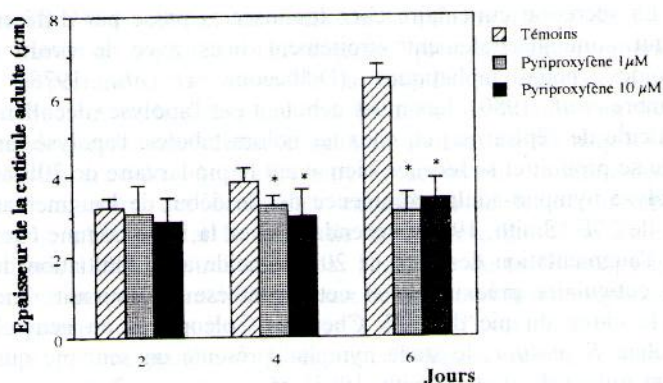


Figure 5: Effets du pyriproxyfène (1 - 10 μM) sur l'épaisseur (μm) de la cuticule préexuviale adulte secrétée dans le milieu de culture par les explants tégumentaires de nymphes de *T. molitor* à divers temps d'incubation ($m \pm s$; $n = 4 - 5$ cultures). L'astérisque indique une différence significative entre les témoins et les traitées.

DISCUSSION

Plusieurs processus physiologiques dans le développement des insectes sont orchestrés par la 20E, la JH, l'hormone d'éclosion et autres neurohormones comme les phénomènes de mues et de métamorphoses qui ont été longuement étudiées dans plusieurs ordres d'insectes (Nijhout, 1994; Riddiford, 1994, 1996). Les changements morphologiques et ultrastructuraux qui se produisent dans l'épiderme durant la croissance et le développement des insectes dépendent de la régulation de l'expression des gènes avec différents taux de 20E et en absence ou en présence de JH (Riddiford, 1996). Toute interférence dans cette homéostasie de l'une ou plusieurs de ces hormones avec des sources exogènes de ces mêmes hormones ou de leurs analogues de synthèse (agonistes ou antagonistes) peut conduire à une perturbation ou à une anomalie dans le développement des insectes cibles. De manière similaire, toute interférence dans les différentes étapes, dépendantes d'hormones, impliquées dans la synthèse ou dans la digestion de la cuticule peut affecter la survie de l'insecte et son développement. Ainsi chez *Ostrinia nubilalis*, l'application de fenoxycarbe entre le second et le quatrième stade larvaire n'a aucun effet sur leur durée; cependant, la durée du cinquième stade larvaire augmente de manière significative. (Gadenne *et al.*, 1990). L'application du fenoxycarbe au cours du cinquième stade larvaire entraîne différents effets dépendant des doses et du moment d'application et qui a pour conséquence l'apparition de larves surnuméraires ou permanentes ou encore des intermédiaires larves-nymphes (Hicks et Gordon, 1992; Mulye et Gordon, 1989).

La sécrétion cuticulaire chez les insectes passe par différentes étapes qui sont généralement étroitement liées avec le profil des ecdystéroïdes hémolymphatiques (Delbecque *et al.*, 1978 a,b; Delachambre *et al.*, 1980). Les mues débutent par l'apolyse (décollement de la cuticule de l'épiderme) et, chez les holométaboles, l'apolyse larvo-nymphale se produit et se termine bien avant le pic larvaire de 20E alors que l'apolyse nympho-adulte commence dès le début de l'augmentation des taux de 20E (Smith, 1985); cependant, chez la larve comme chez la nymphe, l'augmentation des taux de 20E coïncide avec l'initiation de la synthèse cuticulaire préexuviale et cette synthèse se poursuit même pendant la chute du pic de 20E. Chez les Coléoptères en général et comme chez *T. molitor*, le stade nymphal présente un seul pic qui se produit en milieu de stade (Smith, 1985) entre les jours 2 et 5 avec un maximum à 3 jours (Delbecque *et al.*, 1978 b); ainsi ces résultats se trouvent une nouvelle fois démontré et confirmé par les données présentées. Le pyriproxifène, analogue de la JH, utilisé le jour de l'exuviation des nymphes de *T. molitor*, entraîne une inhibition des taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques. Cette réduction dans les concentrations hormonales est aussi retrouvée chez d'autres Coléoptères comme chez les larves de *Tribolium freemani* (Hirashima *et al.*, 1995), après traitement à l'HJ mais aussi chez les larves de *Zophobas atratus* (Aribi *et al.*, 1999), après traitement au ZR 515 ou méthoprène, autre agoniste de la JH. Le traitement des larves de *Bombyx mori* au fenoxycarbe, induit l'inactivation des glandes prothoraciques et inhibe la synthèse d'ecdysone (Monconduit et Mauchamp, 1998). La modification dans le profil des taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques chez les insectes traités avec le pyriproxifène ou autre analogue de la JH entraîne par conséquent une perturbation dans le processus de la mue du stade suivant. Hatakoshi *et al.* (1986) ont montré que le pyriproxifène et le méthoprène suppriment les taux normaux d'ecdystéroïdes dans l'hémolymph chez *Spodoptera litura*; de plus, le pyriproxifène est beaucoup plus efficace pour l'induction des larves surnuméraires que le méthoprène quand il est utilisé par injection au cours du dernier stade larvaire de *S. litura*. Le fenoxycarbe induit aussi une inhibition complète de la mue adulte chez *Alphitobius diaperinus* (Edwards et Abraham, 1985).

La synthèse des ecdystéroïdes se fait dans différents tissus ou organes après stimulation par l'hormone prothoracicotrope (PTTH); celle-ci stimule la synthèse des ecdystéroïdes ou de leurs précurseurs immédiats par les glandes prothoraciques via l'AMP cyclique, le calcium, la calmoduline et les protéines kinases (Gilbert *et al.*, 1988; Warren *et al.*, 1988 a, b; Smith et Gilbert, 1989). La phosphorylation de certaines protéines comme la p 34 et la p 50 est corrélée avec l'augmentation de la production des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques et la synthèse des ecdystéroïdes est stimulée grâce à l'intervention de la protéine ribosomiale S6 ou p 34 et de sa phosphorylation multiple (Song et

Gilbert, 1994, 1995). Au cours de la métamorphose de *T. molitor*, l'évolution de la protéinémie, présente 2 pics; le premier apparaît à la fin de la période de sécrétion de la cuticule postexuviale nymphale, à l'apolyse, et particulièrement dès le début de la mise en place de la cuticule préexuviale adulte; les taux diminuent ensuite jusqu'à la veille de l'exuviation adulte où on enregistre le second pic. La chute des taux des protéines entre ces deux pics coïncide avec le pic d'ecdystéroïdes hémolymphatiques et le début de la synthèse de la nouvelle cuticule (Soltani, 1990). Le traitement par l'agoniste de la JH ou pyriproxifène entraîne une augmentation des taux de protéines hémolymphatiques chez les nymphes de *T. molitor* traitées le jour de l'exuviation mais il n'affecte pas le pattern protéique. Il est intéressant de constater que chez les témoins, la diminution dans la concentration des protéines dans l'hémolymphes est contemporaine de l'augmentation des taux hormonaux, alors que chez les nymphes traitées, l'augmentation des protéines dans l'hémolymphes s'accompagne d'une diminution des taux d'ecdystéroïdes. Cependant, la JH inhibe la synthèse des protéines hémolymphatiques chez les larves de *B. mori* (Bosquet *et al.*, 1989 a, b) et le pyriproxifène inhibe la synthèse de deux protéines hémolymphatiques spécifiques aux larves chez *Locusta migratoria*. (De Kort et Koopmanschap, 1991). Il semblerait que les analogues de la JH entraînent des effets contraires selon le stade de développement des insectes; ceci pourrait peut-être s'expliquer par une régulation différente de la JH entre la larve et la nymphe.

Dans différentes espèces d'insectes, des sites alternatifs de production de l'hormone de mue existent au côté des glandes prothoraciques ou des ovaires (Delbecque *et al.*, 1990); il est en général admis que les glandes prothoraciques sont la seule source d'ecdystéroïdes dans les stades immatures (contrôle de la mue) et que les ovaires représentent l'unique source hormonale au cours des stades larvaires et nymphaux (reproduction). Chez *T. molitor*, le tégument nymphal (Delbecque *et al.*, 1990) et les ovaires matures sont tous deux aptes à produire *in vitro* des ecdystéroïdes (Soltani *et al.*, 1997) mais l'épiderme constitue une importante source primaire de sécrétion des ecdystéroïdes (Delbecque *et al.*, 1986; 1988; 1990). Le dosage EIA des ecdystéroïdes libérés dans le milieu de culture par les sternites abdominaux explantés le jour de l'exuviation nymphale montre que le pyriproxifène affecte la production hormonale avec un effet dose-dépendant. La production des ecdystéroïdes enregistrée à la fin de la période d'incubation est quatre fois plus basse chez les séries traitées comparativement aux témoins.

Les explants tégumentaires incubés *in vitro* sont aussi capables de sécréter une nouvelle cuticule après induction par la 20E et la nature de cette cuticule est la préexuviale adulte, la postexuviale semble ne pas apparaître dans le système *in vitro* (Quennedey *et al.*, 1983). Les résultats obtenus montrent que le pyriproxifène bloque la sécrétion de la cuticule préexuviale adulte et ceci peut s'expliquer par le fait que la JH a sans

doute la capacité de modérer l'effet de la 20E, comme il l'a été démontré sur les cellules épidermiques du disque imaginal chez *Drosophila* par Cottam et Milner (1998); ainsi, l'inhibition quasitotale de la mue imaginale observée chez *T. molitor* après traitement au pyriproxifène le jour de l'exuviation nymphale (résultat non publié) peut alors s'expliquer. La suppression de la formation de l'adulte est aussi démontré chez *Bemisia tabaci* (Ishaaya et Horowitz, 1992, 1995) et *Trialeurodes vaporarum* (De Cock et al., 1995; Ishaaya et al., 1994).

REFERENCE

- ANDERSEN W.A. & ELLIS R.A., 1965 - Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi*: flagellum, microtubules and the kinetoplaste. *J. Protozool.*, **12**: 483-499.
- ARIBI N., PITOIZET N., QUENNEDEY A. & DELBECQUE J.P., 1997b - Ecdysteroid Titres in a Tenebrionidae Beetle *Zophobas atratus*: Effects of grouping and isolation. *J. Insect Physiol.*, **43**: 815-821.
- ARIBI N., QUENNEDEY A., SOLTANI N. & DELBECQUE J.P., 1999 - L'initiation de la métamorphose chez *Zophobas atratus* (Coleoptera:Tenebrionidae): effets des ligatures et des régulateurs de croissance *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, (in press).
- BOSQUET G., GUILLET C., CALVEZ B. & CHAVANCY H G., 1989 a - The regulation of majeur hemolymph protein synthesis changes in mRNA content during the development of *Bombyx mori* larvae. *Insect. Biochem.*, **19**: 29-39.
- BOSQUET G., FOURCHE J. & GUILLET C., 1989 b - Respective contributions of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone to the regulation of major hemolymph protein synthesis in *Bombyx mori* larvae. *J. Insect Physiol.*, **35**: 1005-1015.
- BRADFORD M.M., 1976 - A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- COTTAM D.M. & MILNER M.J., 1998 - The effect of juvenile hormone on the response of the *Drosophila* imaginal disc cell lines C 19- to moulting hormone. *J. Insect Physiol.*, **44**: 1137-1144.
- DE COCK A., ISHAAYA I., VAN DE VEIRE M. & DEGHEELE D., 1995 - Response of buprofenozin susceptible and resistant strains of *Trialeurodes vaporarum* (Homoptera: Aleyrodidae) to pyriproxifen and diafenthiuron.
- DE KORT C.A.D. & KOOPMANSHAP A.B., 1991 - A juvenile hormone analogue affects the protein pattern of the hemolymph in last-instar larvae of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, **37**(2): 87-93.
- DELACHAMBRE J., BESSON M.T., CONNAT J.L. & DELBECQUE J.P., 1980 - Ecdysteroid titres

- and integument events during the metamorphosis of *Tenebrio molitor*. In Hoffman JA. (ed). *Progress in Ecdysone Research*. p.211-234. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-York, Oxford.
- DELBEQUE J.P., DELACHAMBRE J., HIRN M. & DE REGGI M.**, 1978a - Abdominal production of beta-ecdysone and pupal-adult development in *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera). *Gen.Comp.Endocrinol.*, **35**: 436-444.
- DELBEQUE J.P., HIRN M., DELACHAMBRE J. & DE REGGI M.**, 1978b - Cuticular cycle and molting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* (Insecta Coleoptera). *Devel.Biol.*, **64**: 11-30.
- Delbecque J.P., Meister M.F. & Quennedey A., 1986 - Conversion of radio- labelled 2,22,25-tri-deoxyecdysone in *Tenebrio pupae*. *Insect Biochem.*, **16**: 57-64.
- DELBEQUE J.P., WEIDNER K. & HOFFMAN K.H.** 1990 - Alternative Sites for Ecdysteroid Production in Insects. *Invert. Reprod.Devel.*, **18** : 29-42.
- DE REGGI M., PITOIZET N., GHARIB B. & DELBEQUE J.P.**, 1992 - New enzyme immunoassays for ecdysteroids using peroxylase as enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies. Xth Ecdysone Workshoop, Liverpool, 6-9 April 1992, p.77.
- DHADIALLA T.S., CARLSON G.R. & DAT P.L.**, 1998 -. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. - *Ann. Revi. Entomol.*, **43**: 545-569.
- DINAN L.**, 1989 - Ecdysteroid structure and hormonal activity. In Koolman J. (ed) *Ecdysone: from chemistry to mode of action* p. 345-354. Thieme Stuttgart .
- DORN S., FRISHKNECHT M.L., MARTINEZ V., ZURFLUSH R. & FISHER U.**, 1981. A novel non-neurotoxic insecticide with a broad activity spectrum. *Z. Pflanzenkrankh.*, **88**: 269-275.
- EDWARDS J.P. & ABRAHAM L.**, 1985 - Laboratory evaluation of two insect juvenile hormone analogs against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) *J. Stored Prod.Res.*, **21**: 189-194.
- FRIEND D.S. & FARQUHAR H.E.**, 1967 - Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. *J. Cell. Biol.*, **35**: 357-376.
- GÄDE G., HOFFMAN K.H. & SPRING J.H.**, 1997 - Hormonal regulation in Insects: Facts, Gaps and future directions. *Physiol. Rev.*, **77** (4): 963-1032
- GADENNE C., GRENIER S., PLANTEVIN G. & MAUCHAMP B.**, 1990 - Effects of juvenile hormone mimetic, Fenoxycarb, on post-embryonic development of the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis* Hbn. *Experientia* , **46** (7): 744-747.

- GILBERT L.I., COMBEST W.L., SMITH W.A., MELLER V.H. & ROUNTREE D.B.**, 1988 -Neuropeptides, second messengers and Insect molting. *Bioassays*, **8**:153-156.
- GRENIER S. & GRENIER A.M.**, 1993 - Fenoxycarb, a fairly new insect growth regulator: a review of its effects on insects. *Ann. Appl. Biol.*, **122**: 369-403.
- HATAKOSHI M., AGU N. & NAKAYAMA I.**, 1986 - 2- (1- Methyl - 2 (4-Phenoxy-phenoxy)Etoxy)Pyridine as a new insect juvenile hormone analog: induction of supernumerary larvae in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **21**: 351-353.
- HICKS B.J. & GORDON R.**, 1992 - Effects of the juvenile hormone analog fenoxycarb on various developmental stages of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumifera* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.*, **124**: 117-123.
- HIRASHIMA A., TAKEYA R., TANIGUSHI E. & ETO M.**, 1995 - Metamorphosis, activity of juvenile hormone esterase and alteration of ecdysteroids titres: Effects of larval density and various stress on the red flour beetle *Tribolium freemani* Hinton (Coleoptera - Tenebrionidae). *J. Insect Physiol.*, **41**: 383 - 388.
- ISHAAYA I. & HOROWITZ A.R.**, 1992 - Novel phenoxy juvenile hormone analog (pyriproxyfen) suppresses embryogenesis and adult emergence of the sweetpotatoes whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J.Econ.Entomol.*, **85**: 2113-2117.
- ISHAAYA I. & HOROWITZ A.R.**, 1995 - Pyriproxyfen, a novel insect growth regulator for controlling whiteflies: mechanisms and resistances management. *Pestic Sci.*, **43**: 227-232.
- ISHAAYA I., DE COCK A. & DEGHEELE D.**, 1994 - Pyriproxyfen, a potent supressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Ho
- KOOLMAN J.**, 1990 - Ecdysteroids. *Zool. Sci.*, **7** : 563-580.
- LAEMMLI V.K.**, 1970 - Cleavage of structural proteins during the moptera: Aleyrodidae). *J.Econ.Entomol.*, **87**: 1185-1189. assembly of head bacteriophage T4. *Nature.*, **227**: 680-685.
- LANDUREAU J.C. & GRELLET P.**, 1972 - Nouvelles techniques de culture *in vitro* de cellules d'insectes et leurs applications. *C. R.Acad.Sciences (Paris)*, **274 (D)**: 1372-1375.
- MIYAMOTO J., HIRANO M., TAKIMOTO Y. & HATAKOSHI M.**, 1993 - Insect growth regulators for pest control, with the emphasis on juvenile hormone analogs: present and future prospects. In *Pest Control with Enhanced Environmental Safety*, ed. SO Duke, JJ Menn, JR Plimmer, *ACS Symp.Ser.* **524**: 144-168. Washington, DC: Am. Chem. Soc.
- MONCONDUIT H. & MAUCHAMP B.**, 1998 - Effects of ultralow doses of fenoxycarb on juvenile hormone-regulated physiological

- parameters in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Arch. Insect Bioch. Physiol.*, **37**: 178-189.
- MULYE H. & GORDON R.**, 1989 - Effects of selected juvenile hormone analogs on sixth-instar larvae of the eastern spruce budworm *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera: Tortricidae) in turfgrass. *J. Econ. Entomol.*, **121**: 1271-1272.
- NIJHOUT H.F.**, 1994 - Insects hormones. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press. 267p.
- PORCHERON P., MORINIÈRE M., GRASSI J. & PRADELLES P.**, 1989 - Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetyl-cholinesterase as label. *Insect Biochem.*, **19**: 117-122.
- QUENNEDEY A., QUENNEDEY B., DELBECQUE J.P. & DELACHAMBRE J.**, 1983 - The in vitro development of the pupal integument and the effects of ecdysteroids in *Tenebrio molitor* (Insecta: Coleoptera) *Cell. Tiss. Res.*, **232**: 493-511.
- REES H.H.**, 1995 - Ecdysteroids biosynthesis and inactivation in relation to function. *Eur. J. Ent.*, **92**: 9-39.
- RETNAKARAN A., GRANETT J. & ENNIS T.**, 1985 - Insect growth regulators. In: Kerkut G.A. & Gilbert L.I. (eds). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.*, **12**. p. 530-601. Pergamon Press: Oxford.
- RIDDIFORD L.M.**, 1994 - Cellular and molecular action of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect. Physiol.*, **24**: 213-274.
- RIDDIFORD L.M.**, 1996 - Molecular aspects of juvenile hormone action in Insect metamorphosis In Gilbert L.I. (ed) *Metamorphosis*, p. 223-251. London Academic
- SECHSER V.L., REBER B. & WESIAK H.**, 1994 - Selectivity of Diofenolan (CGA 59 205) and its potential for integrated scale control. *Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis.*, **3**: 1193-1198.
- SMITH S.L.**, 1985 - Regulation of ecdysteroid titer synthesis. In *Comprehensive Insect physiology, biochemistry and pharmacology*, (Kerkut G.A. and Gilbert L.I., Eds.), Pergamon Press, Oxford, **7**: 295-341.
- SMITH W.A. & GILBERT L.I.**, 1989 - Early events in peptide-stimulated ecdysteroid secretion by the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *J. Exp. Zool.*, **252** (3): 264-270.
- SOLTANI N.** (1990). Action du diflubenzuron et de la 20-hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hémolymphatiques chez les nymphes de *Tenebrio molitor*. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, **26** (4): 575-584.
- SOLTANI N., SOLTANI-MAZOUNI N., QUENNEDEY B. & DELACHAMBRE J.**, 1996 - Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under *in vivo* and *in vitro* condition: effects of diflubenzuron. *J. Stored Prod. Res.*, **32** (3): 205-212.

- SOLTANI N., PITOIZET N., SOLTANI-MAZOUNI N., DELACHAMBRE J. & DELBECQUE J.P.**, 1997 - Activity of an anti-ecdysteroid compound (KK-42) on ovarian development and ecdysteroid secretion in mealworms. *Med.Fac.Landbouww.Univ.*, **62** (2): 531-537.
- SONG Q.S. & GILBERT L.I.**, 1994 - S6 phosphorylation results from prothoracicotropic hormone stimulation of insect prothoracic glands: a role for S6 kinase. *Dev Genet.*, **15**: 332-338.
- SONG Q.S. & GILBERT L.I.**, 1995 - Multiple phosphorylation of ribosomal protein S6 and specific protein synthesis are required for prothoracicotropic hormone-stimulated ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25** (5): 591-602.
- STAAL G.B.**, 1982 - Insect control with growth regulators interfering with the endocrine system. *Entomol. Exp. Appl.*, **31**: 15-23.
- WARREN J.T., SAKURAI S., ROUNTREE D.B. & GILBERT L.I.**, 1988a - Synthesis and secretion of ecdysteroids by the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *J.Insect Physiol.*, **34**: 571-576.
- WARREN J.T., SAKURAI S., ROUNTREE D.B., GILBERT L.I., LEE S. & NAKANASHI K.**, 1988b - Regulation of the ecdysteroid titer of *Manduca sexta*: reappraisal of the role of the prothoracic glands. *Proc.Nat.Acad.Sci.*, **85**: 958-962.
- WILLIAMS C.M.**, 1967 - The juvenile hormone II. Its role in the endocrine control of molting, pupation, and adult development in the cecropia silkworm. *Bio. Bull. Woods Hole*, **121**: 572-585.

***Département de Biologie; Faculté des Sciences Université de Annaba.**