

EFFETS D'UN INHIBITEUR DE LA SYNTHÈSE DE LA CHITINE, LE DIFLUBENZURON, SUR LA PROLIFÉRATION DE DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES CHEZ LES INSECTES

Hinda Berghiche¹, Guy Smagghe², Nouredine Soltani¹

¹ *Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, Annaba 23000, Algérie.*

² *Laboratory of Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, B-9000 Ghent, Belgium.*

Reçu le 01/07/2006 et accepté le 13/05/2007

ملخص

تعتبر منظمات نمو الحشرات مبيدات ذات تأثير إيكوتوكسيكولوجي ضئيل. هذه المركبات تؤثر على العمليات الفيزيولوجية والبيوكيميائية الوحيدة و النوعية لدى الكائنات المستهدفة من أجل معرفة ميكانزمات تأثير هذه المركبات الجديدة، عدة فصائل خلوية استعملت لدراسة تأثير مثبط تركيب الكيتين، الـديفلوبازرون (diflubeuzuron) (10^{-11} – 10^{-4} M) على التكاثر الخلوي. ثلاث فصائل خلوية تمت معاينتها الخلايا المبيضية (Lepidoptera) Spodoptera frugiperda (SF9) وخلايا الاجنحة (Diptera) Drosophila melanogaster (S2). النتائج المحصل عليها توضح أن نسبت تثبيط التكاثر الخلوي بواسطة الـديفلوبازرون ضئيلة (> 50%)، ومن جهة أخرى لقد توضح ان الخلايا PID2 حساسة أكثر من الخلايا الجنينية S2، و المبيضية SF9.

الكلمات المفتاحية: زرع خلوي؛ زرع خلوي تجريبي (ز.خ.ت)؛ منظمات النمو؛ الحشرات؛ الـديفلوبازرون.

Résumé

Les régulateurs de croissance des insectes (RCIs) sont reconnus comme étant des insecticides à faibles risques écotoxicologiques. Ces composés agissent sur des processus physiologiques et biochimiques uniques et spécifiques aux organismes visés. Dans le but d'approfondir le mécanisme d'action de ces nouvelles molécules, des lignées cellulaires ont été utilisées pour tester les effets in vitro d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron (10^{-11} – 10^{-4} M) sur la prolifération cellulaire. Trois types de lignées cellulaires ont été éprouvées: des cellules ovariennes (SF9) de Spodoptera frugiperda (Lépidoptère), les cellules (PID2) des disques imaginaux des ailes de Plodia interpunctella (Lépidoptère) et des cellules (S2) embryonnaires de Drosophila melanogaster (Diptère). Les résultats obtenus montrent que les taux d'inhibition de la prolifération cellulaire par le diflubenzuron sont faibles (< 50%). Par ailleurs, il a été noté que les cellules PID2 des disques imaginaux des ailes sont plus sensibles que les cellules ovariennes SF9 et les cellules embryonnaires S2.

Mots clés : cultures cellulaires; test de prolifération cellulaire MTT; régulateurs de croissance des insectes; diflubenzuron.

Abstract

Insect growth regulators (IGRs) have been proposed as agents for the control of insect pests. These compounds exhibited their activity via interaction with physiological and biochemical processes unique and specific to target pests. In order to understand the mechanism of action of these insecticides, cell lines were used to test in vitro effect of a chitin synthesis inhibitor, diflubenzuron, on cell proliferation. Three cell lines were tested: ovarian cells (SF9) from Spodoptera frugiperda (Lepidoptera), imaginal disc cells (PID2) from Plodia interpunctella (Lepidoptera) and embryonic cells (S2) from Drosophila melanogaster (Diptera). The insecticide was added to the culture medium at various final concentrations (10^{-11} – 10^{-5} M). Results showed that the rates of inhibition of cell proliferation by diflubenzuron are slight (<50%). Moreover, the imaginal disc cells PID2 are more sensitive than ovarian cells SF9 and embryonic cells S2.

Key words: cell culture; MTT-assay; insect growth regulators; diflubenzuron.

Auteur correspondant: berghiche@yahoo.fr (Hinda Berghiche)

1. INTRODUCTION

L'industrie phytosanitaire a développé de nouvelles molécules non polluantes naturelles et synthétiques, elles sont plus sélectives, de grande stabilité métabolique et environnementale [1,2] et agissent sur des processus biochimiques spécifiques aux organismes visés [3]. Ces nouvelles molécules sont désignées sous le nom de régulateurs de croissance des insectes (RCIs); elles agissent de manière sélective en interférant notamment avec les processus de mue, de métamorphose et de reproduction. Les dérivés de la benzoylphénylurée (BPU) sont des composés considérés comme des inhibiteurs de la synthèse de la chitine [2], dont le diflubenzuron est le premier composé commercialisé [4]. D'autres analogues ont été développés, tels que le chlorfluazuron, le flucyclozuron et l'hexaflumuron [5] ou encore le lufenuron, le teflubenzuron et le triflumuron [6,7]. La plupart de ces composés sont très puissants à l'égard des différents insectes nuisibles mais avec une activité plus importante envers les Lépidoptères [8].

Depuis sa découverte [9], le diflubenzuron a fait l'objet d'une recherche intensive, il a été démontré qu'il présente une activité insecticide à l'égard de tous les stades immatures et provoque une mortalité due à l'incapacité des animaux à exuvier normalement [10]. Diverses études menées *in vivo* et *in vitro* sur *T. molitor* ont montré que le diflubenzuron affecte le taux des ecdystéroïdes au cours du développement post-embryonnaire [11] et la reproduction [12]; il agit également sur la sécrétion cuticulaire en réduisant l'épaisseur de la cuticule [11-13]. Ainsi, le diflubenzuron est un puissant insecticide qui inhibe la synthèse de chitine des insectes et de certaines espèces Arthropodes *in vivo* néanmoins, les mécanismes d'action restent en partie inconnus, puisque il n'a pas d'effet direct sur les enzymes impliquées dans la

synthèse de la chitine [14]. C'est pourquoi, la présente étude est consacrée à l'évaluation des effets du diflubenzuron sur des lignées cellulaires d'insectes en utilisant la prolifération cellulaire comme paramètre de l'activité biologique.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Insecticide et traitement

Le diflubenzuron (DFB) ou [1-(4-chlorophényl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)-urée] (Fig. 1). C'est un inhibiteur de la synthèse de la chitine de la classe de la benzoylphénylurée (BPUs). Le produit a été dilué dans l'éthanol et additionnée (2µl) au milieu de culture à plusieurs concentrations finales (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} et 10^{-4} M).

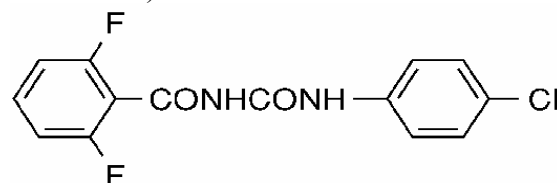


Figure 1: Structure chimique du diflubenzuron.

2.2. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'insecte de type SF9 des cellules ovariennes de *S. frugiperda* [15], les cellules PID2 des disques imaginaux des ailes de *P. interpunctella* [16] et les cellules embryonnaires S2 de *D. melanogaster* [17], sont maintenues dans des flacons de 25 cm³ dans un volume total de 4 ml de milieu de culture sans antibiotique dans une étuve réglée à 27°C et 90 % d'humidité pendant 6 jours. La détermination de la densité cellulaire a été réalisée par un comptage manuel en utilisant un hémocytomètre selon Tamura & Eto [18] et Oberlander *et al.* [19]. Un volume de 198 µl de la suspension cellulaire additionné de gentamicine (5µl/1ml) a été déposé et déposé dans chaque puits de la microplaque à 96 puits (Greiner, Bio-One) et un volume de 2 µl du produit testé ou du solvant a été ajouté

puis incubé pendant 3 jours (SF9 et S2) et 5 jours (PID2).

2.3 Test de prolifération cellulaire

Le test de prolifération cellulaire (MTT) a été réalisé selon la procédure de Denizot et Lang [20], modifiée par Decombel *et al.* [21]. Le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) (Sigma, Belgique) a été préparé à raison de 1 mg/ml dans le tampon phosphate (100 mM à pH 7,4). Une quantité de 100 µl de la culture cellulaire a été prélevée de chaque puits dans des tubes eppendorf à laquelle on ajoute 100 µl de la solution MTT (1mg/ml). Les tubes ont été homogénéisés puis incubés à une température de 27°C pendant 3 heures. Au terme de l'incubation, les échantillons ont été centrifugés (20000 tours /min) à (4°C) pendant 7 minutes (2K15C, Braun Biotech International, Melsungen, Germany). Le culot a été récupéré et additionné de 220 µl d'isopropanol, puis agité pendant 30 et suivi d'une deuxième centrifugation à 4°C pendant 7 minutes. Le dosage de la densité cellulaire a été effectué dans une deuxième plaque de titration, dans laquelle une quantité de 200 µl d'isopropanol et 200 µl de chaque tube ont été déposées dans les différents puits (6 répétitions). La lecture des absorbances a été réalisée à une longueur d'onde de 560 nm dans un spectrophotomètre (MultiPower Wave X-340, Bio-Tek Instruments BRS, Winoosky, VT). Les densités cellulaires ont été calculées grâce à des courbes de références exprimant le nombre de cellules SF9, PID2 et S2 en fonction des densités optiques.

2.4 Analyse statistique

Les données obtenues ont été traitées grâce au logiciel Excel. Les résultats ont été exprimés par le taux d'inhibition de la prolifération cellulaire provoquée par le diflubenzuron. Le test de la régression linéaire a permis de calculer les droites de

régression pour les trois types de cellules utilisées SF9, PID2 et S2.

3. RESULTATS

Le comptage manuel des cellules par la méthode de Bürker à l'aide d'un hémocytomètre est suivi d'une quantification par une méthode colorimétrique, utilisant le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide, qui a la capacité de traverser la membrane plasmique et qui est réduit en formazan en présence de NADH ou NADPH produit par l'enzyme déshydrogénase de l'activité métabolique cellulaire [22]. Le taux de formazan formé est proportionnel au nombre de cellules dans le milieu de culture. La détermination du taux d'inhibition cellulaire a été réalisée à l'aide des courbes de référence, exprimant le rapport de la densité optique à 560 nm en fonction de différentes concentrations cellulaires connues.

Les différentes lignées cellulaires ont été utilisées pour examiner les effets d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron, sur la prolifération cellulaire *in vitro*. Il est généralement admis que la prolifération des cellules embryonnaires S2 de *D. melanogaster* est plus rapide que celle observée chez les cellules ovariennes de type SF9 de *S. frugiperda* et les cellules des disques imaginaux des ailes PID2 de *P. interpunctella*. Au début de la culture le nombre des cellules est de l'ordre de 2×10^5 cellules /100 µl (SF9); 1×10^5 cellules/100 µl (PID2) et 5×10^5 cellules /100 µl (S2). Au terme de l'incubation (3 jours), les cellules SF9 traitées au diflubenzuron à différentes concentrations montrent un taux d'inhibition croissant; il est de l'ordre de 3 % à la dose 10^{-11} M, 15% à la dose (10^{-5} M) et atteint 25 à 30 % avec la dose la plus élevée (10^{-4} M). Le taux d'inhibition de la prolifération des cellules des disques imaginaux des ailes PID2 montrent un taux d'inhibition à 7 % à la dose 10^{-11} et atteint 30 à 40 % à la

dose 10^{-4} . Par ailleurs, le taux d'inhibition de la prolifération des cellules embryonnaires S2 induit par le diflubenzuron est d'environ 10 à 20 % à la dose 10^{-5} M (Fig. 2). L'incubation des cellules en présence du DFB ne montre pas une inhibition importante.

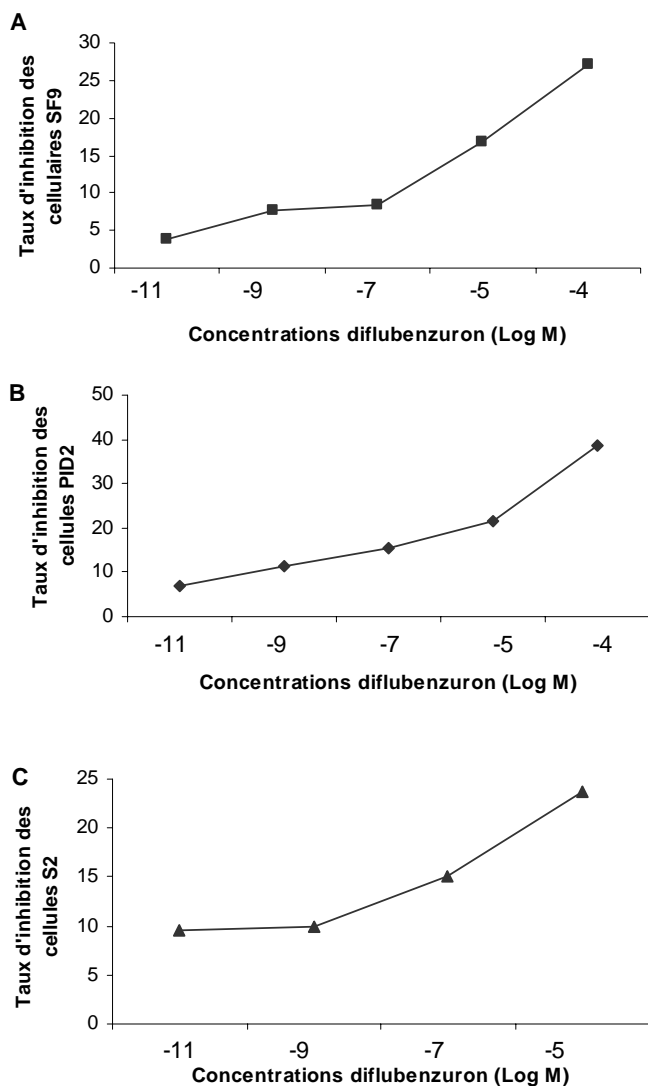


Figure 3: Effet du diflubenzuron sur le taux de prolifération des lignées cellulaires de type SF9 (A), PID2 (B) et S2 (C).

4. DISCUSSION

Plusieurs compagnies de recherche ont inséré un programme fondé sur une technologie *in vitro* qui représente une importante possibilité pour examiner les mécanismes et les sites d'action des insecticides. Les publications reportées durant la dernière décade montrent que

plus de cinq cents lignées cellulaires ont été établies et que leur utilisation en culture peut réduire le temps nécessaire pour tester les nouvelles molécules insecticides [23].

Les ecdystéroïdes sont des hormones stéroïdes impliquées dans la croissance épidermique des Arthropodes. Ils contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaire [24]. Les effets morphogénétiques et biochimiques des ecdystéroïdes ont été étudiés chez différentes lignées cellulaires [16,25]. Il a été bien établi que le diflubenzuron inhibe la synthèse de la chitine *in vivo* et *in vitro* [12,26]. Une telle action constitue le principal mécanisme d'action de ce composé [11-13]. Le diflubenzuron a fait l'objet de plusieurs études qui ont révélés qu'il affecte la reproduction en inhibant la synthèse de l'ADN [12,27] et des protéines ovariennes de *T. molitor*, suggérant ainsi son action sur la vitélogénèse [27]. Il peut également interférer avec l'ovogenèse *via* la différenciation cellulaire avec une réduction évidente des cellules dans le germarium et la maturation folliculaire par la perturbation des processus de la vitélogénèse [28]. Les travaux de Chebira et al. [29] ont montré une pharmacocinétique différente avec les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron et le flucyclozuron par rapport à un agoniste des ecdystéroïdes, le halofenozide. Actuellement, Berghiche et al. [30] démontre que le RH-0345 un (analogue des ecdystéroïdes) augmente le contenu en chitine et induit une apolyse prématurée avec la formation d'une nouvelle cuticule dans les explants tégumentaires nymphaux de *T. molitor*. Notre recherche a été menée sur la prolifération de trois types cellulaires et vise à déterminer les effets du diflubenzuron *in vitro*. En effet, l'inhibition de la prolifération cellulaire causée par le diflubenzuron est faible (<50%) mais elle est plus importante chez les cellules PID2 des disques imaginaux

par rapport aux cellulaires ovariennes SF9 et les cellules embryonnaires S2. L'incubation des cellules SF9, PID2 et S2 en présence du diflubenzuron à la concentration 10^{-5} M montre une inhibition faible puisque elle est inférieure à 50 %. Ainsi, l'utilisation de concentrations plus élevées est nécessaire pour inhiber la prolifération cellulaire.

Des expérimentations ont montrés que les effets des inhibiteurs de la synthèse de la chitine peuvent être mesurés sur les cellules en culture. Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine ont été testés également sur la lignée cellulaire IAL-PID2 qui dérive des disques imaginaires des ailes de *P. interpunctella*, pour déterminer si elles peuvent incorporer les précurseurs de la chitine aux cellules cibles [31]. Les cellules PID2 répondent au traitement à la 20E par une augmentation de l'incorporation de la GlcNAc, N-acetylgalactosamine et le précurseur de la chitine le D-glucosamine, et non pas le D-glucose ou le D-mannose [31]. Le teflubenzuron, un analogue du diflubenzuron ne réduit pas l'incorporation de GlcNAc par les cellules PID2, par contre, diflubenzuron présente une légère inhibition [32]. Par ailleurs, d'autres travaux utilisant les cellules de *Spodoptera exigua* (Lépidoptère) ont montré une inhibition de leur prolifération en présence du diflubenzuron et de plusieurs autres molécules telles que le parathion, un inhibiteur des récepteurs de l'acétylcholinestérase et l'imidacloprid et le spinosad, deux produits appartenant à la classe des neurotoxines [21]. Aussi, Oberlander *et al.* [19] ont trouvé que les analogues de l'hormone juvénile, le fenoxycarbe et le méthoprène, diminuent la prolifération des cellules IAL-PID2 de *P. interpunctella*. Les travaux de Nakagawa *et al.* [33] ont montré que le diflubenzuron affecte les gamma-thio GTP et inhibe l'incorporation des ions Ca^{+2} par les vésicules intracellulaires du tégument chez les nymphes de *P.*

americana (Blattellidae) *in vitro*. Récemment, Abo-Elghar *et al.* [14] ont investigué le mode d'action du diflubenzuron en utilisant les cellules tégumentaires de *Blattella germanica* ((Blattellidae) et de *D. melanogaster* en culture. Les résultats ont révélé que le site d'action du diflubenzuron et des autres BPU en général, est le transporteur ABC (ATP binding cassette) c'est à dire les récepteurs sulfonyleurée (SUR). Les expériences de Hatt *et al.* [34] indiquent que ces cellules IAL-PID2 de *P. interpunctella* conservent leur sensibilité aux ecdystéroïdes *in vitro* et que la 20E induit des changements morphologiques comme l'élongation et la formation d'agrégats cellulaires [35] et inhibe la prolifération cellulaire en causant une accumulation des cellules en phase G2 du cycle de division cellulaire.

5. CONCLUSION

L'utilisation de lignées cellulaires en culture peut être un moyen facile pour évaluer et déterminer le mode d'action de nouvelles molécules insecticides. Les résultats obtenus montrent que les différentes cellules utilisées sont faiblement sensibles au diflubenzuron. Néanmoins, les cellules PID2 des disques imaginaires des ailes sont plus sensibles que les cellules ovariennes SF9 et les cellules embryonnaires S2.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Agrozoology, Université de Gand (Pr. G. Smagghe) dans le cadre d'un stage financé par le MESRS (H. Berghiche). Les auteurs remercient (S. Van De Velde (laboratoire d'Agrozoology, Université de Gand) pour son aide technique.

REFERENCES

- [1] T.S. Dhadialla, G.R. Carlson, D.P. Le, *New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity*. Annu. Rev. Entomol., Vol. 43, 1998, p.545-569.
- [2] T.S. Dhadialla, A. Retnakaran, G. Smagghe, *Insect growth and development disrupting insecticides*. In: Gilbert, L.I., Kostas, I. and Gill, S. [Eds]

- Comprehensive Insect Molecular Science. Vol. 6. Pergamon Press, New York, NY. 2005, p. 55-116.
- [3] K.A. El-Sayed, D.C. Dunbar, T.L. Perry, S.P. Wilkins, M.T. Hamann, *Marine natural products as phototype insecticidal agents*. J. Agri. Food Chem., Vol. 45, 1997, p.2735-2739.
- [4] A.C. Grosscurt, *Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and an evaluation of its practical possibilities*. Pestic. Sci., Vol. 9, 1978, p.373-386.
- [5] P. Scheltes, T.W. Hoffman, A.C. Grosscurt., *Field Data on pH. 70-23, a novel benzoylphenyl urea controlling mills and insects in a range of crops. Brught crop protection conference*. Pests and diseases, 1988, p.559-566.
- [6] J. Sheets, L.L. Karr, J.E. Dripps, *Kinetics and uptake, clearance, transfer and metabolism of hexaflumuron by eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae)*. J. Econ. Entomol., Vol. 93, 2000, p.871-877.
- [7] C.D.S. Tomlin, (Ed.) *The pesticide manual*, 12th edn. British Crop Protection Council Publications, 2000.
- [8] I. Ishaaya, *Biochemical processes related to insecticide actions: an overview*. In: Ishaaya, I., (Ed), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*. Springer, Berlin, 2001, p.1-6.
- [9] R. Mulder, M.J. Gijswijt, *The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition*. Pestic. Sci., Vol. 4, 1973, P.737-745.
- [10] A. Retnakaran, G. Granett, T. Ennis, *Insect growth regulators*. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ed. GA Kerkut, LI Gilbert, Vol.12, 1985, P.529-601, Oxford: Pergamon.
- [11] N. Soltani, S. Chebira, J.P. Delbecque, J. Delachambre, *Biological activity of flucycloxuron, a novel benzoylphenylurea derivative, on Tenebrio molito: comparison with diflubenzuron and triflumuron*. Experientia, Vol. 49(12), 1993, p.1088-1091.
- [12] N. Soltani, N. Soltani-Mazouni, J. Delachambre, *Evaluation of triflumuron, a benzoylphenylurea derivative, on Tenebrio molitor pupae (Col., Tenebrionidae: effect on cuticle*. J. Appl. Ent., Vol. 120, 1996, p.627-629.
- [13] I. Ishaaya, *Benzoylphenyl-ureas and other selective control agent, mechanism and application* In: J.E. Cassida (Ed) *Pesticid and alternatives: 1990*, 365-376. Elsevier Sciences, Amsterdam.
- [14] G.E. Abo-Elghar, P. Fujiyoshi, F. Matsumura, *Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in Drosophila melanogaster and Blattella germanica*. Insect Biochem. Molecular Biol., Vol. 34, 2004, P.743-752
- [15] J.L. Vaughn, R.H. Goodwin, G.J. Tompkins, P. McCawly, *Establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera-Noctuidae)*. In *Vitro*, Vol. 13, 1977, p.213-217.
- [16] D.E. Lynn, H. Oberlander, *The establishment of cell lines from imaginal wing discs of Spodoptera frugiperda and Plodia interpunctella*. J Insect Physiol., Vol. 29, 1983, p.591-596.
- [17] I. Schneider, *Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, Vol. 27, 1972, p.353-365.
- [18] H. Tamura, M. Eto, *Studies on insect growth regulating substances with insect cell cultures*. Agric. Biol. Chem., Vol. 49, 1985, p.3247-3253.
- [19] H. Oberlander, C.E. Leach, E. Shaaya, *Juvenile hormone and juvenile hormone mimics inhibit proliferation in a lepidopteran imaginal disc cell line*. J.

Insect Physiol., Vol. 46, 2000, p.259-265.

[20] F. Denizoit, R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival*. J. Immunol. Methods, Vol. 89, 1986, p.271-277.

[21] L. Decombel, G. Smagghe, L. Tirry, *Action of major insecticide groups on insect cell lines of the beet armyworm, Spodoptera exigua, compared with larvicidal toxicity*. In vitro Cell. Dev. Biol., Vol. 40, 2004, p.43-51.

[22] M.V. Berrige, A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide (MTT: subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch. Biochem. Biophys., Vol. 303, 1993, p.474-478.

[23] D.E. Lynn, *Novel techniques to establish new insect cell lines*. In vitro Cell. Dev. Bio., Vol. 37, 2001, p.319-321.

[24] R. Lafont, J.L. Connat, J.P. Delbecque, P. Porcheron, C. Dauphin-Villemant, M. Garcia, *Comparative studies on ecdysteroids*. In Ohnishi, E., Tokoashi, S.Y., Sonobe, H. (Eds.), Recent advances in Insect Biochemistry and Molecular Biology. The University of Nagoya Press, Nagoya, 1996, p. 45-91.

[25] L. Dinan, M. Spindler-Barth, K.D. Spindler, *Insect cell lines as tools for studying ecdysteroid action*. Invert. Reprod. Dev., Vol. 18, 1990, p.43-54.

[26] N. Rehim, N. Soltani, *Laboratory evolution of alsystine. A chitin synthesis inhibitor agonist Culex pipiens L. (Diptera: Culicidae). Effects on development and cuticle secretion*. J. Appl. Ent., Vol. 123, 1999, p.437-441.

[27] N. Soltani-Mazouni, N. Soltani, *Effet du diflubenzuron en traitement in vivo et in vitro sur la morphométrie de l'ovaire de Tenebrio molitor*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., Vol. 65/2a, 1995, p.453-460.

[28] N. Soltani, N. Soltani-Mazouni, *Oogenesis in mealworms: cell density of germarium, thickness of chorion and ecdysteroid production. Effects of regulators*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., Vol. 62/2b, 1997, p.565-571.

[29] S. Chebira, N. Soltani, S. muylle, G. Smagghe, *Uptake distribution of three insect growth regulators – diflubenzuron, flucycloxuron and halofenozide – in pupae and adults of Tenebrio molitor*. Phytoparasitica, Vol. 34 (2), 2006, p.187-196.

[30] H. Berghiche, G. Smagghe, S. Van De Velde, N. Soltani, *In vitro cultures of pupal integumental explants to bioassay insect growth regulators with ecdystéroïd activity for ecdysteroid amounts and cuticle secretion*. African Journal of Agricultural Research, Vol. 2 (5), 2007, p. 208-213.

[31] P. Porcheron, H. Oberlander, C.E. Leach, *Ecdysteroid regulation of amino sugar uptake in a lepidopteran cell line derived from imaginal discs*. Arch. Insect Biochem. Physiol., Vol. 7, 1988, p.145-155.

[32] H. Oberlander, D.L. Silhacek, C.E. Leach, I. Ishaaya, E. Shaaya, *Benzoylphenylureas inhibit chitin synthesis without interfering with amino sugar uptake in imaginal wing discs of Plodia interpunctella*. Arch. Insect Biochem. Physiol., Vol. 18, 1991, p.219-227.

[33] Y. Nakagawa, F. Matsumura, Y. Hashino, *Effect of diflubenzuron on incorporation of [³H]-N-acetylglucosamine ([³H]-NAGA) into chitin in the intact integument from the newly molted American cockroach, Periplaneta americana*. Comp Biochem Physiol, Vol. 106C, 1993, p.711-715.

[34] P.J. Hatt, C. Liebon, M. Morinière, H. Oberlander, P. Porcheron, *Activity of insulin growth factors and shrimp neurosecretory organ extracts on a lepidopteran cell line*. Arch. Insect

Biochem. Physiol. Vol. 34, 1997, p.313-328.

[35] P. Cassier, P. Serrant, R. Garcia, N. Coudouel, M. André, D. Guillaumin, P.

Porcheron, H. Oberlander, *Morphological and cytochemical studies of the effects of ecdysteroids in a lepidopteran cell line (IAL-PID2)*. Cell Tissue Res. Vol. 265, 1991, p.361-369.