

## Profil des ecdystéroïdes durant la métamorphose et rapport avec le cycle cuticulaire chez *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae)

Samira Yezli-Touiker et Nadia Soltani-Mazouni

Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar, BP 12, Annaba 23000, Algérie.

Accepté le 28/07/2010

### ملخص

*Ephestia kuehniella* زيلر تسمى عثة الطحين تسبب أضرار أساسا إلى مخزون الطحين والسميد. وهي أيضا مصدرا للحساسية تسبب الربو والتهاب الأنف. هذه الدراسة هي نهج الفسيولوجية التي تهدف إلى تحديد توقيت إفراز الجليد وارتباطه مع إفراز هرمون الانسلاخ خلال تطور العذارى الإناث. هرمون الانسلاخ يستخرج من الجسم كله وتحسب كميته بشكل فردي بطريقة المعايرة الانزيمومناعية باستخدام أجسام مضادة البيروكسيداز باعتباره اثر TMB كاشف. سمك القشرة القديمة والجديدة حددت على مقاطع نصف رقيقة للجليد المعدة بطريقة المجهر الإلكتروني. مستويات هرمون الانسلاخ خلال الأيام الخمسة الأولى من طور الانسلاخ العذري يظهر بتسجيله ذروة واحدة في اليوم الخامس. سمك القشرة تزداد مع التقدم في السن، وتبلغ ذروتها في اليوم الثالث من طور الحضانة والذي يتزامن مع apolyse. إفراز الجليد الجديد يكون مباشرة بعد apolyse ويبلغ الحد الأقصى ( $7,27 \pm 0,05$ ) في اليوم التاسع من طور العذارى.

**الكلمات المفتاحية:** *Ephestia kuehniella*; هرمونات؛ الجليد؛ المجهر الإلكتروني.

### Résumé

*Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) appelée communément pyrale de la farine est un ravageur majeur des denrées stockées. Cette espèce est aussi une source allergénique qui provoque l'asthme et des rhinites. La présente étude est une approche physiologique qui vise à déterminer la chronologie de la sécrétion de la cuticule et ses corrélations avec le profil de l'hormone de mue au cours du développement des chrysalides femelles. Les épaisseurs de l'ancienne et de la nouvelle cuticule ont été déterminées sur des coupes semi-fines du tégument préparées selon la technique conventionnelle de microscopie électronique à transmission. Le dosage de l'hormone de mue (ecdystéroïdes) a été réalisé individuellement dans les extraits de corps entier de chrysalides femelles avec une méthode enzymo-immunologique utilisant un anticorps polyclonal de lapin, un traceur la peroxydase et un révélateur la tetraméthyl benzidine. L'évolution des taux hormonaux au cours de la métamorphose montre un seul pic localisé à cinq jours. L'épaisseur de la cuticule nymphale présente un maximum au troisième jour de la vie nymphale. La nouvelle cuticule adulte est sécrétée immédiatement après l'apolyse; elle mesure  $7,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$  à la veille de l'exuviation adulte (9 jours).

**Mots clés :** *Ephestia kuehniella* ; Métamorphose ; Hormones ; Ecdystéroïdes ; Cuticule.

### Abstract

*Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) commonly called Mediterranean flour moth causes damage mainly to stocks of flour and semolina. This study is a physiological approach and aimed the determination of the cuticle cycle in order to establish temporal correlations with the molting hormone level during the development of female pupae. Molting hormone was extracted from whole body and measured by an enzyme immunoassay using a rabbit polyclonal antibody, peroxydase as a tracer, and tetramethyl benzydine as reagent. The thickness of both old and new cuticles was determined on semi-thin sections of integument prepared following the conventional technique of transmission electron microscopy. The hormonal amounts present a single peak that occurs at day 5 following pupal ecdysis. The thickness of the pupal cuticle increased during the pupal development reaching a maximum at day 3. The new adult cuticle is secreted immediately after the apolysis (day 3) and reached a thickness of  $7.27 \pm 0.05 \mu\text{m}$  at the adult ecdysis (day 9). The peak of ecdysteroid content coincides with the apolysis and could be related with initiation of the new cuticle.

Auteur correspondant: nadia\_mazouni@yahoo.fr (Nadia Soltani-Mazouni)

**Key words:** *Ephestia kuehniella*; Metamorphosis; Hormone; Ecdysteroids; Cuticle.

## 1. INTRODUCTION

Les processus de développement et de reproduction chez les insectes sont contrôlés par deux principales hormones : l'hormone de mue (ecdystéroïdes) qui est un stéroïde polyhydroxylé responsable du déclenchement de la mue, et l'hormone juvénile, un sesquiterpène, qui détermine la nature de la mue [1-6]. La cuticule et son contrôle endocrinologique constituent des cibles potentielles spécifiques recherchées pour le développement de nouvelles molécules pesticides dans la lutte contre les ravageurs des cultures [7]. *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae) est un insecte ravageur majeur des denrées stockées. C'est un modèle biologique utilisé dans notre laboratoire et qui a fait l'objet de plusieurs travaux portant sur l'impact d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le flucycloxuron, sur le développement et la sécrétion cuticulaire [8], et sur le potentiel reproducteur et l'épaisseur du chorion [9]. Les mimétiques de l'hormone de mue constitue une nouvelle classe d'insecticides sélectifs provoquant des mues létales précoces [10]. Ces molécules ont un grand potentiel d'utilisation dans la lutte contre les ravageurs des denrées stockées particulièrement contre les Lépidoptères [11]. Récemment, nous avons montré chez *E. kuehniella* que le tebufenozide est le plus efficace parmi les trois agonistes des ecdystéroïdes testés [12] et qu'il affecte le potentiel reproducteur [13]. Nos connaissances sur l'endocrinologie de cette espèce sont toutefois insuffisantes. C'est pourquoi, la présente étude vise à déterminer les taux des ecdystéroïdes dans les extraits de corps entier des chrysalides femelles et d'établir d'éventuelles corrélations entre les taux hormonaux et la sécrétion cuticulaire au cours de la métamorphose chez *E. kuehniella*. Les résultats acquis serviront de base à des expérimentations

sur les nouveaux régulateurs de croissance des insectes agissant sur les principales hormones de développement [6, 7, 11].

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Matériel biologique

*Ephestia kuehniella* est un Lépidoptère ravageur des denrées stockées qui provoque des dégâts principalement aux stocks de farine et de blé. C'est un modèle biologique commode de laboratoire. L'élevage se fait dans des bocaux contenant de la farine et fermés avec du tulle. Les conditions optimales de développement sont une température de 27 °C et une humidité relative de 80 %.

### 2.2 Dosage immuno-enzymatique des ecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes ont été extraits du corps entier et dosés par une méthode immuno-enzymatique (EIA) [14], utilisée précédemment [15]. Brièvement, le dosage est réalisé avec un anticorps polyclonal de lapin, un conjugué de la 20-hydroxyecdysone (20E) couplé à la peroxydase comme traceur et la tétraméthylbenzidine comme révélateur. L'anticorps utilisé a 6 fois plus d'affinité pour l'ecdysone que la 20E [16]. La 20E étant généralement l'hormone principale, les résultats sont exprimés en pg équivalent 20E/mg de tissu corporel. L'anticorps et le traceur enzymatique ont été aimablement fournis par Dr. J.P. Delbecq (Université de Bordeaux I, France).

### 2.3 Mensuration des épaisseurs des cuticules

Les 4 premiers sternites abdominaux sont prélevés des chrysalides âgées de 1,

3, 5, 7 et 9 jours. Ils sont fixés dans un mélange glutaraldéhyde-paraformaldéhyde dans du tampon cacodylate [17] modifié [18] puis déshydraté et inclus dans un mélange Epon-Araldite [19]. Les coupes semi-fines ont été effectuées à l’ultramicrotome LKB V et colorées par le bleu de toluidine.

**2.4 Analyse statistique**

Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l’écart-type (m±s). Les analyses statistiques ont été réalisées à l’aide du logiciel MINITAB (Version 13.31, PA State College, USA). Les valeurs moyennes ont été comparées deux à deux avec le test *t* de Student.

**3. RESULTATS**

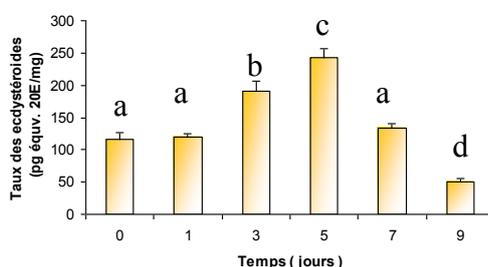
**3.1 Variation des taux d’ecdystéroïdes durant la métamorphose**

Dans nos conditions expérimentales de température et d’humidité constantes, la durée du développement nymphal est

d’environ 9 jours. Les ecdystéroïdes ont été déterminés par EIA dans le corps entier des chrysalides femelles à différents âges au cours du développement nymphal. Ils sont exprimés en pg d’équivalent 20-hydroxyecdysone par mg de poids frais corporel. La variation du poids des chrysalides femelles est donnée dans le tableau 1. Le poids des chrysalides femelles diminue légèrement et de manière significative au cours de la métamorphose. Les taux hormonaux enregistrés à 0 et 1 jour ne sont pas significativement différents ( $P > 0,05$ ) ; ils augmentent significativement ( $P < 0,05$ ) dès le troisième jour de la vie nymphale pour atteindre un pic (250 pg équiv. 20E/mg) localisé à cinq jours (Fig. 1). Une diminution significative ( $P < 0,05$ ) est ensuite observée dès le septième jour pour atteindre un taux seulement de 50 pg/mg à la veille de l’exuviation adulte (9 jours). Les valeurs observées à 3, 5, 6, 7 et 9 jours sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes entre elles. Enfin, les exuviations nymphale et adulte se font à des taux relativement bas.

**Tableau 1.** Evolution du poids (mg) des chrysalides femelles d’*E. kuehniella* au cours du temps (jours) durant la métamorphose ( $m \pm s$ ,  $n=6$ ). Les valeurs affectées d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ).

Temps (jours)	0	1	3	5	7	9
Poids (mg)	15,1±0,4a	14,2±0,3b	13,4±0,1c	13,3±0,1c	12,3±0,2d	11,6±0,1e



**Figure 1 :** Evolution du taux des ecdystéroïdes (pg équiv.20E/mg tissu) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d’*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ,  $n= 6$ ). Les valeurs affectées d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ).

**3.2 Sécrétion cuticulaire durant la métamorphose**

La cinétique et la séquence des principaux évènements épidermo-

cuticulaire durant la métamorphose ont été envisagées afin d'établir des corrélations avec les taux hormonaux. Les épaisseurs de la cuticule totale nymphale (ancienne cuticule) et de la nouvelle (cuticule pré-exuviale adulte) ont été estimées sur des coupes semi-fines du tégument périphérique à différents âges au cours de la métamorphose. Les résultats sont représentés dans les tableaux 2 et 3. L'épaisseur de la cuticule nymphale augmente significativement ( $p < 0,05$ ) avec l'âge pour atteindre un maximum de

$13,83 \pm 0,1 \mu\text{m}$  au troisième jour et décroît significativement ( $p < 0,05$ ) par la suite en raison de la digestion des couches profondes de l'ancienne cuticule (Tab. 2). La nouvelle cuticule ou cuticule pré-exuviale adulte est secrétée immédiatement après l'apolyse (troisième jour); les épaisseurs augmentent progressivement et de manière significative ( $P < 0,05$ ) pour atteindre un maximum de  $7,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$  à la veille de l'exuviation adulte (9 jours) (Tab. 3).

**Tableau 2.** Evolution de l'épaisseur ( $\mu\text{m}$ ) de la cuticule totale nymphale au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ,  $n = 6$ ). Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ).

Temps (jours)	0	1	3	5	7	9
Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )	$7,80 \pm 0,05\text{a}$	$11,00 \pm 0,1\text{b}$	$13,83 \pm 0,1\text{c}$	$12,27 \pm 0,07\text{d}$	$10,90 \pm 0,2\text{b}$	$8,03 \pm 0,05\text{e}$

**Tableau 3.** Evolution de l'épaisseur ( $\mu\text{m}$ ) de la nouvelle cuticule (adulte) au cours du temps (jours) durant la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* ( $m \pm s$ ,  $n = 6$ ). Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ).

Temps (jours)	3	5	7	9
Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )	$0,00 \pm 0,00 \text{a}$	$5,05 \pm 0,07 \text{b}$	$6,10 \pm 0,05 \text{c}$	$7,27 \pm 0,02 \text{d}$

#### 4. DISCUSSION

Les ecdystéroïdes ont été impliqués par différents auteurs et chez plusieurs espèces d'insectes dans le contrôle d'un grand nombre de mécanismes physiologiques dont le principal est le phénomène de mue et de métamorphose [2, 3, 7]. Chez les insectes, les ecdystéroïdes sont formés à partir des stérols alimentaires qui seront transformés après ingestion en cholestérol. Ce dernier subit diverses oxydations et hydroxylations pour fournir l'ecdysone qui sera à son tour convertie dans les tissus périphériques en 20E par l'enzyme ecdysone-20-monooxygénase [20]. Les

taux des ecdystéroïdes et de l'hormone juvénile fluctuent tout au long du développement des insectes. Les pics hormonaux observés sont associés à des événements importants comme notamment les mues, la métamorphose ou la reproduction [20-22]. Selon les espèces un ou deux pic sont détectés durant la métamorphose: *Pieris brassicae* [23], *Leptinotarsa decemlineata* [24], *Heliothis zea* [25] et *Tenebrio molitor* [26] présentent un pic, tandis que *Galleria mellonella* [27] et *Cydia pomonella* [28] ont en deux pics.

Du fait de sa structure, sa composition

chimique et son renouvellement périodique contrôlé par des hormones, la cuticule est une caractéristique essentielle des insectes. Il est généralement admis que le processus de mue est initié par une augmentation des taux de 20E et se termine par leur chute et la sécrétion de l'hormone d'éclosion [6]. Le dosage des ecdystéroïdes au cours du développement nymphal chez les chrysalides d'*E. kuehniella* révèle la présence d'un seul pic qui coïncide avec l'apolyse et serait responsable de l'initiation de la sécrétion de la nouvelle cuticule, c'est à dire la cuticule pré-exuviale adulte. L'exuviation adulte s'effectue sous des taux d'ecdystéroïdes relativement bas confirmant les travaux antérieurs [6]. Le deuxième pic d'ecdystéroïdes, détecté au cours de la métamorphose chez certaines espèces [27, 28], est en rapport avec le développement ovarien [22, 28, 29]. Chez les chrysalides femelles de *C. pomonella* le deuxième pic est étroitement corrélé avec l'évolution de la taille de l'ovocyte basal et de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire chez *C. pomonella* [28]. Enfin, les valeurs observées chez *E. kuehniella* sont comparables aux taux hormonaux signalés chez d'autres espèces de Lépidoptères [30].

En conclusion, les variations des taux d'ecdystéroïdes au cours de la métamorphose des chrysalides femelles d'*E. kuehniella* sont avec les événements épidermo-cuticulaires. L'augmentation des taux serait responsable de l'induction d'un nouveau cycle cuticulaire. La sécrétion de la nouvelle cuticule intervient immédiatement après l'apolyse confirmant ainsi les travaux antérieurs faits sur d'autres espèces.

## Références

[1] L.M. Riddiford, *Cellular and molecular action of juvenile hormone: I. General consideration and premetamorphic actions*, Adv. Insect. Physiol., Vol. 24, 1994, p. 213-274.

[2] H.H. Rees, *Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function*, Eur. J. Ent., Vol. 92, 1995, p.9-39.

[3] G. Gäde, K.H. Hoffman et J.H. Spring, *Hormonal regulation in insects: Facts, Gaps and Future directions*, J. Physiol. Rev., Vol. 77, Issue 4, 1997, p.263-1032.

[4] G. Gäde et K.H. Hoffmann, *Neuropeptides regulating development and reproduction in insects*, Physiological Entomology, Vol. 30, 2005, p.103-121.

[5] M.W. Gilbert, R. Rybczynski et J.T., *Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway*. Annu. Rev. Entomol., Vol. 47,2002, p.883-916.

[6] T.S. Dhadialla, A. Retnakaran et G. Smagghe, *Insect growth and development disrupting insecticides*, Comprehensive Insect Molecular Science (L.I. Gilbert, I. Kostas, and S. Gill, Eds), Vol. 6, Pergamon Press, New York, N.Y., 2005, p. 55-116.

[7] L. Dinan, *Ecdysteroid structure and hormonal activity*, Ecdysone: From chemistry to mode of action (J. Koolman Ed.), Thieme Stuttgart, 1989, p. 345-354.

[8] F. Bendjedou, Z. Bouslama, S. Chebira et N. Soltani, *Effets of flucycloxuron, a benzoylphenylurea, on growth, development and cuticle secretion, Ephestia kuehniella*. Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent, Vol. 63, Issue 2b, 1998, p. 575-580.

[9] M. Hami, F. Taïbi et N. Soltani-Mazouni, *Effects of flucycloxuron, a chitin synthesis inhibitor, on reproductive events and thickness of chorion in meal worms*, Comm. Appl. Biol. Sci., Vol. 69, Issue 3, 2004, p.249-258.

[10] K.D. Wing, *RH- 5849, a non steroidal ecdysone agonist: effects on a Drosophila cell line*, Sciences, Vo241,

- 1988, p.464-469.
- [11] T.S. Dhadialla et R. Ross, *Bisacylhydrazines: novel chemistry for insect control*, Modern crop Protection Compounds, Ed. By Kramer W. and Schirmer U., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007, p. 773-796.
- [12] M. Hami, F. Taibi, G. Smagghe et N. Soltani-Mazouni, *Comparative toxicity of three ecdysteroid agonist insecticides against the Mediterranean flour moth*, Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University, Belgium, Vol. 70, Issue 4, 2005, p.767-772.
- [13] M.E.H. Khebbeb, R. Gaouaoui et F. Bendjeddou, *Tebufenozide effects on the reproductive potential of the Mediterranean flour moth, Ephestia kuehniella*. Afr. J. Biotech., Vol. 7, Issue 8, 2008, p.1166-1170.
- [14] P. Porcheron, M. Morinière, J. Grassi et P. Pradelles, *Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroid using acetylcholinesterase as label*, Insect Biochem., Vol. 19, 1989, p.117-122.
- [15] N. Soltani, N. Aribi, H. Berghiche, S. Lakbar et G. Smagghe, *Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion, Tenebrio molitor pupae in vivo and in vitro*. Pestic. Biochem. Physiol., Vol.72, 2002, p.83-90.
- [16] M.L. De Reggi, N. Pitoizet, B. Gharib et J.P. Delbecque, *New enzyme immunoassay for ecdysteroids using peroxidase enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies*, Xth ecdysone workshop, Liverpool, 1992, 6-7th April, Abstract, p.9.
- [17] M.J. Karnovsky, *A formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolarity for use electron microscopy*, J. Cell Biol., Vol. 27, 1965, p.1374.
- [18] D.S. Friend et H.E. Farquhar, *Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens*, J.Cell.Biol., Vol. 35, 1967, p.357-376.
- [19] W.A. Anderson et R.A. Ellis, *Ultrastructure of Trypanosoma lewisi: flagellum microtubules and the kinetoplast*, J. Protozool., Vol. 12, 1965, p.483-499.
- [20] P. Cassier, *L'expression de deux milieux : le passage de la vie imaginaire chez les insectes. Le contrôle endocrine*, Bull. Soc. Zool. Fr., Vol. 123, Issue 2, 1996, p.187-197.
- [21] R. Lafont, C. Dauphin-Villemant, J.T. Warren et H. Rees, *Ecdysteroid chemistry and biochemistry*, L.I. Gilbert, K. Iatrou & S.K. Gill (eds), Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 3, Elsevier, Oxford, 2005, p.125-195.
- [22] H.H. Hagedorn, *The role of ecdysteroids in reproduction*, G.A. Kerkut. L.I. Gilbert. (eds), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Pergamon Press, Oxford, 1984, p.205-262.
- [23] R. Lafont, J.P. Delbecque, L. De Hys, B. Mauchamp et J.L. Pennetier, *Etude du taux d'ecdysone dans l'hémolymphe de Pieris brassicae (Lepidoptera) au cours du stade nymphal*, C. R. Acad. Sci., Vol. 279, Issue 25, 1974, p.1911-1914.
- [24] T. H. Hsiao, C. Hsiao et J. De Wilde, *Molting hormone titer change and their significance during development of the Colorado beetle, Leptinotarsa decemlineata*. J. Insect Physiol., Vol. 22, 1975, p.1257-1261.
- [25] G.M. Holman et R.W. Meola, *A high-performance liquid chromatography method for the purification and analysis of insect ecdysones: application to measurement of ecdysone titers during pupal-adult development of Heliothis zea*,

J. Insect Physiol., Vol. 8, 1978, p.275-278.

[26] J.P. Delbecque, M. Hirn, J. Delachambre et M. De Reggi, *Cuticular cycle and molting hormone levels during the metamorphosis of Tenebrio molitor*, (Insecta, Coleoptera). Dev. Biol., Vol. 64, 1978, p.11-30.

[27] W.E. Bollenbacher, H. Zvenko, A.K. Kumaran et L.I. Gilbert, *Changes in ecdysone content during post-embryonic development of the wax moth Galleria mellonella : the role of ovary*, Gen. Comp. Endocrinol., Vol. 34, 1978, p.169-179.

[28] N. Soltani, *Dosage qualitatif et quantitatif des ecdystéroïdes chez les chrysalides mâles femelles de Cydia*

*pomonella L. (Lepidoptera, Tortricidae)*, Ann. Inst. Nat. Agron. Alger, 1986, Vol. 10, Issue 1, p.45-58.

[29] N. Soltani-Mazouni, M.E.H. Khebbeb et N. Soltani, *Production d'ecdystéroïdes ovariens durant la maturation des oocytes chez Tenebrio molitor*, Ann. Soc. Entomol. France, Vol. 35, 1999, p.82-86.

[30] F. Sehnal, P. Maroy et J. Mala, *Regulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in lepidopterous larvae and pupae*, J. Insect Physiol., Vol. 27, 1981, p.535-544.