

تبعثنا أطار قميدنا أيرنازجا أيروهمجدا  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
بناعلنا ميلعتنا أرازوي ملعلنا ثحبنا و  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - شارحلا - رنازجا  
Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El – Harrach – Alger

THESE DE DOCTORAT

D'ETAT

EN SCIENCES AGRONOMIQUES

THEME

**Métabolisme des Vitellines  
au cours du développement embryonnaire  
de *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptère)**

Présentée par :

**Nabil BERTELLA**

**Soutenue le : 14/12/ 2010**

**Devant le jury composé de :**

M. Prof. DOUMANDJI SE.  
M<sup>me</sup> Prof. DOUMANDJI-MITICHE B.  
M. Dr. MOKABLI A.  
M. Prof. HARRAT A.

Président  
Promoteur  
Examineur  
Examineur

## *AVANT PROPOS*

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui m'ont aidé et encouragé au cours de ces années de recherches.

Ce travail a été réalisé du côté français sous la direction du défunt BREUZET Michel. Sa collaboration, sa disponibilité ses conseils ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Je lui en suis très redevable et je n'oublierai pas sa sympathie et son dévouement.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à mes professeurs Mme DOUMANDJI-MITICHE Bahia et M. DOUMANDJI Salah Eddine pour m'avoir constamment incité, pour la confiance qu'ils m'ont accordé, pour leur aide et leur soutien qu'ils n'ont jamais cessé de m'apporter. Qu'ils veuillent bien accepter l'hommage respectueux et sincère de ma profonde gratitude.

J'ai trouvé un accueil chaleureux auprès de Madame le professeur J. RACCAUD SCOELLER, Directeur du laboratoire de physiologie des Insectes, Jussieu, Paris VI. Elle m'a accueilli et aidé dans la réalisation de ce travail. Je tiens à lui exprimer ici mes vifs remerciements.

Je suis heureux d'exprimer tous mes remerciements à madame A. KARLINSKY ; Sa collaboration, sa disponibilité, ses conseils éclairés ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements vont également à monsieur M. MOKABLI qui à bien voulu accepter de siéger à ce jury.

Je suis heureux de compter au membre du jury Monsieur A. HARRAT du département de biologie de l'Université de Constantine. Sa présence au laboratoire de physiologie des Insectes à Paris VI m'a souvent permis d'appréhender les problèmes physiologiques auxquels j'étais confronté.

J'exprime ma sincère amitié à tous mes collègues et enseignants du laboratoire de Physiologie des Insectes dont la gentillesse et la sympathie ont facilité mon intégration au sein de l'équipe.

Mes remerciements chaleureux vont également à madame G. TOTI et mademoiselle F. HADDAD qui ont la charge des élevages des Insectes et m'ont rendu de grands services.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I. MATERIEL BIOLOGIQUE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES</b> ...	4
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE</b> .....	4
A. Condition d'élevages.....	4
B. Données ecophysiologiques.....	4
1. Cycle reproducteur.....	6
2. Structure de l'ovaire.....	8
3. Fonctionnement ovarien.....	8
3.1. Synthèse et incorporation de protéines.....	10
3.1.1. Synthèse protéique endogène.....	10
3.1.2. Incorporation de protéines exogènes.....	10
4. Ponte et soins aux œufs.....	10
5. Régulation du cycle reproducteur.....	11
<b>II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES</b> .....	11
A. Interventions microchirurgicales.....	11
B. Technique de récupération des œufs.....	13
C. Montage in-toto .....	13
D. Techniques microscopiques.....	13
1. Microscopie photonique.....	13
1.1. Fixation des œufs.....	13
1.2. Coupes histologiques.....	14
2. Microscopie électronique.....	14
1.1. Coupes semi-fines.....	14
1.2. Coupes ultra-fines.....	15

A.	Analyses electrophoretiques.....	15
B.	Incorporation de traceur radioactif.....	15
C.	Analyse en scintillation liquide.....	16
D.	Dosages des protéines.....	16
E.	Analyse des lipides.....	17
	1. Protocole d'extraction des lipides totaux.....	17
	2. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	17
	3. Méthylation.....	18
	4. Chromatographie en phase gazeuse.....	18
F.	Analyse d'activité lipasique.....	19
G.	Dosages enzymo-immunologiques des ecdystéroïdes.....	19
H.	Analyse des ecdystéroïdes.....	20
	1. Protocole d'extraction.....	20
	2. Dosages enzymo-immunologique (EIA) .....	21
	3. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	22
	4. Hydrolyse enzymatique.....	22
<b>Chapitre II.</b>	<b>DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.....</b>	<b>23</b>
<b>I.</b>	<b>Choix du repère chronologique.....</b>	<b>23</b>
<b>II.</b>	<b>Données générale sur le développement embryonnaire de <i>Labidura riparia</i></b>	
A.	Multiplication nucléaire intravitelline.....	25
B.	Colonisation du periplasme par les énergides et formation du blastoderme...	27
C.	Edification de l'ébauche embryonnaire.....	29
D.	Allongement et segmentation de la bandelette embryonnaire.....	32
E.	Fermeture dorsale et achèvement de l'organogenèse.....	33
<b>III.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>40</b>

<b>Chapitre III. DEGRADATION ET UTILISATION DU VITELLUS AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.....</b>	<b>43</b>
<b>I. ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU TISSU ADIPEUX, DE L'HEMOLYMPHE ET DE L'OVAIRE.....</b>	<b>44</b>
<b>A. Vitellines et vitellogenines.....</b>	<b>44</b>
- Electrophorèse en PAGE-SDS.....	44
<b>B. Incorporation de Méthionine <sup>35</sup>S, <i>in vivo</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>II. Evolution des protéines des œufs au cours du développement embryonnaire</b>	
<b>A. Evolution à partir d'analyse electrophoretiques.....</b>	<b>50</b>
<b>B. Evolution à partir d'analyses par la méthode Bradford.....</b>	<b>52</b>
<b>III. Evolution du système vitellin.....</b>	<b>53</b>
<b>A. Formation des vitellophages.....</b>	<b>53</b>
<b>B. Segmentation vitelline.....</b>	<b>55</b>
<b>C. Dégradation des granules protéiques.....</b>	<b>55</b>
<b>D. Dégradation des granules lipidiques.....</b>	<b>57</b>
<b>VI. Activité lipasique.....</b>	<b>59</b>
<b>A. Mise au point des différentes phases de la technique.....</b>	<b>59</b>
<b>B. Evolution de l'activité lipasique.....</b>	<b>60</b>
<b>V. Discussion.....</b>	<b>62</b>
<b>Chapitre IV. CUTICULOGENESE ET EVOLUTION DES ECDYSTEROÏDES....</b>	<b>65</b>
<b>I. Cuticulogenèse embryonnaire.....</b>	<b>66</b>
<b>II. Evolution des taux d'ecdystéroïdes.....</b>	<b>70</b>
<b>A. Les ecdystéroïdes ovariens.....</b>	<b>70</b>
<b>B. Les ecdystéroïdes chez les embryons.....</b>	<b>72</b>
<b>III. Discussion.....</b>	<b>73</b>
<b>CHAPITRE V. Evolution des lipides au cours du développement embryonnaire et régulation neuroendocrine .....</b>	<b>75</b>

## **I. Evolution des lipides au cours du développement des œufs de femelle normale**

<b>A. Lipides totaux.....</b>	<b>78</b>
1. Evolution quantitative.....	78
2. Composition en acides gras.....	79
<b>B. Évolution des différentes classes lipidiques.....</b>	<b>80</b>
1. Évolution quantitative.....	81
2. Composition en acides gras.....	83
. Triacylglycérols.....	83
. Diacylglycérols.....	84
. Phospholipides.....	87
<b>I. DISCUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>II. Conséquence des modifications hormonales.....</b>	<b>93</b>
<b>A. Effet de la Cautérisation de <i>pars lateralis</i> sur les lipides des œufs.....</b>	<b>93</b>
1. Lipides Totaux.....	94
1.1. Variations quantitatives.....	94
1.2. Composition en acides gras.....	94
2. Différentes classes lipidiques.....	96
2.1. Variations quantitatives.....	96
2.2. Composition en acides gras.....	96
. Triacylglycérols.....	96
. Diacylglycérols.....	97
. Phospholipides.....	97
<b>III. Discussion.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>109</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>116</b>

Publication : Cuticulogenèse et évolution des ecdystéroïdes chez l'embryon de *Labidura riparia* (Insecte Dermaptères). C.R. Acad. Sci. Paris, 1995 ; 318 :579-84.

## INTRODUCTION

L'un des buts essentiels d'un Insecte parvenu au stade adulte, est d'assurer la pérennité de l'espèce. De nombreuses modalités sont ainsi adoptées par les femelles d'Insectes, activités, comportement reproducteur et également dans les mécanismes de la physiologie de leur reproduction. Dans une grande diversité on retrouve cependant chez les Insectes une relative uniformité dans le processus mis en œuvre pour parvenir à la production d'œufs générateur de nouveau individus.

Chez les femelles d'Insectes, le tissu adipeux constitue le principal organe impliqué dans la production des protéines vitellogènes. Ces protéines, les vitellogénines souvent spécifiques de la femelle en vitellogenèse sont libérées dans l'hémolymphe, les ovocytes au stade maturation incorporent puis accumulent ces vitellogénines. Elles sont alors désignées par le terme vitelline. Associées à d'autres métabolites, elles constituent des éléments utilisables par le futur embryon pour son développement.

L'un des principaux précurseurs des protéines de l'œuf est la vitellogénine, généralement de nature phospholipo-glucoprotéique. Elle a été mise en évidence pour la première fois chez les femelles du papillon *Hylophora cecropia* (Telfer, 1954). Son existence est démontrée après chez toutes les espèces étudiées (Engelmann, 1979). L'analyse de la synthèse des vitellogénines montre qu'elles sont souvent élaborées chez les femelles sous la forme d'un précurseur de haut poids moléculaire qui subit ensuite un clivage en deux ou plusieurs sous unités (Chen et al., 1978 ; Della-crozza et Englemann, 1984, Bose et Raikhel, 1988). Elles sont ensuite libérées dans l'hémolymphe où elles sont prélevées sélectivement par les ovocytes pendant la vitellogenèse. Elles peuvent être également synthétisées en partie par l'ovaire comme chez *Drosophila melanogaster* (Bownes, 1979), *dacus*

*Oleae* (Zongza et Dimitriadis, 1988) et *Lepinotarsa decelinedata* (Peferoen et Loof, 1986).

Notre travail, réalisé chez le Dermaptère *Labidura riparia* a été de préciser par des analyses cytologiques, biochimiques, microchirurgicale, l'utilisation des réserves vitellines dans les œufs plus particulièrement leur évolution au cours du développement embryonnaire. Cet insecte présente des particularités biologiques qui en font un excellent modèle pour toute étude scientifique. En effet la femelle accomplit plusieurs cycles reproducteurs qui se caractérisent par une alternance régulière de phases de vitellogenèse d'une durée de 10 jours et de phase de repos ovarien également de 10 jours. Cette dernière, coïncide avec la phase comportementale de soins aux œufs. (Caussanel et Coll., 1968 ; Caussanel, 1970, 1971).

Dans une première partie nous présentons les différentes phases de développement embryonnaire tout en précisant quelques caractéristiques morphologiques sur les œufs de *L. riparia*. Des études sont réalisés par Olivier, (1984 ) et Caussanel, (1975) et ont porté sur le poids et les mesures des œufs mais dans des conditions qui différent des nôtres. Nous avons suivi l'embryogenèse de l'insecte de l'apparition de l'écusson, embryonnaire jusqu'à la formation finale de l'embryon. Des travaux proche du notre ont été réalisés sur l'embryogenèse des Insectes nous citons, *Forficula* (Heymons, 1985), *Blabera Craniifere* (Bullière, 1970) et *Locusta migratoria* (Maltete, 1962).

La seconde partie de ce travail se rapporte à l'étude de l'utilisation des réserves protéique de l'œuf au cours du développement embryonnaire.

Il est admis que la dégradation des vitellines est corrélée avec les différentes phases de développement de l'embryon. Ceci est démontré chez *Locusta migratoria*. (Gregore et Loughton, 1974), chez *Blatella germanico* (Storella et al., 1985), chez *Calliphora erythrocephala* (Mendes et Schoeller, 1986), chez *Bombyx morii* (Indrasith et al., 1987).

Si beaucoup de travaux sont effectués sur la vitellogenèse, très peu sont menés sur la dégradation et l'utilisation des vitellines au cours du développement embryonnaire.

Après avoir établi l'embryogenèse nous abordons l'évolution des protéines ovocytaires par analyse électrophoretiques et des dosages par la méthode de



Bradford, (1976). Sachons que les réserves protéiques utilisables par l'embryon sont synthétisées dans le tissu adipeux, libérées dans l'hémolymphe et finalement accumulées dans les ovocytes, nous mettrons en évidence les différentes fractions protéiques dans ces tissus.

La troisième partie de ce travail concerne l'utilisation de la fraction lipidique par l'embryon. Les lipides ont par leur diversité structurale, un rôle important dans des processus physiologiques très divers. Plusieurs auteurs signalent que différentes espèces d'Insectes dépendent presque entièrement des lipides pour subvenir à leur besoins métaboliques. Ces substances représentent une réserve d'énergie métabolique qui est mobilisée dans certaines circonstances d'ordre écologique (hivernation, diapauses) comportemental (jeûne), ou physiologique (reproduction, embryogenèse, métamorphose).

Parallèlement à l'étude de l'évolution de différentes classes lipidiques, nous avons cherché à mettre en évidence l'effet éventuel d'un centre neuroendocrine, la *pars-latéralis* sur l'incorporation des lipides dans les ovocytes et leurs répercussions par leur analyse à partir des œufs à la ponte.

Dans la quatrième partie nous abordons le dépôt de la cuticule par des observations, ultrastructurales et l'évolution des ecdystéroïdes durant le développement embryonnaire. Au cours de son développement, les embryons d'insectes synthétisent plusieurs cuticules, le nombre de ces cuticules est variable suivant les espèces. Par exemple, trois cuticules embryonnaire peuvent être observées chez les Orthoptères, *Locusta migratoria* (Muller, 1963), (Lagueux et al., 1979). Il en va de même pour les Lépidoptères, *Hyalophora cecropia*, (Muller et Bucklin, 1985).

La présence d'ecdystéroïde d'origine maternelle dans les œufs a été démontrée chez les insectes, (Sayah, 1993, Tawfik, 2003, Capinera, 2008). Des corrélations ont été établies entre les taux d'ecdystéroïdes et la formation des cuticules embryonnaires chez différentes espèces, telles *L. migratoria* (Lagueux et al., 1979), *S. gregaria* (Sbrena, 1974) et *C. erythrocephala*, (Bordes-Alléaume et Sami., 1987).

Pour l'ensemble de ces travaux, je me suis appuyé sur les données préalablement acquises concernant des aspects de la biologie de *Labidura riparia*. Ces données son rappelées dans la première partie de ce travail.

## CHAPITRE I

### MATERIEL BIOLOGIQUE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES

#### I. MATERIEL BIOLOGIQUE

##### A. Condition d'élevages

Notre travail est réalisé sur des embryons et des femelles de *Labidura riparia*, Insecte Dermaptère qui se rencontre communément sur les plages du littoral et de certaines rivières de France (CAUSSANEL, 1970).

L'élevage en salle est maintenu en permanence au laboratoire dans des conditions précédemment décrites (CAUSSANEL, 1975). La méthode, (Fig. 1) consiste en:

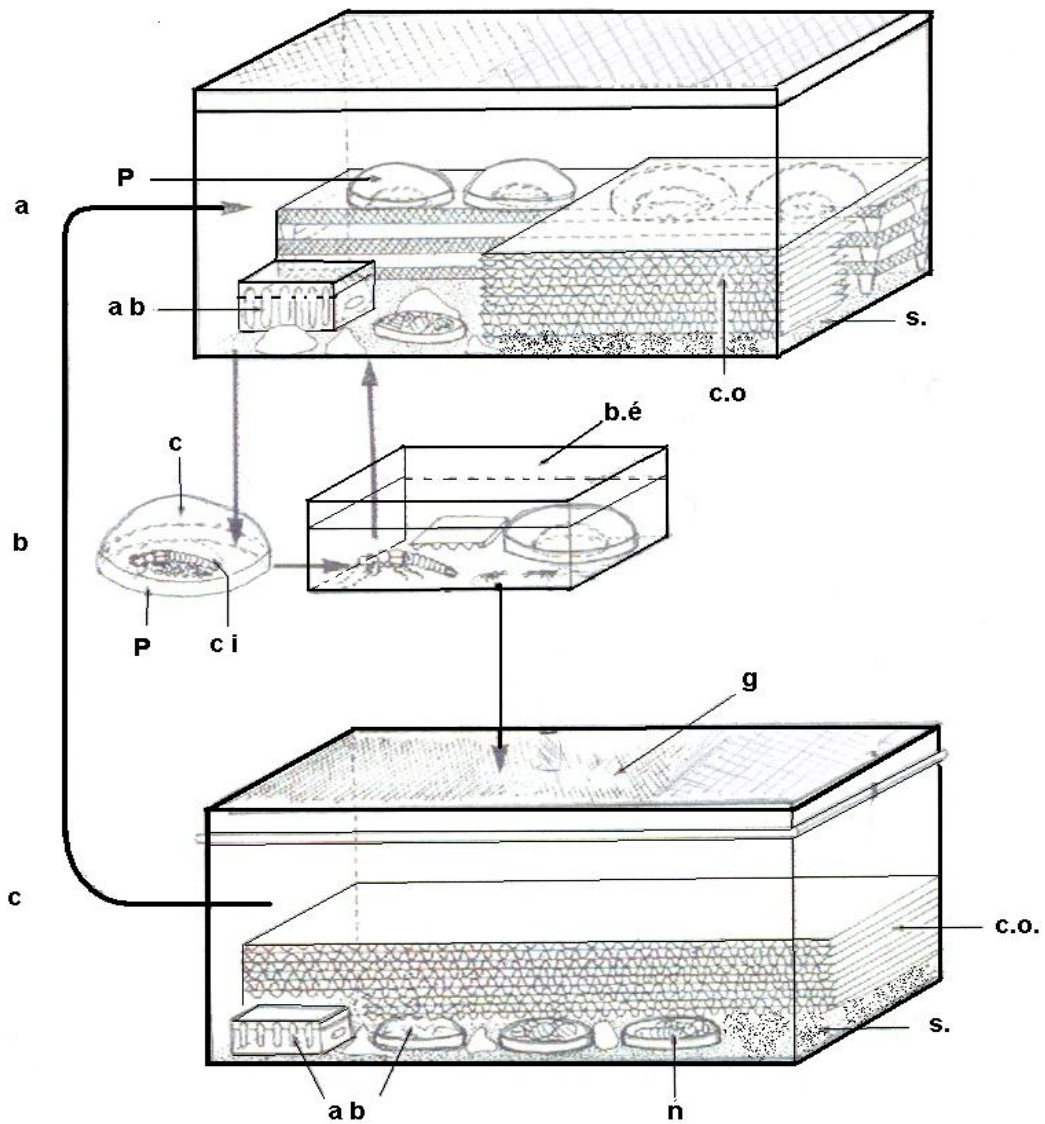
- Elevage en aquarium de reproduction des adultes.
- Elevage en aquarium de croissance des larves
- Elevage individuel en boîte pour des femelles en soins aux œufs.

Dans l'aquarium de reproduction, des pondoirs constitués de coton humide sur couvercle de boîte de pétri sont installés sur des supports en étagères. Les aquariums sont tapissés d'une fine couche de sable fin. Le nombre d'individus par aquarium est variable et oscille entre 60 et 90. Le nombre de mâles en aquarium de reproduction est maintenu constamment à 50% du nombre de femelles.

Les femelles en soins sont isolées sans nourriture avec leur pondoir dans une étuve à l'obscurité totale. En aquarium les adultes et les larves sont nourris de pupes de *Calliphora* sp. et de larves de *Tenebrio molitor*.

Les conditions de température et d'hygrométrie sont respectivement de 25 à 27°C et 70 à 80%. La photopériode est de 16 h.

Parallèlement à l'élevage de masse, les animaux expérimentaux et les femelles en période de ponte sont isolées et suivies individuellement.



**Fig. 1 : Elevage permanent de *Labidura riparia***

a. boîte d'élevage des imagos.

b. Elevages individuels ;

c. boîte d'élevage des larves.

Les flèches indiquent le circuit des insectes en élevages collectifs.

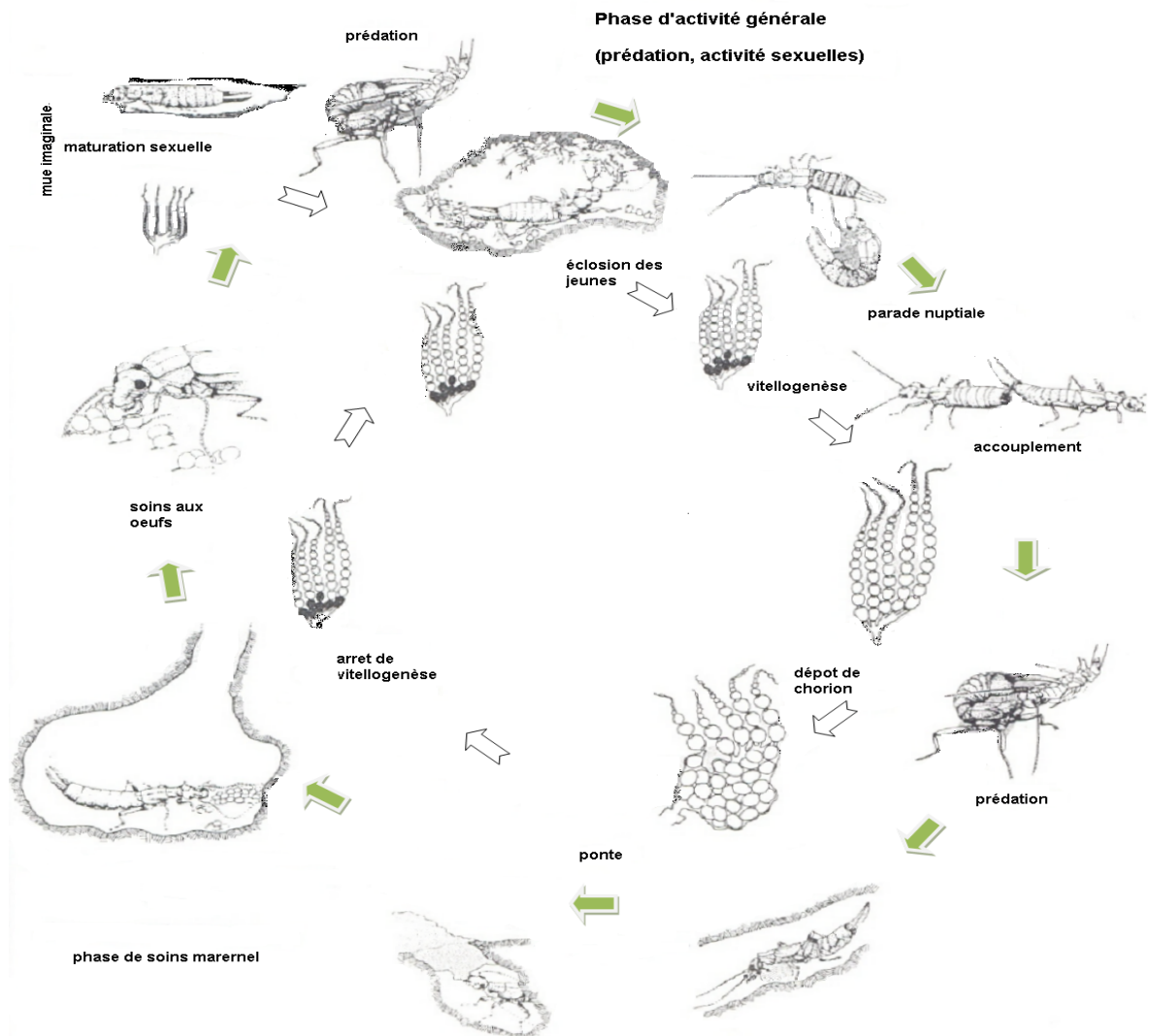
ab : abreuvoir ; b.e. : boîte d'élevage fermée pour insecte en période de soins aux œufs ; c. : coton humide du pondoir ; c.o : carton ondulé servant de refuge aux larves ; c.i. : chambre d'incubation où la femelle soigne ses œufs ; g : grillage fin pour éviter la fuite des larves ; n : nourriture ; p : pondoir ; s : sable. (D'après Caussanel, 1976, modifié par nous même).

## **B. Données ecophysiologiques**

### **1. Cycle reproducteur**

Dans nos conditions d'élevage, la femelle adulte de *Labidura* accomplit quatre à six cycles de reproduction qui se caractérisent par l'alternance de deux périodes de même durée, une période d'activité sexuelle suivie d'une ponte, et une période de soins des œufs (Caussanel, 1975).

Pendant la période d'activité sexuelle, phase épigée d'activité générale, la femelle vit souvent en groupes mixtes, s'accouple plusieurs fois avec des mâles différents. L'activité prédatrice et sexuelle essentiellement nocturnes, alterne avec des phases de repos diurne. D'un point de vue physiologique, cette phase d'activité correspond à la maturation des œufs dans l'ovaire. Les ovocytes se chargent de réserves, principalement de vitellogénines, c'est la vitellogenèse. A la fin de la vitellogenèse, les ovaires achèvent de murir les derniers œufs et les chorions commencent à être sécrétés. La ponte ovulaire a ensuite lieu, celle-ci marque le basculement physiologique et comportemental de la femelle qui devient maintenant solitaire, agressive à l'égard de ses congénères et qui cherche à s'enfuir tout en commençant à jeûner, (Fig.2), (Caussanel et al. 1981).



**Fig. 2 : Cycle reproducteur de la femelle de *Labidura riparia***

Le cycle à l'extérieur représente les deux étapes qui altèrent au cours de la vie imaginaire : phases d'activité générale, phase de soins maternels. En parallèle, le cercle intérieur figure l'évolution ovarienne : phase de vitellogenèse et phase d'arrêt de vitellogenèse (d'après Caussanel et Karlinsky, 1981, modifié par nous même).

## 2. Structure de l'ovaire

L'appareil reproducteur est composé de deux ovaires. Chaque ovaire est constitué de cinq (5) ovarioles de types polytrophique. L'ovariole est souvent présentée en plusieurs régions distinctes selon la phase d'activité des femelles (Fig : 3).

- Le Germarium : Constitue la zone de multiplication des cellules germinales et folliculaires, comprend la zone (1) de division cellulaire et la zone (2) d'accumulation des cellules précédentes.
- Le vitellarium : Fait suite au germarium, représentant la région d'organisation folliculaire et comprend la zone (3) d'alignement des trophocytes et ovocytes et la zone (4) de prévitellogenèse.

La structure du vitellarium qui va suivre dépend de l'état physiologique de la femelle.

En phase de vitellogenèse la zone (5) est nommée zone de vitellogenèse. Les ovocytes accumulent les réserves s'entourent d'enveloppes protectrices avant d'être fécondé et pondus.

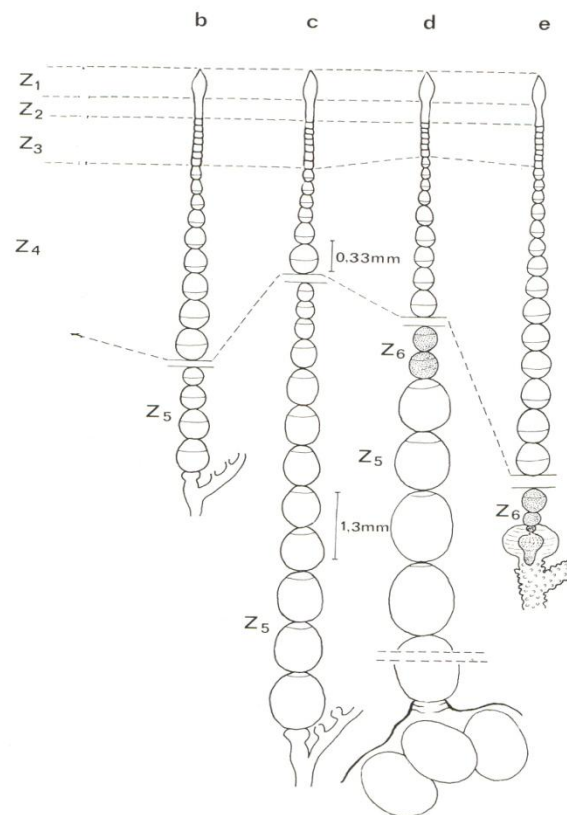
En phase de soins aux œufs, la vitellogenèse n'a pas lieu. La zone (6) est nommée zone de dégénérescence. Celle-ci est caractérisée par la présence de follicules en cours d'involution.

## 3. Fonctionnement ovarien

Les trois premières zones des ovarioles demeurent sans changement durant toute la vie de la femelle. Au cours de la vitellogenèse, les follicules de 0,3 mm de diamètre accumulent des réserves et constituent la zone (5). Les follicules passent à 1,3 mm de diamètre à maturité. Les œufs murs sont chorionnés et la ponte ovulaire à lieu.

Après la ponte, pendant les dix jours de soins aux œufs, les ovarioles montrent un état apparent de repos. Les follicules dans la zone (4) lorsque leur diamètre dépasse 0,33 mm, dégèrent et constituent la zone (6). Au cours de cette période l'évolution des follicules ovariens n'est pas arrêtée, (Breuzet, 1990). A l'éclosion des

jeunes, l'entrée en dégénérescence de nouveaux follicules cesse et un nouveau cycle reproducteur débute.



**Fig. 3 : Schéma de l'évolution d'un ovariole type en cours du cycle**

**reproducteur régulier de *Labidura riparia***

- b- Ovariole en début de vitellogenèse.
- c- Ovariole en pleine vitellogenèse.
- d- Ovariole peu avant la ponte.

e- Ovariole pendant les soins aux œufs

Z1, Z2, Z3, Z4, représentés à la même échelle, Z5, Z6, à une échelle inférieure de moitié. Les follicules en dégénérescences sont grisés. (Caussanel, 1975)

### **3.1. Synthèse et incorporation de protéines**

#### **3.1.1. Synthèse protéique endogène**

Les techniques ultrastructurales et électrophorétiques des ovaires ont souvent mis en évidence la synthèse protéique endogène chez les Insectes, en particulier chez *Hyalophora cercopia* (Bast et al., 1976) et *Drosophila melanogaster* (Gutzeit, 1980 ; Bownes, 1982), *Calliphora erythrocephala* (Fourney et al., 1982) et chez *Locusta migratoria* (Glass et Emmerich, 1981). Les protéines synthétisées par les follicules sont de plusieurs types : Des précurseurs de l'enveloppe vitellines, associées aux vitellines et entrent dans la composition du vitellus ou des polypeptides. Les cellules germinales (trophocytes et ovocytes) constituent un second site de protéines endogènes de l'ovaire. (Breuzet et al., 1984 ; Laverdure et al., 1986).

#### **3.1.2. Incorporation de protéines exogènes**

Lors de la vitellogenèse l'augmentation de la taille de l'ovocyte suite à une accumulation de vitellines coïncide avec la forte activité du tissu adipeux. Ce dernier participe activement à la synthèse de précurseurs de vitellogénines qui sont acheminées vers les ovocytes par l'hémolymphe (Englemann, 1979 et Hagedorn et Kunkel, 1979). L'ovocyte et le trophocyte prélèvent dans le milieu hémolympatique les éléments nécessaires à leur croissance. Chez *Labidura riparia* l'incorporation de protéines vitellogènes ne s'effectue qu'au moment où l'ovaire entre en vitellogenèse lorsque les follicules dépassent le diamètre de 0,30 mm (Breuzet, 1990).

### **4. Ponte et soins aux œufs.**



Après l'isolement, la femelle dans son pondoir dépose de 40 à 90 œufs. La ponte dure de un jour à un jour et demi (Vancassel et Caussanel, 1968). Les soins aux œufs et aux larves sont connus chez les Insectes sociaux. Les Insectes solitaires abandonnent généralement au hasard leurs pontes. Certains pourtant font exception, c'est le cas du forficule, *Labidura riparia*. Les soins aux œufs sont variés, la femelle lèche, brosse, retourne, transporte ses œufs. La moindre perturbation au moment de la ponte peut interrompre celle-ci momentanément ou même définitivement ou entraîner une perturbation du comportement de la femelle qui peut alors dévorer ses œufs.

## 5. Régulation du cycle reproducteur

La phase de vitellogenèse et d'arrêt de vitellogenèse sont soumises à des contrôles endocrine et neuroendocrines (Caussanel, 1975 et Breuzet, 1990). La vitellogenèse est sous contrôle d'une hormone dite juvénile sécrétée par une glande, *corpus allatum* (C.A.). Celle-ci demeure active pendant toute la durée de la vitellogenèse et son activité est déclenchée par un centre neurosécréteur cérébral, la *pars intercerebralis* (P.I.). Dans l'hémolymphe une autre hormone, l'ecdystéroïdes observée à des taux variables, intervient également dans ce processus complexe aboutissant à la formation des Œufs murs (Sayah, 1993). Un autre centre neurosécréteur, la *pars lateralis*, pourrait intervenir dans la régulation de l'apparition des phases d'arrêt de vitellogenèse en agissant sur le contrôle de la sécrétion des ecdystéroïdes.

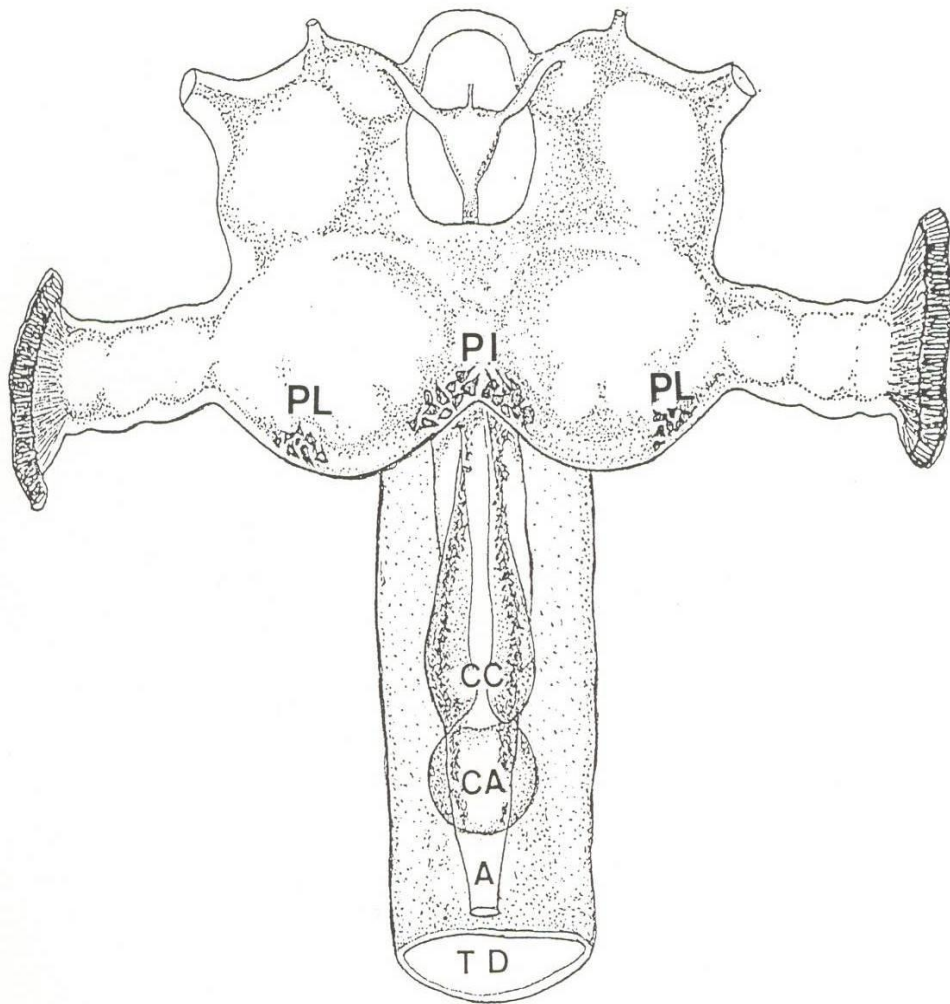
## II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

### A. Interventions microchirurgicales

Notre étude expérimentale des régulations neuroendocrines, endocrines et de l'effet engendrer sur le développement embryonnaire en général a conduit à l'utilisation d'intervention microchirurgicale de parsectomie et d'injection de colorants.

- Parsectomie : Les cellules de la *pars lateralis* forment dans le protocerebron deux groupes latéraux distincts, visibles in-vivo (Fig. 4). Leur emplacement est déterminé auparavant sur montage in-toto, (Caussanel, 1975). La destruction de la *pars lateralis* est effectuée par cautérisation des cellules à l'aide d'un microcautère Koenig à pointe de tungstène. Les interventions interviennent le lendemain de l'émergence des femelles, après anesthésie par le CO<sub>2</sub>. Les animaux opérés ne sont pas alimentés pendant les 24 h. qui suivent les opérations.

- Injection de colorants: A des femelles au 4-5<sup>ème</sup> jour de vitellogenèse on injecte 5micro-l d'une solution soit de bleu trypon soit de rouge neutre à 1% dans la cavité abdominale à l'aide d'une seringue Hamilton. Les ovocytes incorporent le colorant et à la ponte, les œufs sont colorés. A ces pontes sont additionnés les œufs des femelles pl-. Cette technique nous permet ainsi d'assurer les soins aux œufs issus des femelles parsectomisées et de suivre leur développement.



**Fig. 4 : Cerveau d'une femelle de *Labidura riparia* : Localisation de certains centres endocrines et neuroendocrines**

A. aorte ; CA : *corpus allatum* ; CC : *corpora cardiaca* ; PI : pars intercerebralis ; PL : *pars lateralis* ; TD : Tube digestif. (Caussanel, 1975 – modifié)

## **B. Technique de récupération des œufs**

Afin d'éviter l'oophagie des femelles pl-, celles-ci sont élevées en boîtes superposées séparées par un grillage dont les mailles sont légèrement supérieures au diamètre des œufs. La boîte inférieure, de récupération des œufs est tapissée d'un papier humidifié évitant ainsi la dessiccation des œufs.

### **C. Montage in-toto**

Après fixation, les œufs débarrassés de leurs enveloppes sont progressivement hydratés puis colorés pendant 12 h dans une solution aqueuse à 1% de thionine acétifiée. L'excédent de colorant est éliminé à l'alcool 80°. Les embryons sont ensuite séparés soigneusement du vitellus, déshydratés, montés entre lames et lamelles dans du baume de Canada et dessinés à la chambre claire.

### **D. Techniques microscopiques**

#### **1. Microscopie photonique**

##### **1.1. Fixation des œufs**

L'abondance et la nature du vitellus dressent divers obstacles à la fixation et à la confection des coupes sériées. Plusieurs méthodes de fixations des œufs ont été essayées, l'une d'entre elles, celle mise au point par ZALOCAR, (1971) nous a permis à la fin d'arriver à des résultats satisfaisants. La fixation se déroule en deux phases:

1<sup>ère</sup> phase avec heptane, composée de 2 ml d'alcool à 95%, 0,5 ml d'acide acétique, 0,5 ml de formol et 2 ml d'heptane.

2<sup>ème</sup> phase sans heptane, composée de 2 ml d'alcool 95%, 0,5 ml d'acide acétique, 0,2 ml de formol et 0,5 ml d'eau distillée.

Les œufs sont placés dans la 1<sup>ère</sup> solution pendant 15 mn. L'heptane qui remonte à la surface de la solution est utilisé pour rendre la membrane vitelline plus transparente. Dans la 2<sup>ème</sup> solution, les œufs sont déposés pendant une nuit au réfrigérateur. Auparavant, après 2 à 3 heures de mise en solution et après avoir

soigneusement perforé le chorion à l'aide de minutie en tungstène les annexes embryonnaires sont retirées.

## **1.2. Coupes histologiques**

Les œufs fixés comme précédemment décrit, sont déshydratés et inclus dans une cytoparaffine à 56°C. Les coupes sériées à 7 µm sont colorées à l'Azan de HEIDENHAIN selon la technique décrite par MARTOJA, (1967) et GABE, (1968).

## **2. Microscopie électronique**

La fixation des embryons et du système vitellin pose d'énormes problèmes techniques compte tenu de la densité du vitellus et de son manque de cohésion. Après plusieurs essais infructueux la méthode retenue est la suivante:

- Les œufs sont immergés dans un fixateur composé de glutaraldéhyde à 4%, tamponné au cacodylate de sodium à 0,2 M au pH 7,3 additionné de chlorure de sodium à 0,01%. La pression osmotique du milieu est d'environ 400 à 450 mOsm.

- Perforation du chorion à plusieurs endroits à l'aide de minutie composée de fil de tungstène bien affiné.

- 20 à 30 mn après découpage du chorion et isolement des embryons du vitellus, les embryons âgés sont coupés longitudinalement de part et d'autre et vidés de tous les tissus internes. La durée de fixation est prolongée à 2 h 30 mn à 4°C. La fixation est suivie d'un rinçage rapide dans le tampon de fixation puis d'une post-fixation dans le tetroxyde d'osmium à 1% pendant 1h à 4°C.

La deuxième fixation est suivie d'un lavage rapide dans le même tampon, les échantillons sont déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol de degrés croissant. Les pièces sont incluses dans l'Epon 812.

### **2.1. Coupes semi-fines**

Les coupes semi-fines de 1 à 1,5 µm d'épaisseur, sont colorées sur lames histologiques par le bleu de toluidine et observées au microscope photonique, selon la méthode, Luft, (1961).

## 2.2. Coupes ultra-fines

Les coupes ultra-fines sont colorées pendant 7 mn par l'acétate d'uranyle, puis pendant 10 mn par le citrate de plomb, selon la technique de REYNOLDS (1963). Les coupes sont observées au microscope électronique Philips 201 ou 300.

## E. Analyses électrophorétiques

Les analyses sont réalisées en conditions dénaturantes. Les œufs sont observés sous la loupe binoculaire, ceux déformés, mal développés, pullulés par les acariens sont éliminés. 10 œufs sont prélevés par stade de développement, broyés mécaniquement dans 50 µl de solution de NaCl à 0,2 M. Le broya est repris par une solution dénaturante composée de sodium-dodécylsulfate (2%), Glycérol (10%) et 2-mercaptoéthanol (5%). L'ensemble est porté à ébullition pendant 7mn.

Le tampon de migration est composé de Tris (0,025M) Glycérine (0,192 M) SDS (0,1%) à pH 8,3. L'électrophorèse est effectuée sous intensité constante de 20 mA/gel. Après la migration, les gels sont colorés par une solution à 0,125% bleu de coomassie dans un mélange d'éthanol 95% -acide acétique-eau dans le rapport 5V/1V/4V. L'excès des colorants est éliminé par des mélanges des mêmes solvants mais dans le rapport 0,5V/0,7V/10V.

Les poids moléculaires apparents des différentes fractions protéiques sont estimés par comparaison avec ceux de protéines standards (calibration Kit, Pharmacia) dont les poids moléculaires se répartissent entre 14400 et 330.000 daltons. Pour détecter les fractions protéiques marquées par un traceur radioactif, les gels sont séchés puis placés pendant 7 jours à -70°C au contact d'un film photographique Kodak X-OMAT-S. Les enregistrements densitométriques sont effectués, à partir des gels colorés par le bleu de Coomassie ou des autiradiogrammes, avec un enregistreur-intégrateur de marque Vermon.

## F. Incorporation de traceur radioactif

- Incubation in-vivo

Un volume de 2ml d'une solution du traceur dans du liquide physiologique Ringer-Ephrussi stérile est injecté avec une microseringue dans la cavité abdominale ;

- a. pour l'analyse en scintillation liquide la leucine  $^3\text{H}$  a été utilisée à la dose de 0.75 MBq/animal.
- b. pour l'lectophorèse la méthionine  $^{35}\text{S}$  a été utilisée à la dose de 0.8 à 1 MB/q animal et l'Orthophosphate à la dose de 0.75 MBq/animal.

## G. Analyse en scintillation liquide

Les tissus prélevés après les incubations variables en présence de Leucine  $^3\text{H}$  sont rincés dans le liquide physiologique, éponnés et pesés. Homogénéisés dans du liquide Ringer-Ephrussi et séparé en deux parties. La fraction protéique est précipitée dans l'une d'elle par l'acide trichloracétique (TCA) à 20% à raison 1V/1V. Après agitation l'aliquot est centrifugé à 5000g pendant 10 mn. Le culot est dissous dans du NaCl 0,3M puis précipité. L'opération est répétée trois fois afin d'éliminer le traceur non incorporé aux fractions protéiques. Le précipité final ainsi que le second aliquot sont séchés puis digérés par une solution d'amine quaternaire (BTS 450, Beckman). La radioactivité contenue dans chaque échantillon est mesurée en présence de scintillateur Ready solvNa (Beckman) dans un compteur Beckman de type 7000.

## H. Dosages des protéines

Le dosage des protéines des œufs de *L. riparia* est effectué selon la méthode de BRADFORD, (1976). La courbe d'étalonnage est établie en utilisant la catalase. La lecture des densités optiques est obtenue sur spectrophotomètre uv-visible à une longueur d'onde de 595 nm. L'échelle chronologique des dosages a débuté au stade 0 jour correspondant aux œufs prélevés à la ponte ovulaire. Les œufs sont triés sous

la loupe binoculaire pour éviter ceux présentant des écarts de développement embryonnaire, ou abîmés. La concentration en NaCl a été déterminée après test de solubilisation des protéines.

## **I. Analyse des lipides**

Les dosages des lipides sont effectués sur des œufs de femelles normales de 1, 3, 5, 7, et 9 jours et sur des œufs de 1 et 5 jours de femelles parsectomisées. Le nombre d'œufs chez les femelles PL- a été réduit suite aux difficultés rencontrées dans leur incubation. Vu l'écart dans le développement embryonnaire au sein d'une même ponte nous avons élargi notre échantillonnage à 3 pontes par stade avec une sélection de 10 œufs par ponte. Les œufs sont choisis selon des critères morphologiques déterminants leur état de développement et leur état sanitaire.

Ce travail a été réalisé au laboratoire des biomembranes végétale de l'université P. et M. Curie en collaboration avec C. DEMANDRE.

### **1. Protocole d'extraction des lipides totaux**

Les œufs sont broyés dans un microbroyeur de verre avec 1 ml de méthanol extrait par 1 ml de chloroforme puis 1 ml de Na Cl à 1% est ajouté. Après centrifugation à 5000 g pendant 10 min, la phase chloroforme est prélevée. Elle est stockée au congélateur, puis reprise dans un volume connu de chloroforme au moment de sont utilisation en chromatographie.

### **2. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La séparation des catégories lipidiques se fait sur plaque de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur (Silicagel G60, Merck, RFA). La migration, dure environ 40 min est réalisée dans un solvant éther de pétrole / éther éthylique / acide acétique aux volumes respectifs de 70, 30, et 0,4; (Folch et al.,1957). Après migration et séchage de la plaque, les taches lipidiques correspondant aux phospholipides, diacylglycéroles, acides gras libres, triacylglycérole, et stérols sont révélées par pulvérisation d'une solution de primuline à 10 mg pour 100 ml d'un mélange



acétone/eau (80:20; v/v). Les taches correspondant aux différentes fractions lipidiques, repérées sous lumière ultraviolette sont récupérées par grattage et méthylées.

### **3. Méthylation**

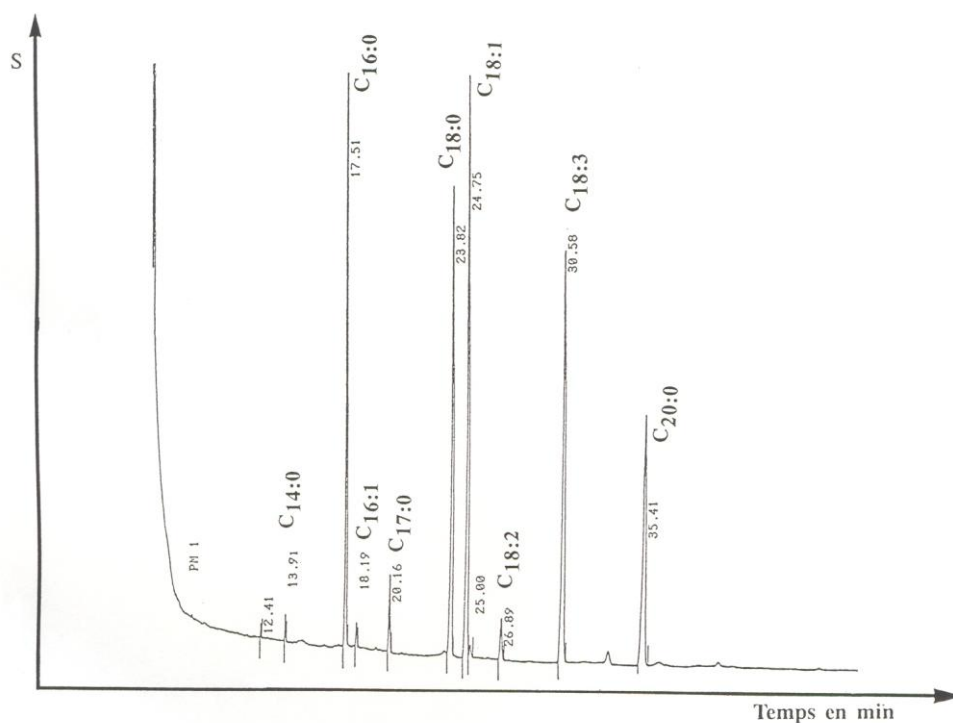
La Méthylation des acides gras de l'extrait lipidique total ou des fractions lipidiques séparées par CCM se fait en présence d'un témoin interne, l'acide heptadécanoïque ou margarique (C 17:0). Introduit en quantité connue, cet acide nous permet la quantification des différents acides gras. L'extrait lipidique total amené à sec est repris dans 2ml de soude méthanolique et incubé à 6°C au bain marie pendant 15 min. On ajoute ensuite 1ml de trifluorure de bore méthanolique (BF<sub>3</sub>). Incubation au bain-marie pendant 5 min. à 65 °c.

Les esters méthyliques sont extraits après refroidissement par une partition pentane-eau (2v: 1v). Les fractions lipidiques séparées par CCM et après grattage sont additionnées de 2 ml de BF<sub>3</sub> et Incubées à 65°C au bain-marie pendant 20 min.

Les esters méthyliques sont alors extrait par la partition pentane / eau.

### **4. Chromatographie en phase gazeuse**

Les esters méthyliques sont séparés, identifiés, et dosés par chromatographie en phase gazeuse. Nous avons utilisé un chromatographe varian 3300. Le gaz vecteur est l'hélium (pression : 0,5 bar). Les acides gras des pics sont identifiés en comparant les temps de rétention à ceux des acides gras standards (Fig. 5). Chaque acide gras est quantifié par rapport à la surface du pic de l'acide gras témoin.



**Fig. 5 : Chromatogramme des acides gras standard et du témoin interne (C17 :0).**

Le temps de rétention de chaque acide gras est indiqué à coté de chaque pic en min.

S représente le signal donné par l'enregistreur.

### J. Analyse d'activité lipasique

Préparation de l'extrait enzymatique : L'activité lipase est déterminée sur des œufs dès la ponte jusqu'à l'éclosion. 50 œufs sont broyés dans 500 ml de tampon Tris-HCl 10 mM de pH 7,6. Le broyat est centrifugé 10 min à 4°C à 20000 g. Le

surnageant de couche de lipide est éliminée et la phase inférieure est prélevée. On recentrifuge dans les mêmes conditions pour éliminer toute trace de lipide. 50 µl de surnageant sont prélevés pour la mesure de la teneur en protéines et 50 µl sont retenus pour la réaction enzymatique.

*Réaction d'hydrolyse* : Le substrat retenu est l'acide oléique. 50 µl de substrat sont introduits dans un flacon en verre auquel on ajoute 500 µl d'extrait enzymatique. La réaction se poursuit à 37°C sous agitation magnétique (300 rpm) pendant 60 min. La lipolyse est arrêtée par addition de 2,50 ml de chloroforme-méthanol-benzène (2-2,4-1, de 0,085 µl d'acide oléique (0,5 µmol) et 50 µl d'NaOH 1N. Les produits de la réaction sont vortexés, centrifugés pendant 10 mn à 2000g à température ambiante. 1 ml de la phase supérieure contenant de l'acide oléique est prélevé pour le comptage dans 4 ml de scintillant.

## **K. Dosages enzymo-immunologiques des ecdystéroïdes**

Les quantités d'ecdystéroïdes sont mesurées par EIA (12). L'anticorps anti-20-hydroxyecdysone AS4919 et le traceur enzymatique 20-hydroxyecdysone-6-carboxyméthoxime-acétylcholinestérase ont été donnés par le Pr. P. Porcheron (Paris). La courbe standard est réalisée pour chaque plaque en utilisant la 20-hydroxyecdysone (Simes, Milan). Chaque détermination est tripliquée, le coefficient de variation entre les répliqués s'est révélé dans nos mesures  $\leq 14\%$ . Les résultats sont exprimés en pg équivalent de 20-hydroxyecdysone.

## **L. Analyse des ecdystéroïdes**

Les dosages des ecdystéroïdes sont effectués sur les embryons et sur les ovaires.

### **1. Protocole d'extraction**

Pour l'analyse des embryons, 20 œufs regroupés du même stade sont échantillonnés.

L'analyse des ecdystéroïdes des ovaires est effectuée chez les femelles adultes au cours du cycle reproducteur.

Les ovaires de chaque femelle sont prélevés, rincés dans le Ringer-Ephrussi puis essorés et pesés. La taille des follicules basaux est mesurée. Le poids des ovaires et le diamètre des follicules rendent compte de l'état de maturation ovarienne.

Les échantillons des embryons comme ceux des ovaires sont homogénéisés dans 1 ml de méthanol pur (Merck, RFA), extraits deux fois après centrifugation pendant 10 mn à 10 000 g; les deux surnageants sont rassemblés et évaporés à sec. Certains échantillons sont divisés en deux fractions de même volume, une est soumise directement au dosage enzymo-immunologique (EIA), l'autre subit une hydrolyse enzymatique avant les dosages.

Pour les analyses en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) les ovaires de 10 femelles en ponte ovulaire au 13<sup>ème</sup> jour sont poulées. L'extrait méthanolique est alors soumis à une partition méthanol, acétonitrile et hexane (1 : 4 : 5 ; V/V/V).

La phase méthanol-acétonitrile est divisée aux deux moitiés, une est directement soumise à l'HPLC, l'autre subit l'hydrolyse enzymatique puis l'analyse par HPLC afin de caractériser les ecdystéroïdes libres et conjugués.

## **2. Dosages enzymo-immunologique (EIA)**

Les quantités d'ecdystéroïdes dans les extraits méthanoliques sont mesurées par EIA selon le protocole mis au point par Porcheron et al. (1989).

Les plaques de filtration à 96 puits (Nunc 96F, Danemark) sont préalablement recouvertes par des anticorps de chèvre anti IgG de lapin ("coating"). Pour le dosage, on dépose dans l'ordre les échantillons repris dans le tampon EIA, le traceur enzymatique (20-hydroxyecdysone-6-AS4919, (donné par le Pr. P. Porcheron, Paris). Ce dernier se lie à l'anticorps de chèvre anti IgG de lapin et une réaction de compétition pour les sites de liaison disponibles s'établit entre l'hormone et le traceur. Après une nuit d'incubation on procède à un lavage de la plaque pour éliminer les éléments non liés. Enfin on ajoute le réactif d'Ellman (Solution d'iodure d'acétylthiocholine et d'acide 5,5' – dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) dans un

tampon phosphate 0,01 M à pH 7,4). L'acétylthiocholine, en présence de l'AChE, est hydrolysée en thiocholine et acétate. La thiocholine réagit avec le DTNB en donnant un produit jaune (le thionitrobenzoate) dont la coloration lue au spectrophotomètre va servir à doser l'intensité de la réaction. La courbe standard de 4 à 500 pg est réalisée pour chaque plaque en utilisant la 20-hydroxyecdysone (Simes, Milan).

Les concentrations en ecdystéroïdes dans les échantillons biologiques sont calculées à partir de cette courbe.

Les résultats sont exprimés en pg équivalent de 20-hydroxyecdysone. Chaque détermination est dupliquée ou tripliquée ; le coefficient de variation entre les répliquées s'est révélé dans nos mesures inférieur ou égales à 14%, ce test statistique utilisé est le test student.

### **3. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Les analyses HPLC sont effectuées sur un appareillage waters (waters assoc., Milford, USA) composé de deux pompes 6000 A, d'un module de programmation M720, d'un module d'injection automatique Wisp 710 B, et d'un détecteur UV fine 254 nm (type 440) couplé à un moniteur de radioactivité Flo-one Béta A-200 (Radiomatic).

La séparation par chromatographie en phase reverse (HPLC-PR) est faite sur colonne de silice greffée avec de l'octadécyl silane Zorbax-ODS ou sphérisorb-50DS2 (Du pont, USA) (Longueur = 250 cm, diamètre intérieur = 4,6 mm). Les échantillons sont chromatographiés en utilisant un gradient logarithmique de 0 % à 100 % de méthanol dans l'eau, en 30 min, avec un débit de 1ml/mm.

Des fractions de 0,5 ml sont collectées, un aliquot de chaque fraction est ensuite évaporé à sec et dissous dans le tampon EIA pour le dosage des ecdystéroïdes.

### **4. Hydrolyse enzymatique**

Les ecdystéroïdes se trouvent souvent associés à d'autres molécules sous forme de conjugués. Ces derniers peuvent ne pas être reconnus par l'anticorps au

moment des dosages. Dans ce cas ils peuvent être révélés par une hydrolyse enzymatique appropriée.

Les échantillons sont soumis à une hydrolyse par la  $\beta$  glucuronidase de type H – 1 (sigma chemical Co). les extraits sont dissous dans un tampon acétate de sodium (0,1 pH 5,3 ) et incubés en présence de 1 mg/ml de  $\beta$ -glucuronidase durant 24 h à 30°C. Après incubation et afin d'arrêter l'hydrolyse, l'échantillon est dilué par l'eau est absorbé sur une cartouche sep-pak C18 (waters), puis la cartouche est rincée à l'eau pour éliminer les sels. Les ecdystéroïdes sont élués par 5 ml de méthanol pur les solvants sont évaporés et l'échantillon repris pour analyse par HPLC ou EIA.

## CHAPITRE II

### DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

#### I. CHOIX DU REPERE CHRONOLOGIQUE

La femelle de *Labidura riparia*, un ou deux jours avant la ponte change de comportement. Elle est plus active, cherche à s'isoler, s'alimente peu et gratte le papier du pondoir. L'émission des œufs s'effectue d'abord lentement puis s'accélère avant de décroître. Au début, les œufs sont émis toutes les demi-heures puis toutes les cinq minutes, (Caussanel,1975). L'émission des œufs peut durer 10 à 12 heures. Les œufs au sein d'une même ponte présentent ainsi un écart de développement d'un œuf à l'autre assez important. La ponte est généralement nocturne. Le comportement des femelles au début de la période de soins est fragile et l'oophagie peut être induite à la moindre perturbation. Ces deux caractéristiques ne permettent pas l'intervention directe sur les œufs au moment de la ponte. Dans ces conditions nous avons choisi de présenter une chronologie quotidienne du développement embryonnaire à partir du jour de ponte appelé ici 1<sup>er</sup> jour. Cette chronologie est affinée par des observations de modifications de taille et de forme, caractéristiques de certains stades.

#### II. DONNEES GENERALE SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE *LABIDURA RIPARIA*

Le développement embryonnaire qui dure 10 jours s'accompagne de modifications morphologiques externes de l'œuf et de mouvements divers de l'embryon au sein du système ovulaire. Les changements de forme et de dimension de l'œuf correspondent à des moments précis du développement et sont donc des repères précieux.

A la ponte les œufs de forme ellipsoïde mesurent en moyenne 1,20 mm de grand axe et 0,98 mm de petit axe et pèsent 0,6 mg. Leur forme et leur taille n'évoluent pas jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour, date de l'apparition de l'ébauche de la bandelette embryonnaire, (Fig.6 Ba). Le micropyle au pôle antérieur, d'ailleurs difficilement repérable, reste le seul repère permettant une orientation de l'œuf .

Au 4<sup>ème</sup> jour (Fig.6 Bb), l'œuf augmente de volume par absorption d'eau tout en gardant sa forme ellipsoïde. Cette absorption peut être visualisée par la pénétration de colorants aqueux dans lesquels sont placés les œufs ( Olivier, 1984). L'œuf atteint alors 1,4 mm de grand axe et 1,1 mm de petit axe. La bandelette embryonnaire s'allonge et son extrémité abdominale remonte au pôle antérieur de l'œuf tandis que la tête se trouve orientée vers le pôle postérieur; ce mouvement ascendant est appelé anatropsis. L'embryon occupe alors une face de l'œuf considérée classiquement comme la face dorsale.

Au 5<sup>ème</sup> jour (Fig.1 Bc), l'œuf s'élargit au pôle postérieur et prend une forme ovoïde. Sa longueur atteint 1,6 mm ( grand axe ) et sa largeur 1,2 mm ( petit axe ). Le mouvement d'anatropsis s'achève en même temps que l'accroissement de la bandelette. Notons le mouvement à peine décelable de descente de la tête vers le pôle postérieur.

Au cours du 6<sup>ème</sup> jour (Fig.6 Bd) l'embryon entame un mouvement descendant de blastocinèse ou catatropsis. La tête de l'embryon remonte sur la face ventrale de l'œuf vers le pôle antérieur tandis que l'extrémité caudale descend vers le pôle postérieur. La taille de l'œuf demeure sensiblement la même que celle du stade précédent.

Au 7<sup>ème</sup> jour (Fig. 6 Be), le déplacement de l'embryon sur la face ventrale de l'œuf s'achève et la tête atteint le pôle antérieur. Le mouvement de l'embryon qui l'amène à passer de la face dorsale de l'œuf à sa face ventrale s'accompagne de celui de l'amnios entraînant la séreuse. Celle-ci se rétracte en un sac, le sac séreux, en arrière de la tête. Le sac séreux est progressivement résorbé par l'embryon en croissance. La longueur de l'embryon coïncide avec celle de l'œuf. Les flancs de l'embryon s'étalent progressivement vers le côté dorsal. Par suite de cette nouvelle position de l'embryon dans l'œuf, celui-ci prend à nouveau une forme ellipsoïde. L'œuf mesure 1,7 mm (grand axe) sur 1,2 mm (petit axe).

Au 8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jour (Fig. 6 Bf), l'embryon s'allonge et acquiert toutes les caractéristiques d'une jeune larve. Il a le corps replié sur lui même, les cerques en face de la tête protégeant les appendices céphaliques et les pattes. La forme et la position de la future larve élargissent à nouveau l'œuf dans sa partie postérieure. Un léger étranglement apparaît à la fin de ce stade au tiers supérieur de l'œuf, qui est alors piriforme.

### **A. Multiplication nucléaire intravitelline**

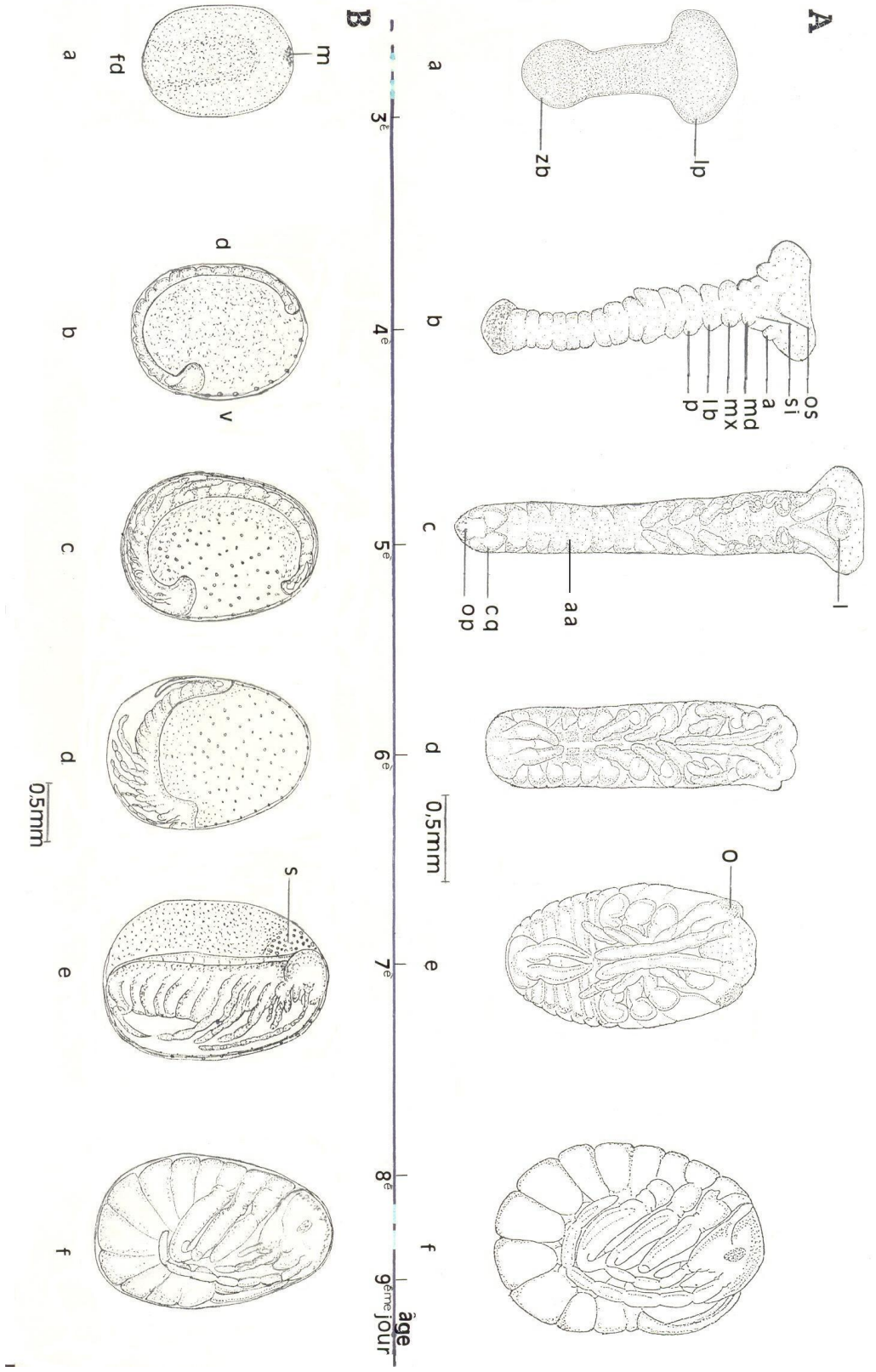
Après la fécondation, le noyau résultant de la fusion des pronucléi mâles et femelle se divise dans le vitellus. Cette multiplication nucléaire intravitelline se déroule pendant 36 heures environ.

Les œufs fixés quelques heures seulement après la ponte ont un périplasme visible en microscopie photonique, bien que relativement mince (Fig.7 a). Le vitellus est constitué de granules vitellins de taille assez uniforme et d'un réticulum cytoplasmique intervittelin mal conservé par les techniques histologiques habituelles et donc difficile à observer.

Les noyaux résultant des premières divisions sont localisés dans la partie centrale de l'œuf. Ils sont relativement grands et clairs, dépourvus de nucléole, ils sont entourés chacun d'un îlot cytoplasmique bien visible qui a dû se former aux dépens du réticulum cytoplasmique intervittelin. Ces énergides ont en général une forme plus ou moins étoilée (Fig. 7 a).

Les énergides migrent progressivement vers la périphérie lors des mitoses suivantes (Fig. 7 b). 24 heures après la ponte, dans la région équatoriale de l'œuf, 15 à 20  $\mu\text{m}$  seulement les séparent du périplasme (Fig. 7 c). Le périplasme bien que n'étant pas encore atteint par les énergides est plus épais qu'au moment de la ponte; cela suggère l'existence d'un courant cytoplasmique, cet épaissement se faisant au dépens du réticulum intervittelin.





**Fig. 6 : Développement et mouvement embryonnaire chez *Labidura riparia***

**B. Colonisation du périplasma par les énergides et formation du blastoderme**

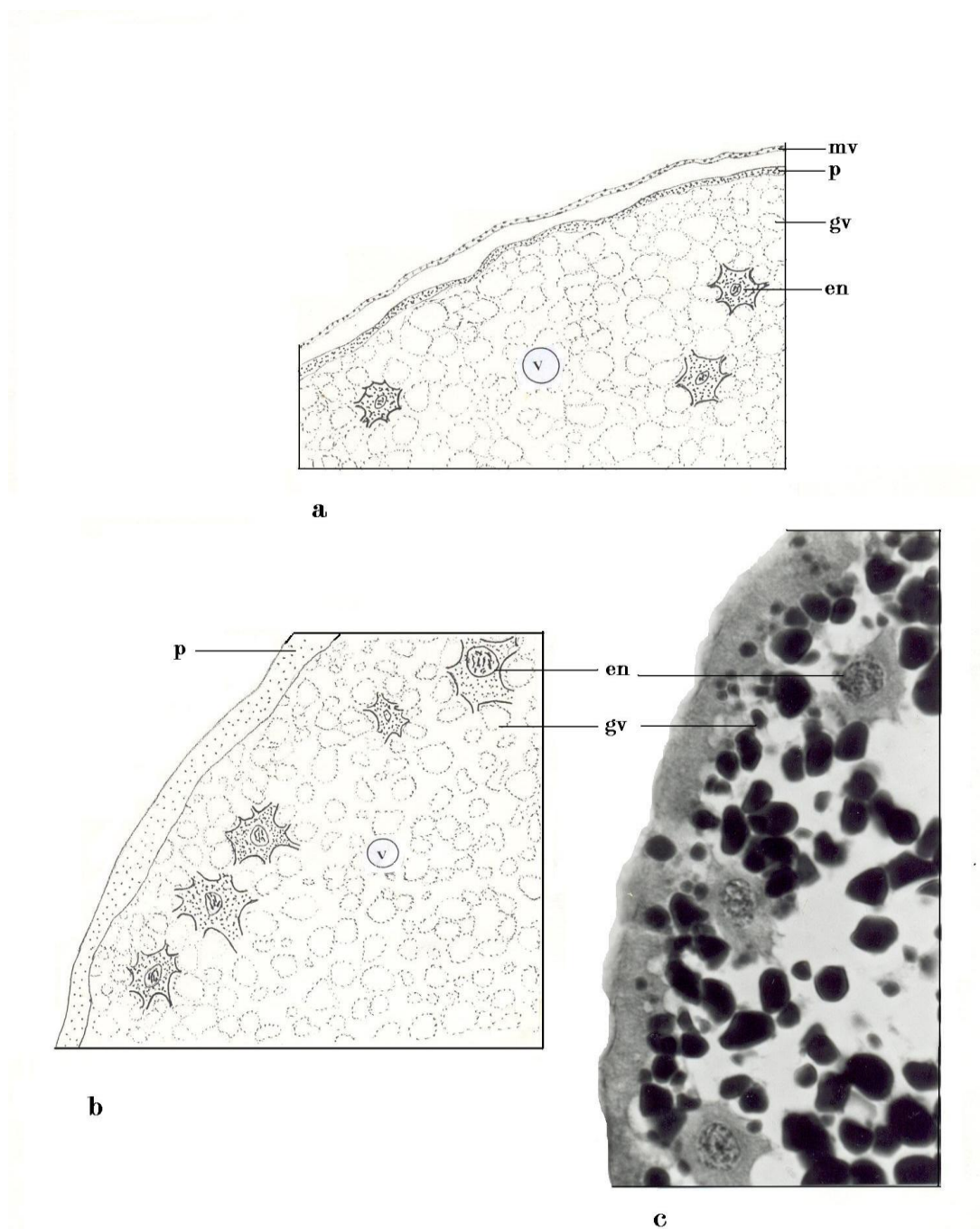
Au début du 2<sup>ème</sup> jour de l'embryogenèse certaines énergides atteignent le périplasme (fig. 8a). Ils entrent en contact avec le périplasme par des pseudopodes puis leur cytoplasme fusionne avec celui-ci.

L'arrivée des énergides à la périphérie n'est pas synchrone dans toutes les régions de l'œuf, elle est plus tardive à l'un des pôles. Nous n'avons pu préciser lequel par suite de manque de tout repère morphologique.

36 heures après la ponte, la colonisation du périplasme par les énergides est achevée. Au pôle atteint le plus tardivement par les énergides, celles-ci sont encore individualisées et le blastoderme syncytial est d'épaisseur très irrégulière. A l'autre pôle, la fusion cytoplasmique entre énergides et périplasme est achevée si bien que l'épaisseur du blastoderme est devenu régulière (Fig.8b). Ensuite le blastoderme syncytial acquiert sur l'ensemble de l'œuf une épaisseur uniforme (Fig. 9a et 9a'). Nous notons alors l'apparition d'un nucléole dans les noyaux blastodermiques.

Quelques énergides ne participent pas à la colonisation du périplasme et restent dans le vitellus: ce seront les vitellophages primaires. Leurs noyaux acquièrent eux-aussi un nucléole.

La cellularisation du blastoderme se réalise au cours du 3<sup>ème</sup> jour. Simultanément les noyaux continuent à se multiplier. La plupart des fuseaux achromatiques sont orientés parallèlement à la surface de l'œuf si bien que le nombre de cellules blastodermiques augmente. Toutefois quelques fuseaux achromatiques sont perpendiculaires à la surface du blastoderme: à la fin de la mitose la cellule fille la plus interne se trouve dans le vitellus et sera un vitellophage secondaire (Fig. 9a). Celui-ci a le même aspect que les vitellophages primaires.



**Fig. 7 : Multiplication nucléaire intravitelline**

**a:** Zone périphérique d'un œuf peu après la ponte, montrant un périplasme (p) mince. (X400)

**b - c:** Zone périphérique dans la région équatoriale d'un œuf, 24 h après la ponte; le périplasme (p) est plus épais qu'au moment de la ponte. (X 500)

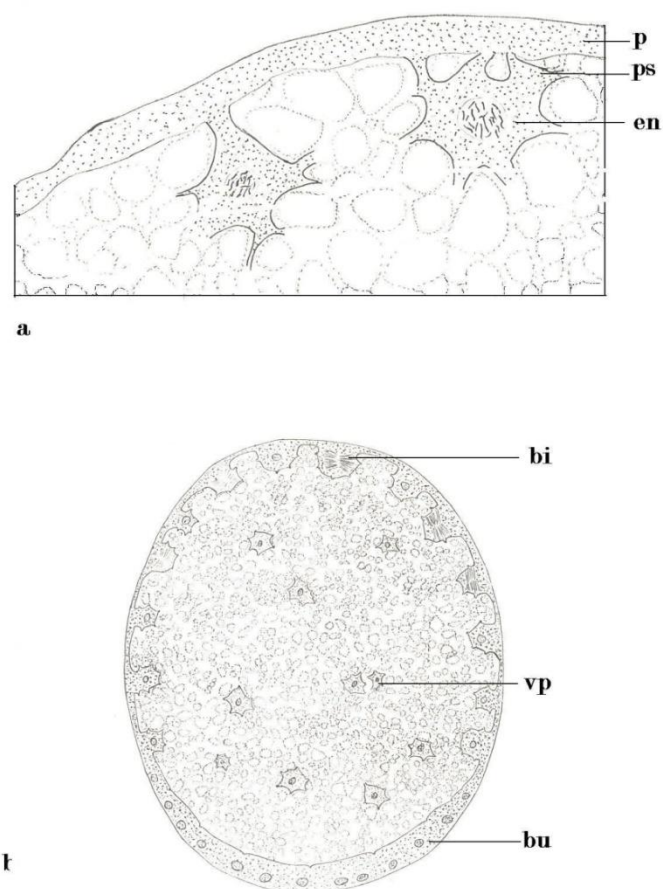
( en: énergide; gv: granule vitellin ; mv: membrane vitelline; v vitellus)

### **C. Edification de l'ébauche embryonnaire**

Le blastoderme est initialement d'une épaisseur uniforme. Très rapidement il est l'objet de mouvements morphogénétiques; les déplacements cellulaires entraînent la formation de deux bandes latérales aux cellules légèrement plus hautes que les cellules des régions médio-ventrale et médio-dorsale de l'œuf. Les mouvements cellulaires se poursuivant vers la région dorsale aboutissent à l'édification d'une ébauche embryonnaire caractérisée par des cellules tassées et assez hautes.

L'ébauche embryonnaire occupe la face dorsale de l'œuf, la future région céphalique se situant au pôle postérieur. Le territoire extra-embryonnaire est représenté par une séreuse mince à cellules très étalées.

Dans l'ébauche embryonnaire les cellules situées le long de la ligne médiane prennent une forme en coin caractéristique et migrent vers l'intérieur. Elles correspondent au mésoderme. En même temps que se réalise la gastrulation, se forme les replis amniotiques. Ils apparaissent d'abord au niveau de la région antérieure de l'ébauche embryonnaire, puis ils s'étendent sur l'ensemble de l'embryon. Celui-ci est ainsi protégé par une cavité amniotique. (Fig. 9b).



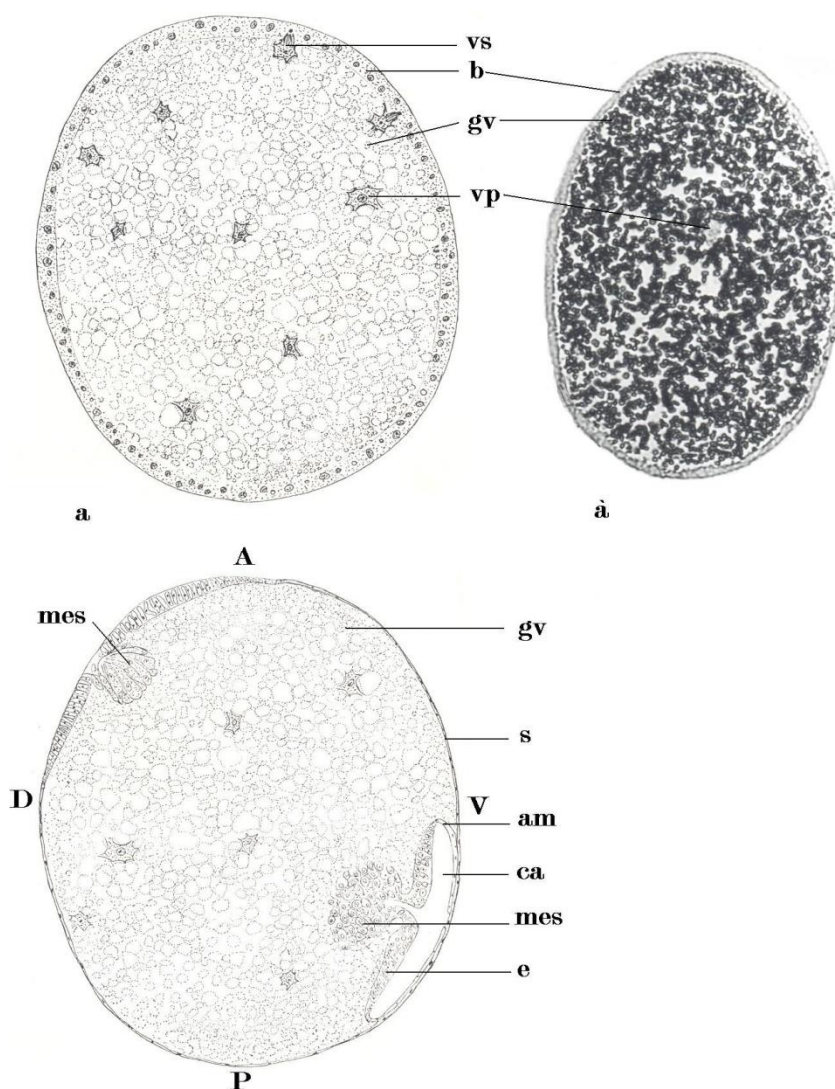
**Fig. 8 : Colonisation du périplasma par les énergides.**

**a** - Fusion des énergides (en) avec le périplasma (p) au 2<sup>ème</sup> jour après la ponte.  
(X 600)

**b** - Coupe longitudinale d'un œuf au 2<sup>ème</sup> jour après la ponte montrant un blastoderme

syncytial d'épaisseur irrégulière avec des énergides encore individualisées (bi) à un

pôle et un blastoderme syncytial uniforme (bu) à l'autre pôle de l'œuf. (X 100)  
(ps : pseudopode, v : vitellus, vp : vitellophage primaire)



**Fig. 9 : Formation du blastoderme et de l'ébauche embryonnaire**

**a - a'** - Coupes longitudinales au stade blastoderme syncytial uniforme. Quelques énergides ne participent pas à la colonisation du périplasme, ce sont les vitellophages primaires (vp). Des cellules filles issues du blastoderme se retrouvent dans le vitellus, ce sont des vitellophages secondaires (vs). (X100)

**b** - Coupe longitudinale d'un œuf lors de la gastrulation; une cavité amniotique est formé au niveau de la région céphalique située ventralement vers le pôle postérieur; les cellules mésodermiques migrent vers l'intérieur. (X100)

(a : amnios, b : blastoderme, ca : cavité amniotique, e : ectoderme, gv: granules vitellin, mes : mésoderme, s : séreuse, v : vitellus)

(A, P, D, V : Pôles antérieur et postérieur, faces dorsale et ventrale)

#### **D. Allongement et segmentation de la bandelette embryonnaire**

L'ébauche embryonnaire, lorsqu'elle apparaît, s'étend sur les 3/5 de la longueur de l'œuf. Sa partie élargie qui correspond aux lobes procéphaliques coiffe le pôle postérieur tandis que son extrémité postérieure est relativement proche du pôle antérieur. Cette région postérieure représente une zone de bourgeonnement de segments (Fig.6 A, a).

L'évolution est rapide. Au 4<sup>ème</sup> jour (Fig.6 A, b) qui suit la ponte l'ébauche embryonnaire est une bandelette allongée et segmentée. Elle s'étend dorsalement sur toute la longueur de l'œuf et contourne le pôle postérieur si bien que les lobes procéphaliques prennent une position ventrale. Ceux-ci portent une paire de petites ébauches antennaires; l'invagination stomodéale se creuse. En arrière des lobes procéphaliques, le segment intercalaire porte deux petits épaissements latéraux qui disparaîtront rapidement. Ceux-ci correspondraient donc aux ébauches appendiculaires du segment intercalaire. Les segments gnathaux sont pourvus chacun d'une paire d'ébauches. Les ébauches des mandibules sont plus petites que celles des maxilles et du labium. Les segments thoraciques portent chacun une paire d'ébauches appendiculaires. Les ébauches des pattes plus développées que celles des pièces buccales s'étendent latéralement. 9 à 10 segments abdominaux sont délimités.

Sur les coupes histologiques, le feuillet externe ou neurectoderme est constitué de cellules toutes d'apparence semblable. Le mésoderme est une lame relativement épaisse, s'étendant sous le neurectoderme.

Le vitellus sous l'embryon prend un aspect différent: à côté de granules vitellins fortement colorés en rouge par l'azan, des granules bleuâtres sont observés, ils correspondent vraisemblablement aux paracytes décrits par Heymons, (1895) chez *Forficula*.

La bandelette embryonnaire atteint son élongation maximale au cours du 5<sup>ème</sup> jour qui suit la ponte (Fig.6 A, c). Sur l'ébauche céphalique, un labre masque désormais l'orifice stomodéal. Les antennes se sont allongées et s'étendent jusqu'à la limite mandibulo-maxillaire.

Les ébauches appendiculaires du segment intercalaire ne sont plus visibles. Les ébauches mandibulaires gardent une forme arrondie alors que celles des maxilles et du labium sont devenues nettement bilobées. Les ébauches des pattes ont maintenant leur extrémité dirigée vers le plan sagittal de l'embryon. Tous les segments abdominaux sont présents et l'invagination proctodéale est nettement visible (Fig.10 a). De petites ébauches appendiculaires apparaissent sur les 9 premiers segments abdominaux. Le 10<sup>ème</sup> segment abdominal porte une paire d'ébauches appendiculaires de grande taille; ce sont les futurs cerques; ceux-ci sont dirigés vers l'avant de l'embryon.(Fig.6 A, c)

L'amnios qui recouvre l'embryon reste mince, avec des cellules très étirées. La séreuse, elle, est une enveloppe plus épaisse qu'aux stades précédents, ses noyaux possèdent un ou deux gros nucléoles (Fig.10 b).

La neurogenèse a débuté: dans le feuillet externe ou neurectoblaste, les cellules les plus externes ont un noyau allongé parallèlement à la surface, et elles seront les futures cellules épidermiques. Les neuroblastes se distinguent aisément par leur grande taille. Ils se sont déjà divisés plusieurs fois, produisant chacun plusieurs cellules ganglionnaires situées dans la partie la plus interne du neurectoblaste.

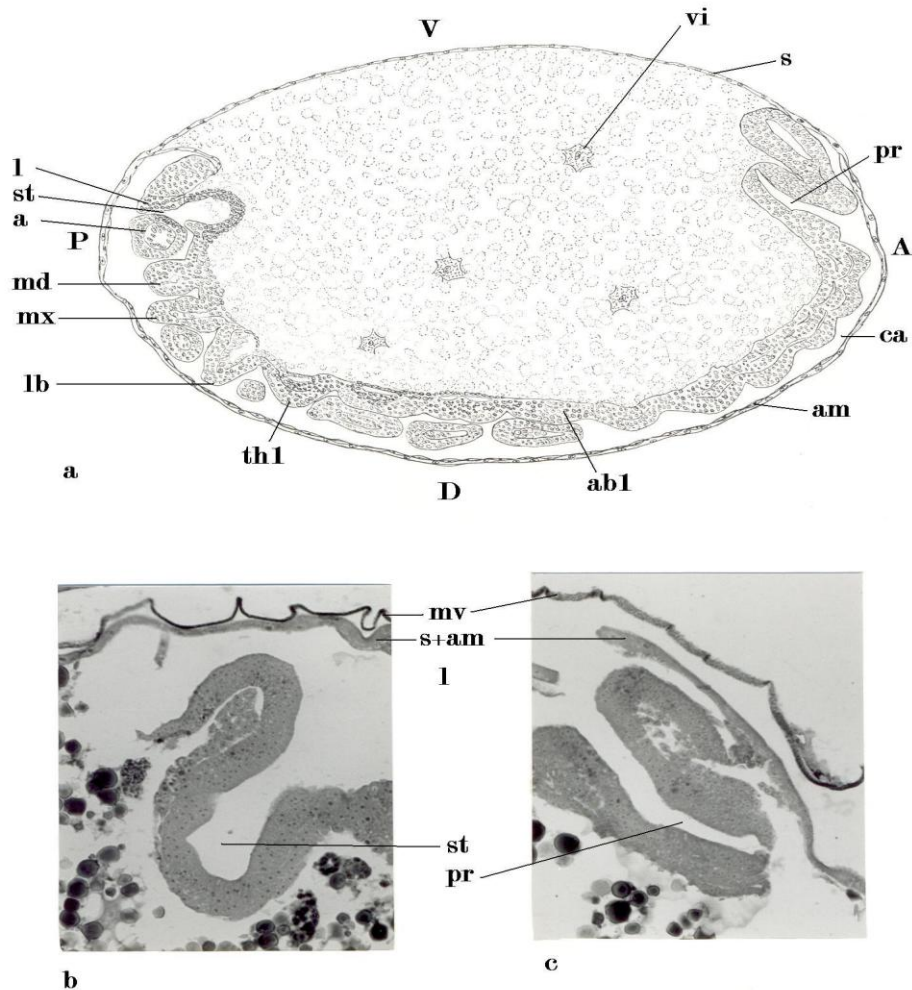
Au sein du mésoderme sont apparues les vésicules cœlomiques (Fig.11.) Les vésicules cœlomiques antennaires sont bien développées; du mésoderme pénètre dans les ébauches antennaires. Nous retrouvons ceci au niveau des segments thoraciques. Dans l'abdomen les vésicules cœlomiques sont de section ovale et à paroi assez épaisse.

Les invaginations stomodéale (Fig.10b) et proctodéale (Fig.10c) sont profondes, doublées d'une lame mésodermique continue; il n'y a encore aucune mise en place du mésentéron.

### **E. Fermeture dorsale et achèvement de l'organogenèse.**

vers la fin du 5<sup>ème</sup> jour et le début du 6<sup>ème</sup> jour (Fig.6 A, d) qui suit la ponte, la bandelette se raccourcit et en même temps, elle devient plus large. La forme de la tête se précise: les ébauches oculaires sont désormais visibles. Les antennes ont migré vers l'avant et leur base se situe maintenant en avant du labre; elles se sont allongées si bien que leur extrémité atteint la limite gnatho-thoracique. Les mandibules sont légèrement bilobées; les maxilles et les deux ébauches labiales sont encore distantes de l'orifice stomodéal. Ces deux paires d'appendices gnathaux présentent des palpes déjà assez longs.





**Fig. 10: Vésicules cœlomiques et Invaginations stomodéale et proctodéale.**

**a** - section légèrement parasagittale d'une bandelette embryonnaire de 5 jours, stomodeum (st) et proctodeum bien ébauchés. (X125)

**b - c** - Détails au même stade qu'en (a) des invaginations stomodéale (st) et proctodéale

(pr). Remarquer l'épaississement de la séreuse (s). (X600)

(a : antenne, ab1: 1<sup>er</sup> segment abdominal, am : amnios, ca : cavité amniotique, lb

:

labium, md : mandibule, mv : membrane vittelline, mx: maxille, s : séreuse, th1:  
1<sup>er</sup>

segment thoracique, v : vitellus, vi : vitellophage, l : labre)

(A, P, D, V : Pôles antérieur et postérieur, face dorsale et ventrale)

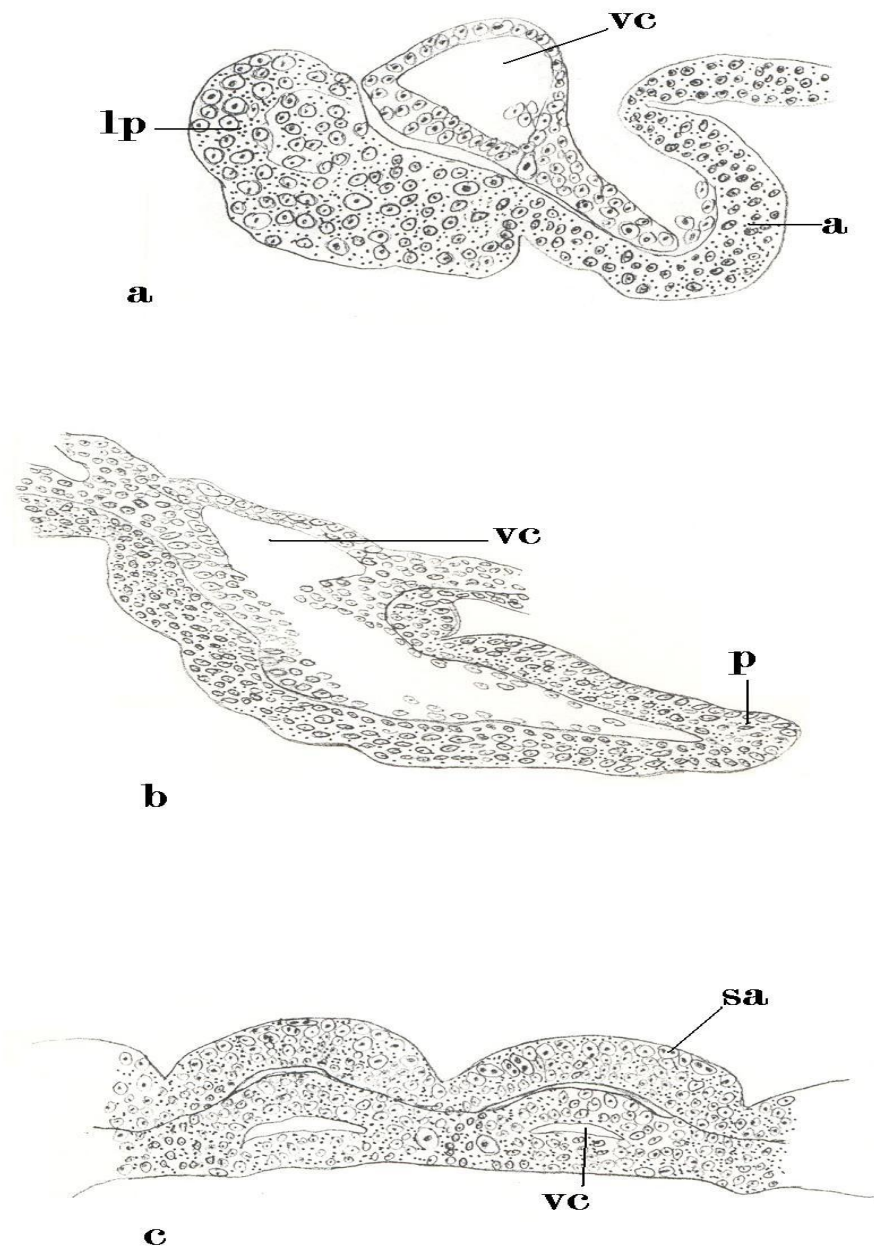
Les pattes, plus développées qu'au stade précédent présentent chacune 3 subdivisions. Les ébauches appendiculaires des 9 premiers segments abdominaux sont plus importantes qu'au stade précédent et présentent leur extrémité dirigée vers le plan sagittal de l'embryon. Les cerques qui appartiennent au 10<sup>ème</sup> segment abdominal, s'étendent vers l'avant jusqu'au 6<sup>ème</sup> segment de l'abdomen.

Les faits histologiques les plus marquants chez les embryons âgés de 5 à 6 jours concernent le système nerveux et le mésentéron. Les ganglions nerveux se sont individualisés, se séparant de l'épiderme. Dans les ganglions nous observons toujours la présence de gros neuroblastes, les axones des cellules ganglionnaires s'allongent vers le côté internes réalisant ainsi le neuropile (Fig. 12b, b').

Une lame de cellules épithéliales s'étale sur le vitellus et correspond à la mise en place du mésentéron (Fig.12 a). Elle est doublée par un mésoderme splanchnique très mince.

La catatrepsis s'effectue au cours du 6<sup>ème</sup> jour, elle amène l'embryon à sa place définitive, sur le côté ventral avec la tête au pôle antérieur et l'extrémité postérieure à l'autre pôle. La séreuse est refoulée par les mouvements de l'embryon et se rassemble en arrière de la tête (Fig. 6 Be).

L'embryon poursuit son étalement vers le côté dorsal, entourant peu à peu le vitellus. Au cours du 7<sup>ème</sup> jour la fermeture dorsale n'atteint que les derniers segments abdominaux.



**Fig.11 : Vésicules cœlomiques au 5<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire**

- a** - Vésicule cœlomique antenne
- b** - Vésicule cœlomique thoracique
- c** - Vésicule cœlomique abdominale à paroi épaisse  
(sections parasagittales) (X 600)

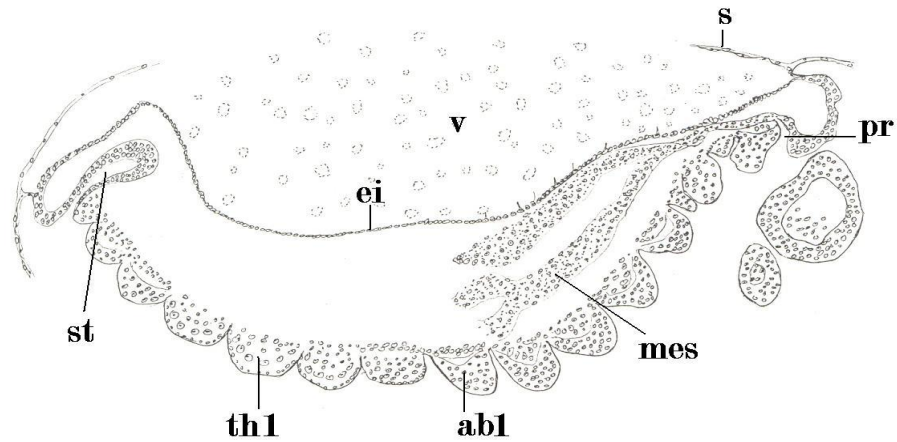
(a : antenne, lp : lobe procéphalique, p : patte, sa : segment abdominal, vc: vésicule coelomique)

Au 7<sup>ème</sup> jour qui suit la ponte (Fig. 6e), les embryons ont une forme assez trapue. Leur tête qui s'est nettement élargie porte des yeux composés saillants et faiblement pigmentés. Les antennes sont longues, leur extrémité rejoignant celle des cerques; bien qu'ils ne soient pas entièrement délimités on peut distinguer 5 articles antennaires dont les deux premiers sont courts. Le labre apparaît comme un lobe assez allongé. Les pièces buccales ont acquis leur aspect caractéristique; elles migrent vers l'orifice stomodéal. Les mandibules présentent sur leur face intérieure deux légers renflements, correspondant à l'emplacement du processus incisif et à celui du processus molaire; les pointes incisives ne sont pas encore différenciées. Les maxilles sont formées de l'extérieur vers l'intérieur par les palpes, la *galea* et la *lacinia*. Le labium, est désormais impair par suite de la fusion des 2 ébauches. Il est constitué d'un submentum et d'un mentum impair ainsi que d'un prémentum qui reste pair, se prolonge par deux ligulae résultant de la fusion des glosses et des paraglosses et porte les deux palpes labiaux. Sur le plancher buccal est présent l'hypopharynx dont l'extrémité apparaît trilobée.

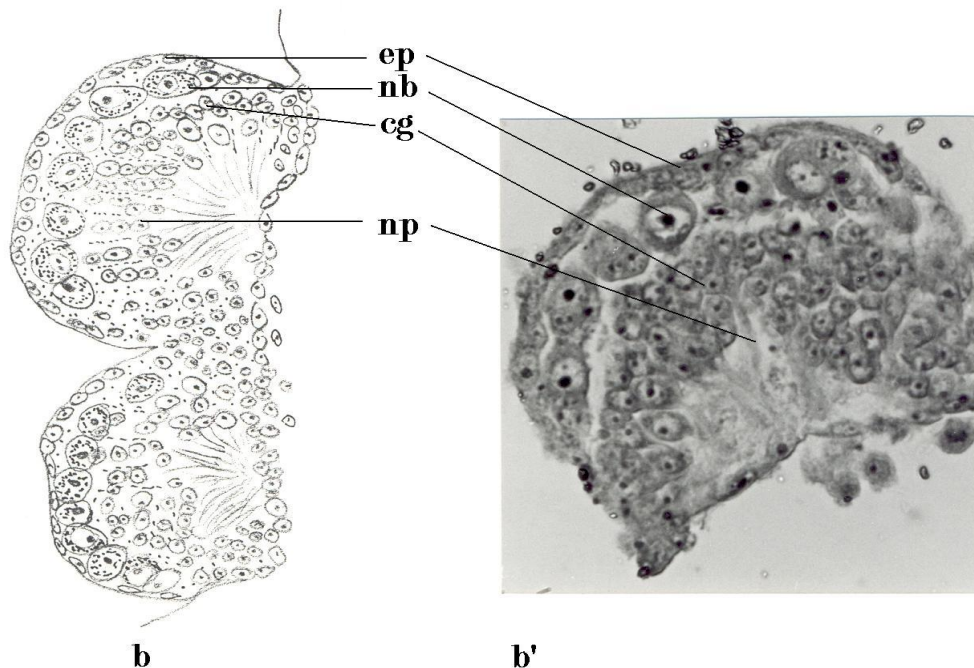
Les pattes sont bien développées et les tibias sont repliés sur les fémurs.

Les appendices abdominaux à l'exception des cerques ont disparu.

La fermeture dorsale de l'embryon s'achève au cours du 8<sup>ème</sup> jour (Fig. 6 A, f). La masse cellulaire formée par la séreuse et l'amnios à l'arrière de la tête est complètement incorporée dans le vitellus. Les pièces buccales de l'embryon sont proches de leur emplacement définitif. L'hypopharynx acquiert une pigmentation au niveau des zones apicales; les deux pièces qui forment le prémentum prennent leur forme définitive. Les organes et tissus ont acquis leurs caractéristiques histologiques (Fig. 13a). Dans le système nerveux nous n'observons plus de neuroblastes. Les neuropiles bien développés sont complètement entourés de cellules ganglionnaires (Fig. 13b). Les muscles ont acquis leur striation. L'épithélium intestinal est formé de cellules relativement hautes (Fig. 13b'); il pourrait être déjà fonctionnel car le vitellus situé dans la lumière du mésentéron n'est plus constitué que de rares granules entourés d'un coagulum coloré en bleu par l'azan.



a



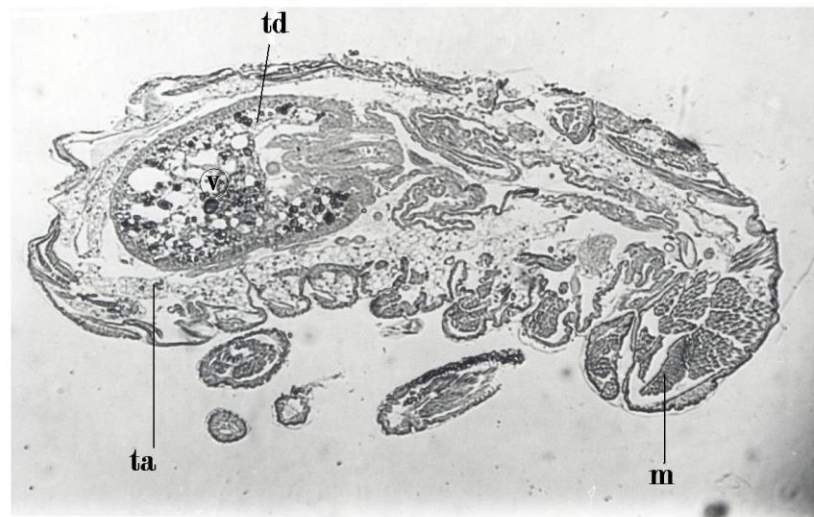
b

b'

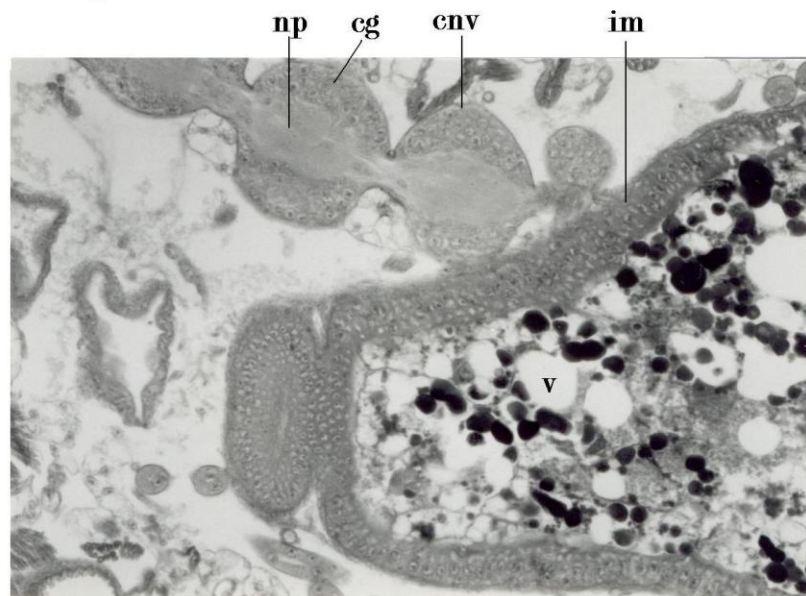
### Fig.12 : Epithélium intestinal et ganglions thoraciques

**a** - Coupe parasagittale au 6<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire montrant en partie la mise en place de l'épithélium intestinal (ei) (X110)

**b - b'** - Section longitudinale des ganglions thoraciques d'un embryon au 6<sup>ème</sup> jours. (X 600)(ab1 : 1<sup>er</sup> segment abdominal, ep : epiderme ; g : cellule ganglionnaire fille des Neuroblastes, mes : mésentéron, nb: neuroblaste, np: neuropile, pr : proctodeum, s : séreuse, st : stomodeum, th1 : 1<sup>er</sup> segment thoracique, v : vitellus)



a



b

**Fig. 13 : Coupe parasagittale d'un embryon avant éclosion**

**a** - Coupe parasagittale d'un embryon de 9 jours dont la formation est achevée. (X 100)

**b** - Détail d'une coupe longitudinale d'un embryon de 9 jours, montrant la chaîne nerveuse ventrale (cnv) et l'intestin moyen (im) contenant le vitellus. (X 600)

(cg : cellules ganglionnaires, m : muscles, np: neuropile td : tube digestif, ta : tissu adipeux, v: vitellus)

La fin du développement est caractérisée surtout par la croissance de l'embryon. Celui-ci s'allonge beaucoup si bien que son abdomen se replie et les cerques s'étendent jusqu'à la base des antennes. Les yeux bien pigmentés, les parties apicales des mandibules et de la *lacinia* sclérotinisées apparaissent par transparence sous la membrane vitelline et le chorion.

Les éclosions d'une même ponte peuvent s'étaler sur une journée, commençant à la fin du 9<sup>ème</sup> jour et se poursuivant pendant le 10<sup>ème</sup> jour d'incubation.

### III. Discussion

Nous avons à partir de notre étude histologique, morphologique des œufs entier et des embryons chez *L. riparia* préciser à une dizaine d'heure près les phases de développement dont on peut retenir principalement:

L'apparition de l'ébauche de la bandelette embryonnaire au 3<sup>ème</sup> jour après la ponte;

Le gonflement de l'œuf par absorption d'eau au 4<sup>ème</sup> jour;

L'amorce de la fermeture dorsale et la pigmentation des yeux au 7<sup>ème</sup> jour.

Les dimensions des œufs à la ponte observées ici sont proches de celles obtenues par Olivier, (1984) et restent inférieures à celles publiées par Caussanel, (1975) qui sont de 1,25 à 1,40 mm de grand axe et 1 à 1,5 mm de petit axe. Le poids également est différent de celui déterminé par Caussanel qui varie entre 0,80 et 0,90 mg. Ces différences de résultats peuvent être expliquées par les modifications des conditions d'élevage, de température, de nourriture qui ont pu varier de manière quantitative ou qualitative depuis 1975. La forme et les changements de taille des œufs observés au cours du développement embryonnaire nous permettent de dater approximativement les œufs. D'autres critères tel que la pigmentation des yeux qui débute vers la fin du 7<sup>ème</sup> jour et progresse jusqu'à l'éclosion peut également nous indiquer l'âge des embryons.

*Labidura riparia* présente des œufs au périplasme mince mais visible. Le développement embryonnaire que nous avons étudié chez cet Insecte est moyennement long au début. En effet la phase de la formation de la bandelette embryonnaire comportant la multiplication nucléaire, la cellularisation blastulaire et la gastrulation, dure près de trois jours, sur une durée totale du

développement embryonnaire qui est de dix jours. L'ébauche embryonnaire est semi-longue comme chez le genre *Forficula* décrit par Heymons (1895). L'embryon conserve une position superficielle durant toute la durée de son développement. Ce type d'évolution est observé chez les blattes, particulièrement *B. craniifer* (Bullière, 1970). D'une façon générale il est connu d'après Haget, (1977) que les embryons qui apparaissent d'emblée très grands, sont observés chez les Insectes au périplasme épais. Également, il est constaté un caractère très primitif des ébauches embryonnaires en petit écusson et un caractère évolué des ébauches allongées d'emblée.

L'ébauche embryonnaire au troisième jour comporte une région céphalique, une zone de bourgeonnement en forme de spatule élargie, le blastème et entre les deux une région qui pourrait correspondre à la région gnathale. Le manque de stades intermédiaire ne nous permet pas de confirmer si la segmentation de la bandelette s'effectue dans la région thoracique.

Il est à remarqué les petites ébauches des segments intercalaires, caractère primitif chez les Insectes. Ceux-ci demandent une étude histologique plus approfondie.

Tous les segments abdominaux des embryons de *L. riparia* portent des appendices; seuls les appendices du dernier segment persistent et évoluent en cerques. Les ébauches appendiculaires abdominales apparaissent au 5ème jour et disparaissent au 7ème jour au moment de la fermeture dorsale. Les embryons de certains Insectes, comme à titre d'exemple *Apis* ne possèdent aucun appendice abdominal, (Nelson, 1915 in Haget, 1977).

L'embryon chez *L. riparia* reste superficielle même au cours de la blastocinèse. Celle-ci n'est pas aussi complexe que celle observée chez d'autres espèces, comme *Xiphidium ensiferum* (Haget, 1977) ou *Locusta migratoria* (Petavy, 1979). Le mouvement de catatrepsis se produit chez *L. riparia* entre le 6ème et le 7ème jour. Ce mouvement est rapide et ne dure probablement que quelques heures. Chez les gryllides, Grellet, (1971) a montré que la catatrepsis de *Scapsipedus marginatus* élevé à 30°C ne dure que 4 heures pour un développement embryonnaire de 18 jours.

Enfin, notons le gonflement de l'œuf débutant au 4ème jour de développement embryonnaire et se poursuivant progressivement avant la blastocinèse.

A la lumière de nos résultats nous pouvons conclure que *L. riparia* ne présente pas des caractères de développement embryonnaire d'Insectes évolués. Notre espèce présente plutôt un développement intermédiaire entre celui des Insectes à ébauche embryonnaire courte et celui des Insectes à ébauches embryonnaire longue.



### CHAPITRE III

#### DEGRADATION ET UTILISATION DU VITELLUS AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Chez la majorité des Insectes, le développement embryonnaire dépend du prélèvement par les ovocytes des protéines synthétisées dans le tissu adipeux au cours de la vitellogenèse à partir de l'hémolymphe (Englemann, 1979). Ces protéines appelées vitellines, souvent spécifiques des femelles sont synthétisées sous la forme de vitellogénines.

La présence d'une protéine vitellogénines dans l'hémolymphe des femelles s'accumulant dans les ovocytes a été montrée chez de nombreux Insectes. A titre d'exemple chez *L. migratoria* (Chen et al. 1976), chez *B. germanica* (Kunkel et Pan 1976), chez *P. brassicae* (Lamy, 1967), et chez *A. aegypti* (Hagedorn et Kunkel 1979).

Chez *L. riparia* L'existence d'une protéine spécifique de la femelle en vitellogenèse est mise en évidence, Rouland et coll. (1981). Des études électrophorétiques en condition dénaturantes ont permis de séparer deux sous unités de cette vitellogénines: F1 et F2 de poids moléculaire respectif de 250kD et 60kD (Rouland, 1979 et Rouland et coll, 1981)

L'ovaire synthétise également comme le tissu adipeux une protéine retrouvée dans les ovocytes, chez *B. mori* (Ono et al. 1975) *H. cecropia* (Bast et Tefler, 1976) et *A. aegypti* (Borovsky et van handel, 1979). Différents termes sont utilisés pour désigner cette protéine; protéine spécifique des œufs, ou paravitellogénines ou protéine spécifique des ovaires.

Chez *L. riparia* la protéine spécifique des ovaires de 28 kD est synthétisée constamment en période de vitellogenèse comme en période de repos ovarien (Breuzet, 1990)

Il est admis que la dégradation des vitellines est corrélée avec les différentes phases de développement de l'embryon. Ceci est démontré chez *L. migratoria* (Gregore et Loughton 1974), chez *P. americana* (Storella et Kunkel 1985), chez *C. erythrocephala* (Mendes et Schoeller-Raccaud, 1986) chez *Bombyx mori* (Indrasith et al 1987). Si beaucoup de travaux sont effectués sur la vitellogenèse, très peu sont menés sur la dégradation et l'utilisation des vitellines au cours du développement embryonnaire. (Mc Gregor and Loughton, 1974, 1977; Bownes et Hames 1978; Storella et al. 1985), HASS et al 2003). Dans notre cas et après avoir établi l'embryogenèse de *L. riparia* nous examinons l'évolution des protéines ovocytaires par analyse électrophorétiques et des dosages par la méthode BRADFORD, (1976). Sachant que les réserves protéiques utilisables par l'embryon au cours de son développement sont synthétisées dans le tissu adipeux ensuite libérées dans l'hémolymphe puis finalement accumulées dans les ovocytes, nous essayerons de mettre en évidence les différentes fractions protéiques dans ces tissus, travail réalisé en partie par Breuzet (1990) que nous compléterons.

## **I. ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU TISSU ADIPEUX, DE L'HEMOLYMPHE ET DE L'OVAIRE**

L'analyse des protéines présentes dans les œufs et leur évolution au cours du développement embryonnaire demande au préalable l'analyse des protéines des organes à l'origine de leurs synthèses chez les adultes. Ainsi, nous avons analysé les protéines du tissu adipeux, de l'hémolymphe et de l'ovaire chez les femelles en période de vitellogenèse des femelles en période de repos ovarien et celles du tissu adipeux et de l'hémolymphe des mâles, ceux-ci par électrophorèse sur gel polyacrilamide. Pour cela, nous avons mis en œuvre des analyses électrophorétiques couplées à des incorporations de traceurs radioactifs.

### **A. Vitellines et vitellogénines**

- **Electrophorèse en PAGE-SDS**

Les électrophorèses de broyats d'ovocytes en vitellogenèse, effectuées sur gel acrylamide à 10% mettent en évidence la présence de quatre fractions protéiques majeures que nous avons référenciées : O1, O2, O3, O4, auxquelles s'ajoute une fraction de moindre importance : PO (Fig.14) Les quatre premières fractions sont absentes des ovaires des femelles en période de repos ovarien, par contre seule la fraction PO est commune aux deux périodes du cycle. Leur poids moléculaire apparent, estimé par comparaison avec ceux de protéines standard (Pharmacia) ayant migré dans les mêmes conditions, se situent aux environs de : O1=155kD, O2=95kD, O3=75kD, O4=60kD et PO=28kD

La comparaison des électrophorèses d'ovaires de femelles en période de vitellogenèse, de tissu adipeux et d'hémolymphe de femelles au même stade révèle que, parmi ces cinq fractions protéiques ovocytaires, seules les deux fractions O1 et O4 commigrent à la fois avec des fractions de l'hémolymphe et du tissu adipeux. Les fractions O1, O4 et PO n'ont pas leurs correspondantes dans ces deux derniers tissus. Une autre fraction ovocytaire de moindre importance de poids moléculaire apparent de 115 kD migre au même niveau qu'une fraction présente à la fois dans l'hémolymphe et dans le tissu adipeux.

La comparaison des électrophorégrammes des tissus des femelles en cours de la vitellogenèse avec ceux de femelles en période de repos ovarien montrent que, chez ces dernières, les trois fractions protéiques O1, 115 kD et O4 sont absentes du tissu adipeux, de l'hémolymphe et de l'ovaire. Les électrophorèses réalisées à partir d'hémolymphe et de tissus adipeux de mâles ne révèlent jamais l'existence de fractions équivalentes à O1, 115kD et O4.

Il existerait ainsi et uniquement chez les femelles en période de vitellogenèse ces trois dernières fractions protéiques communes au tissu adipeux, à l'hémolymphe et aux ovaires. Ces fractions sont alors considérées comme des vitellogénines.

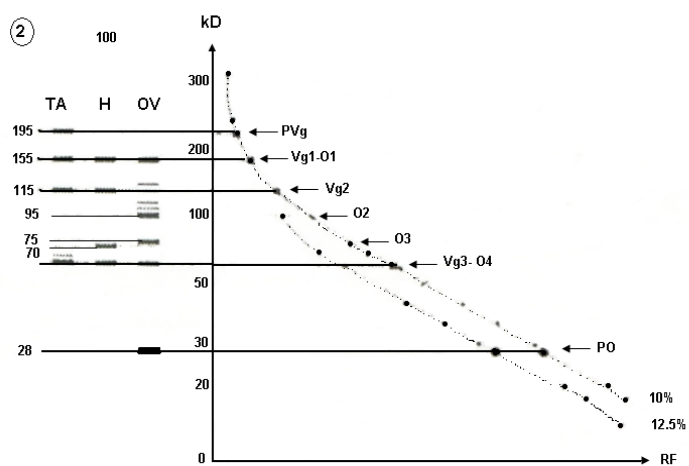
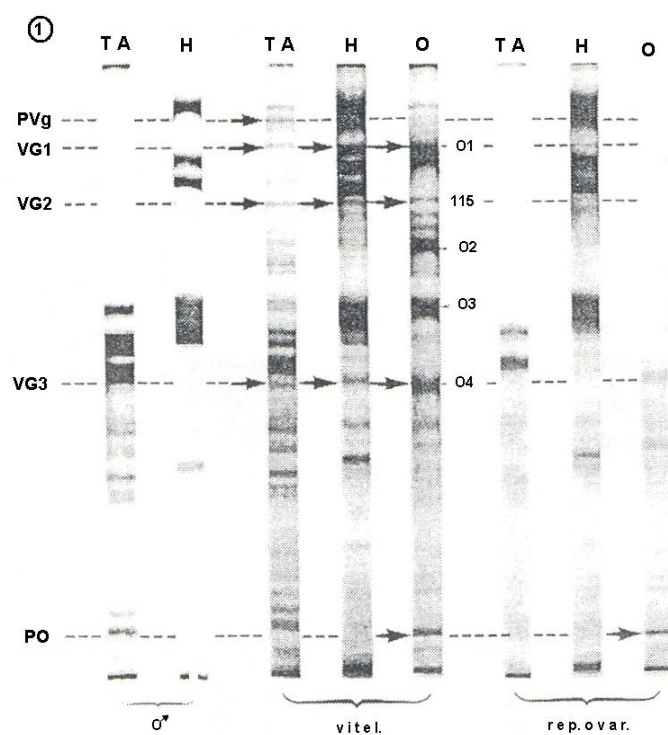
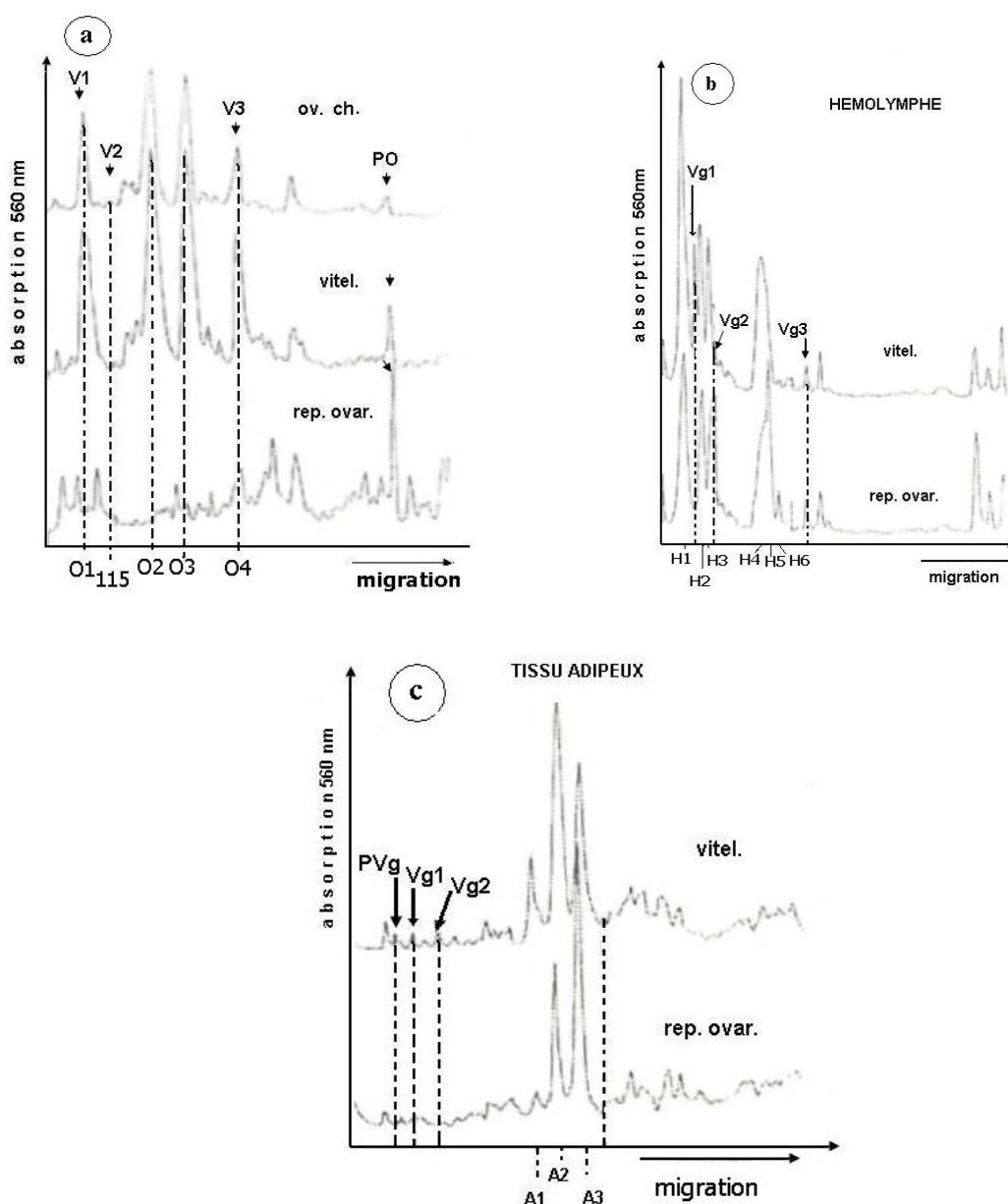


Fig. 14 : Mise en évidence des vitellogénines et des vitellines

1 Electrophorèse en PAGE-SDS de tissu adipeux et d'hémolymphe de mâle, de tissu adipeux, d'hémolymphe et d'ovaires de femelles en vitellogénèse et en période de repos ovarien.

2 Courbes de détermination des poids moléculaires des vitellogénines et des vitellines.

H : Hémolymphe ; O : Ovaire ; O1 à O4 : Protéines majeures de l'ovaire ; ov. ch. : ovocyte chorionné ; PVg : précurseur des vitellogénines ; TA : Tissu adipeux ; V1, V2, V3 : vitellines ; Vg1, Vg2, Vg3 : vitellogénines.



**Fig. 15 : Mise en évidence des vitellogénines et des vitellines**

Comparaison entre les enregistrements densitométriques d'électrophorogrammes des protéines de l'ovaire et d'ovocytes chorionnés (a), de l'hémolymphe (b) et du tissu adipeux (c) de femelles en période de vitellogenèse (vitel.) et de femelles en périodes de repos ovarien (rep. Ovar.) prises comme témoins.

(A1, A2, A3 : protéines majeurs du tissu adipeux ; H : Hémolymphe ; O : Ovaire ; O1 à O4 : Protéines majeures de l'ovaire ; ov. Ch. : ovocyte chorionné ; PVg : précurseur des vitellogénines ; TA : Tissu adipeux ; V1, V2, V3 : vitellines ; Vg1, Vg2, Vg3 : vitellogénines.)

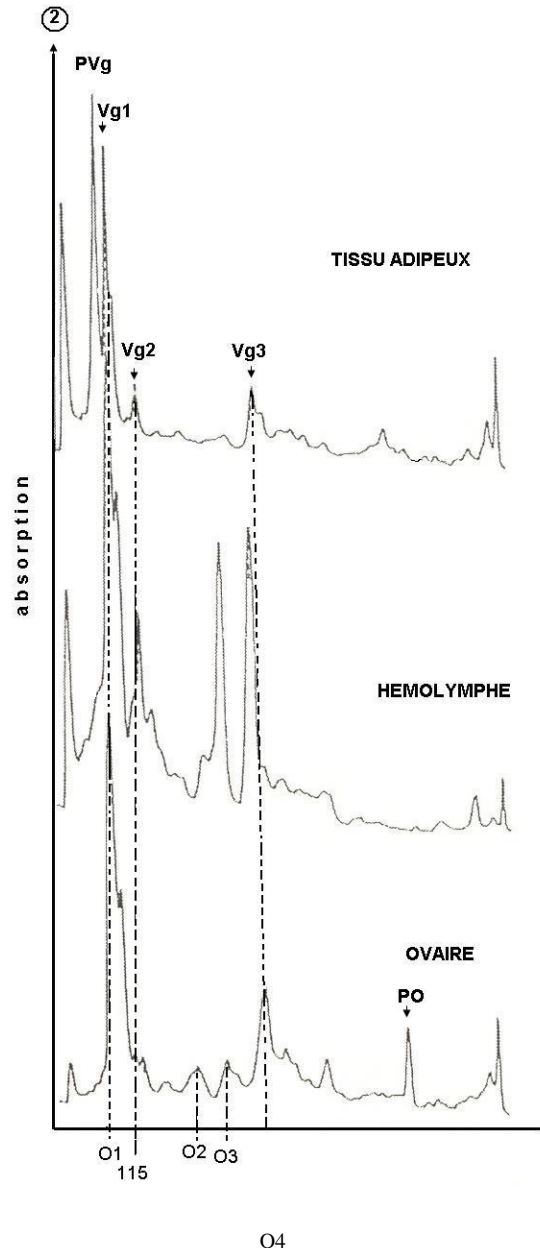
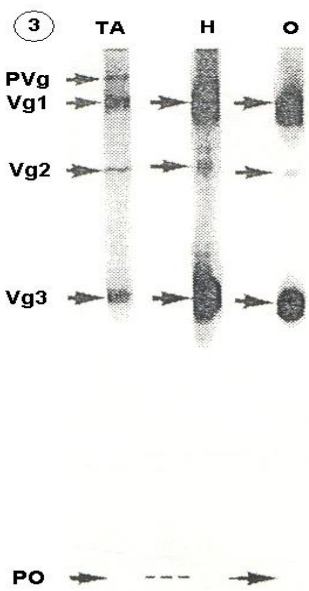
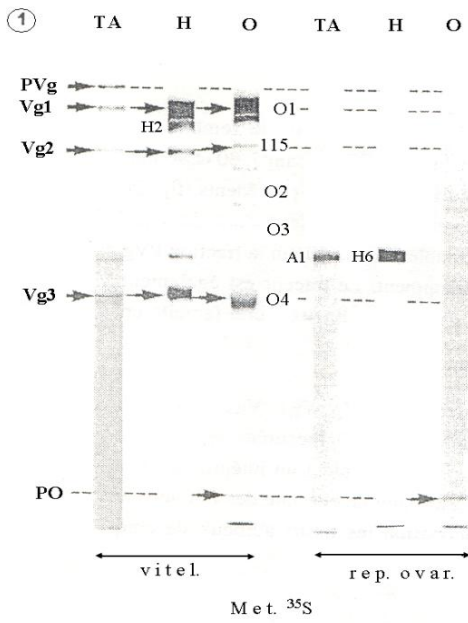
## B. Incorporation de Méthionine $^{35}\text{S}$ , *in vivo*

Nous avons procédé en confirmation des travaux réalisés par Breuzet (1990) à des incorporations *in vivo* de Méthionine  $^{35}\text{S}$  sur des femelles en période de vitellogenèse et sur des femelles en période de repos ovarien afin de clarifier l'origine des fractions O2 et O3 et de confirmer la nature de vitellogénines des autres fractions O1, 115 kD et O4. Le choix de temps d'incorporation de courte durée (1 heure) permet d'obtenir un marquage important des protéines à synthèse rapide.

La comparaison des autoradiogrammes des tissus de femelles en période de vitellogenèse avec ceux de femelles en période de repos ovarien confirme que les fractions O1, O2, O3, O4 et 115kD sont spécifiques des ovaires en vitellogenèse. Les fractions O1 et O4 sont fortement radioactives contrairement aux fractions O2, O3 et 115 kD. Parmi les fractions ayant incorporé le traceur radioactif, seul les fractions protéiques O1, 115kD et O4 coïncident avec des fractions du tissu adipeux et de l'hémolymphe, (Fig. 16 ; 1). Elles restent absentes des ovaires des femelles en période de repos ovarien et n'ont pas de correspondantes ni dans leurs tissu adipeux ni dans l'hémolymphe. Lorsque le temps d'incorporation est prolongé à 90 mn chez des femelles en période de vitellogenèse, on observe une intensification de la radioactivité dans les fractions O1 et O4. Par contre la fraction 115 kD de faible intensité ne s'accumule pas dans l'ovaire et la radioactivité s'accroît dans les fractions O2 et O3. (Fig. 16 ; 2)

Nous pouvons ainsi conclure que les fractions O1, 115kD et O4, spécifiques des ovaires des femelles en vitellogenèse, sont des vitellines. Leurs fractions

correspondantes dans l'hémolymphe et dans le tissu adipeux sont alors les vitellogénines.



**Fig. 16 : Incorporation de traceurs radioactifs dans les protéines du tissu adipeux, de l'hémolymphe et de l'ovaire.**

1. Autoradiogramme d'électrophorèse en Page-SDS de tissu adipeux (TA), d'hémolymphe (H) et d'ovaires (OV) de femelles en vitellogenèse (vitel) et en période de repos ovarien (rep. Ovar.), après 30 mn d'incorporation *in vivo* de Méthionine <sup>35</sup>S.
2. Enregistrement densitométrique d'autoradiogrammes d'électrophorèses en PAGE-SDS de tissu adipeux, d'hémolymphe et d'ovaires de femelles en vitellogenèse après 90 mn d'incorporation de Méthionine <sup>35</sup>S *in vivo*.
3. Autoradiographie d'électrophorèse de tissu adipeux (T.A), d'hémolymphe (H.) et d'ovaires de femelles en vitellogenèse (O.) après incorporation *in vivo* d'orthophosphate <sup>32</sup>P, pendant 30 mn.

Il existe ainsi chez *Labidura riparia*, trois vitellogénines : Vg1, Vg2 et Vg3 correspondant respectivement aux trois fractions protéiques ovariennes O1, 115kD et O4. Les vitellogénines Vg1 et Vg3 s'accumulent dans les ovocytes. La troisième, Vg2 bien que constamment incorporée doit être probablement modifiée lors de son incorporation. Cette dernière doit être un précurseur des fractions O2 et O3 qui s'accumulent dans les ovocytes alors qu'elles n'ont pas leurs correspondantes ni dans l'hémolymphe ni dans le tissu adipeux.

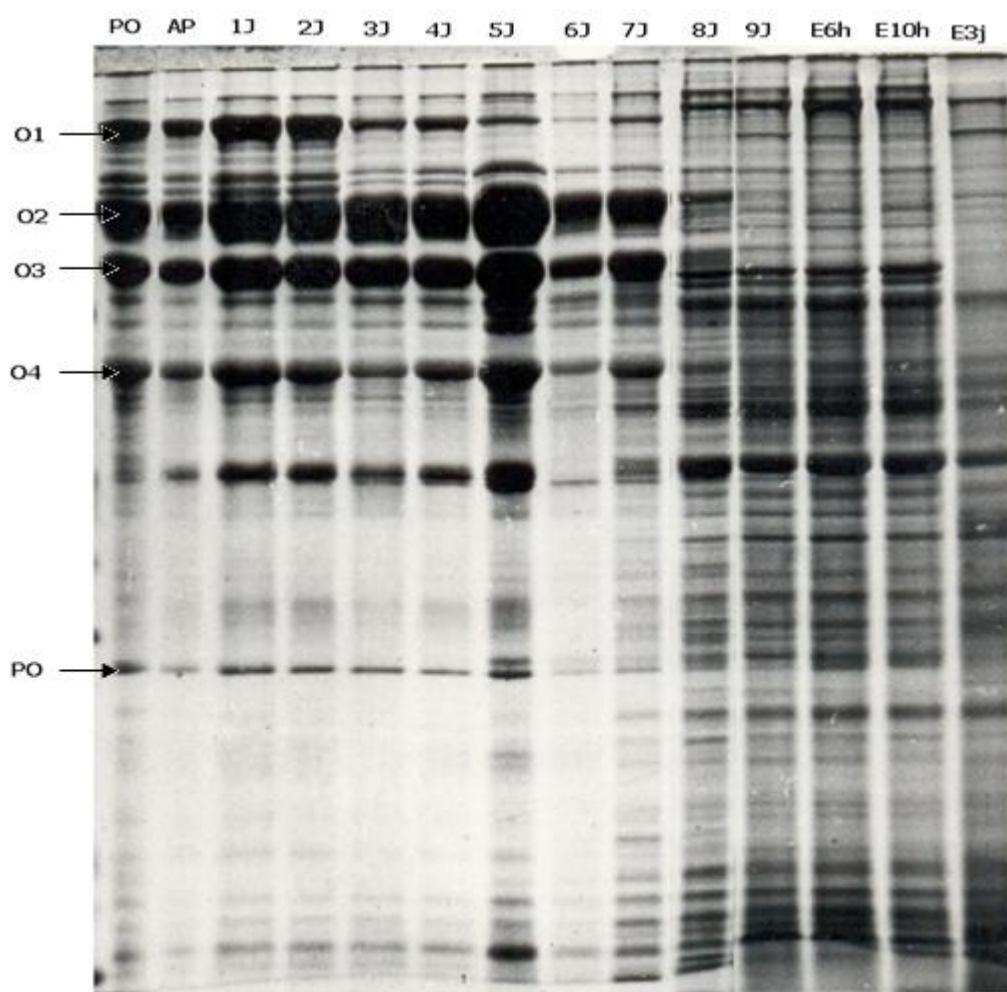
## **II. EVOLUTION DES PROTEINES DES ŒUFS AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE**

### **A. évolution à partir d'analyse électrophoretiques**

L'évolution des fractions protéiques du vitellus au cours des dix jours du développement embryonnaires est représentée par les électrophorogrammes (Fig.17). Nous retrouvons les quatre fractions majeures O1, O2, O3, O4, vitellines sur la première bande correspondant au broyat d'ovocytes en fin de vitellogenèse prélevés dans les oviductes au moment de la ponte ovulaire (PO). Les fractions O1 et O4 sont rapidement métabolisées. Les fractions O2 et O3 quant à elles, demeurent importantes et ne disparaissent qu'à l'éclosion des jeunes larves. La fraction PO de faible poids moléculaire, spécifique de l'ovaire, synthétisée en permanence dans les



follicules indépendamment de l'état physiologique de la femelle, Breuzet, (1990), persiste durant toute la période du développement, elle ne disparaît que durant les premières heures de la vie larvaire. Notons la présence de nombreuse fractions qui apparaissent à partir du sixième jour et persistent chez la larve à l'éclosion. Notons enfin qu'au delà du quatrième jour nous assistons à une apparition d'un nombre important de fraction protéiques de faible intensité et de faible poids moléculaire qui persistent jusqu'à l'éclosion.

**Fig.**

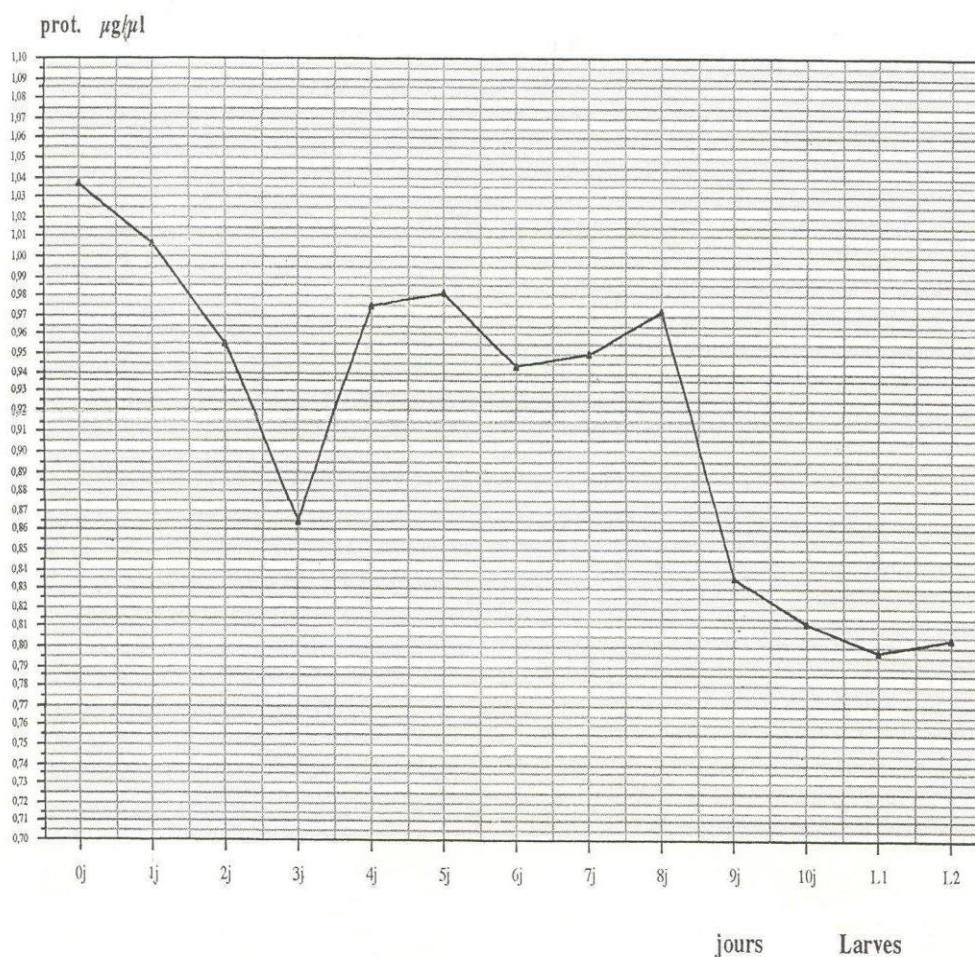
### 17 : Electrophorégramme de l'évolution des fractions protéiques du vitellus au cours du développement embryonnaire et jeune stade larvaire.

Les quatre fractions majeures O1, O2, O3 et O4 correspondant aux vitellines baissent progressivement au cours du développement. La fraction PO, persiste pendant toute cette période.

(AP : à la ponte ; PO : Ponte ovulaire ; E6 : Embryon de 6Heures ; E10h : Emryon de 10h ; E3j : Embryon de 3 jours)

#### B. Evolution à partir d'analyses par la méthode Bradford

Représenté sur la (Fig.18) le taux de protéine chez *L. riparia* à la ponte est d'environ 1  $\mu\text{g}/\text{œuf}$ . Nous observons une chute des protéines durant les premiers jours de développement; leur taux atteint ainsi environ 0,87 $\mu\text{g}/\text{œuf}$ . Au jour 5 le taux de protéine remonte légèrement pour se stabiliser autour de 0,95  $\mu\text{g}/\text{œuf}$ . Cette stabilité du taux de protéine se poursuit jusqu'au dernier jour de développement embryonnaire où il chute à environ 0,8 $\mu\text{g}/\text{œuf}$ . Ce taux est retrouvé chez les larves à l'éclosion à l'âge de 1 et 2 jours.



**Fig.18 : Evolution des protéines au cours du développement embryonnaire de *L. riparia***

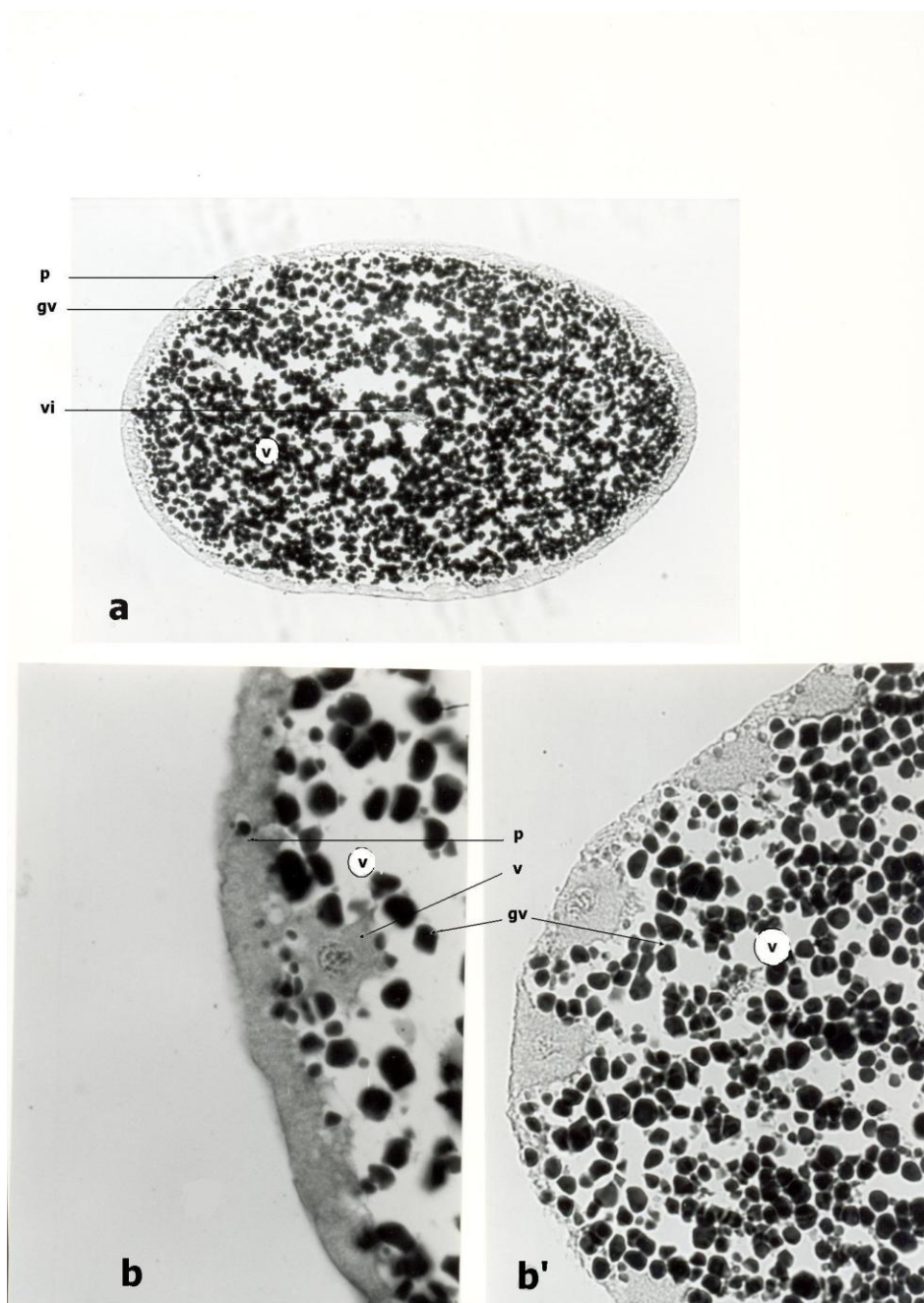
### **III. EVOLUTION DU SYSTEME VITELLIN**

Les modifications des réserves vitellines pendant le développement embryonnaire chez les insectes ont été analysées surtout par des méthodes biochimiques. Les changements qualitatifs et quantitatifs de la composition du vitellus de l'œuf du genre *Locusta* à titre d'exemple sont en partie connues, tant pour les lipides (Allais et al. 1964) que pour les glycoprotéines (Yamasaki, 1973 ; MC Gregor et Loughton, 1974). Contrairement à cela, les modifications de dimensions de la texture des inclusions n'ont pas été très étudiées. Cette insuffisance des connaissances sur l'évolution du système vitellin est imputable aux difficultés de l'histologie.

#### **A. Formation des vitellophages.**

La présence des cellules intra-vitellines dans l'œuf de nombreux arthropodes est connue depuis longtemps, leur rôle, traduit par le terme, Vitellophages, n'a été établi qu'en 1895 par Heymons, qui a fait la distinction entre génération primaire et secondaire.

La formation des vitellophages et leur densité est élevée sur les œufs durant les premiers jours après la ponte. Ils sont localisés en profondeur d'abord de l'œuf, (Fig.19a), ensuite ils s'orientent vers le périplasme (Fig. 19b et b') La formation des vitellophages et leur multiplication s'effectueraient selon Petayy, (1979) par la modification de leurs noyaux. En premier, quelques endormitose précoces confèrent une forte densité à la chromatine, ensuite les noyaux s'hypertrophient et se multiplient par division atypiques.



**Fig. 19 : Formation des vitellophages dans les œufs d'un jour de *L. riparia***

**a-** coupe longitudinale d'un œuf d'un jour montrant des vitellophages localisés en profondeur

**b- b'-** vitellophages ayant atteint le periplasme.

(gv : granule vitellin ; im : intestin moyen ; p : periplasme ; pr : proctodeum ; v : vitellus ; vi : vitellophage)

## **B. Segmentation vitelline**

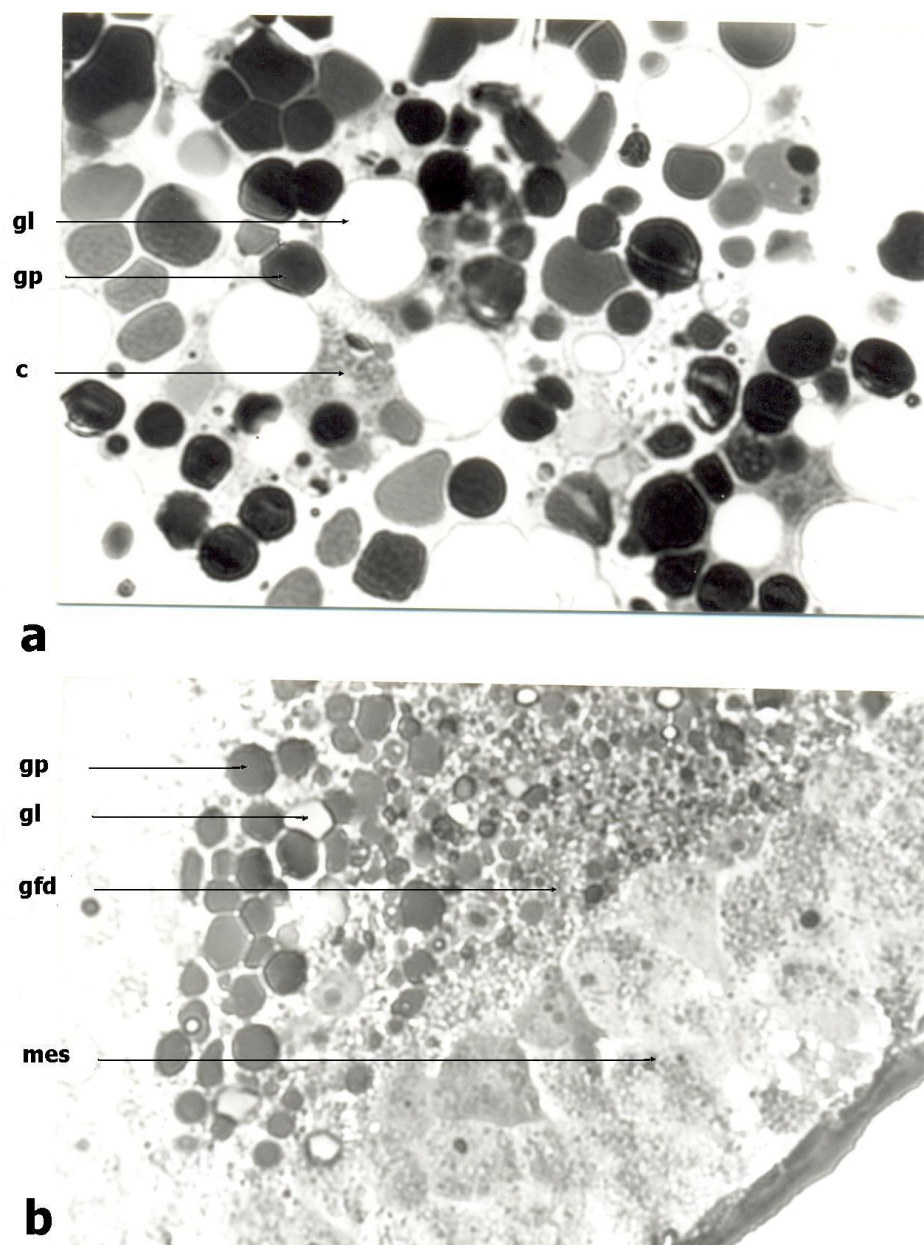
La segmentation de la masse vitelline des réserves est certainement liée à l'activité de vitellophage, (Petavy, 1979). La segmentation amène une réorganisation complète des rapports entre les inclusions et les cellules du système vitellin.

Au début, l'œuf à la ponte, comme observé dans nos coupes histologiques sériées (Fig. 20 b) les globules lipidiques (GL) et les granules protéiques (GP) sont serrés, le cytoplasme est tellement tenu qu'il n'est décevable qu'à proximité des noyaux vitellins. La situation change pendant la segmentation de la masse de réserves, le volume des cytoplasmes inter-vitellin s'accroît, la surface de contact entre celui-ci et les inclusions augmente.

La juxtaposition des franges cytoplasmique des polypodes facilite les échanges entre vitellophages adjacents. Cette architecture est observée chez les embryons âgés à partir des 5<sup>ème</sup> jour avant la fermeture dorsale.

## **C. Dégradation des granules protéiques.**

Les granules protéiques sont morcelés en inclusion de plus en plus petites. Ces altérations vitellines s'amplifient avec l'âge de l'embryon, soit par dégradation ou liquéfaction des granules. A proximité de la bandelette embryonnaire nous observons des extensions cytoplasmiques, particulièrement après le 5<sup>ème</sup> jour de développement, des fragmentations très poussés des granules (Fig. 20a). Cette structure des granules lipidiques très dégradées explique peut être les modalités du transfert du vitellus à l'embryon des diverses molécules de nutriments. Les cellules profondes de la jeune bandelette de l'embryon prélèveraient directement ces molécules dans le vitellus adjacent. Le transport de celle-ci serait réalisé en partie lors de l'achèvement de la formation de la bandelette grâce aux contractions du germe. Nous considérons donc que la dégradation des granules protéiques que nous observons sur les coupes histologiques semi-fines en coloration plus foncé que les granules lipidiques, sont morcelés en inclusion de plus en plus petites dès l'individualisation du germe (Fig.20b), puis certain d'entre eux, même les plus volumineux sont liquéfiés.



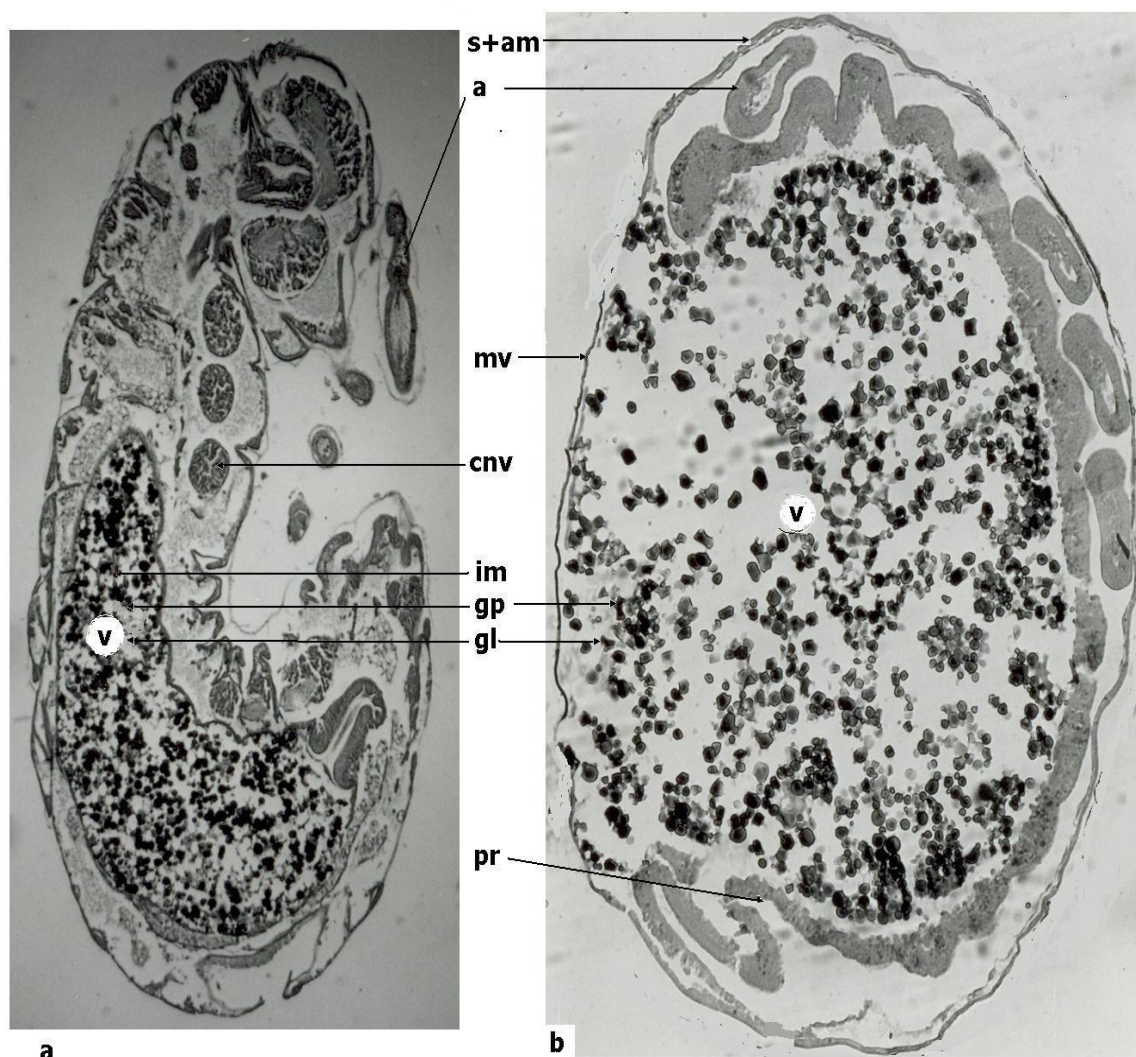
**Fig. 20 : Coupes histologiques d'œufs de *L. riparia* montrant la dégradation des granules vitellins.**

a- Extension cytoplasmiques

b- Dégradation intense des granules vitellins à proximité du germe.

C : expansion cytoplasmique ; gfd : granule fortement dégradé gl : granule lipidique ; gp : granule protéique ; mes : mésoderme; p : periplasme.

Les granules vitellins apparaissent plus tard, chez les embryons âgés de cinq jour et plus, espacés et aux contours très érodés. Les espaces sont certainement occupés par des extensions cytoplasmiques qui ne sont pas bien mis en évidence par nos préparation et ce par leur grande fragilité, (Fig 21 b). Le vitellus constitue les réserves nutritives de l'embryon étant donné que celui-ci renferme le vitellus restant dans l'intestin moyen à la fermeture dorsale, (Fig. 21b).



#### D. Dégradation des granules lipidiques

Dans le vitellus, la réduction du volume des globules lipidiques suit celles des globules protéiques mais ne présente pas les formes en polygone comme observées chez ces derniers. La réduction du volume des globules lipidiques, peut traduire une hydrolyse, une simple fragmentation physique ou les deux processus conjugué. Ainsi les globules lipidique apparaissent dispersés a mesure que la bandelette s'accroît.

**Fig. 21 : Coupe longitudinale d'embryons montrant la dégradation du vitellus durant les derniers stades de développement embryonnaire de *L. riparia***

- a- Vitellus enfermé dans l'intestin moyen de l'embryon après fermeture dorsale (x 40).
- b- Vitellus présentant des granules fortement érodés avant fermeture dorsale de l'embryon (x40).

(a : antenne ; cnv : chaîne nerveuse ventrale ; gl : granule lipidique ; gp : granule protéique ; im : intestin moyen ; mv : Membrane vitelline ; pr : proctodeum ; v : vitellus ; s+am : séreuse+amnios)

## VI. ACTIVITE LIPASIQUE

En complément à l'étude de l'évolution des lipides et des fractions protéiques lors du développement embryonnaire de *L. riparia*, nous étudions l'évolution des lipides à partir de mesure des activités lipasiques.

### A. Mise au point des différentes phases de la technique

Les mesures sont réalisées après avoir mis au point les différentes phases de la technique dont,

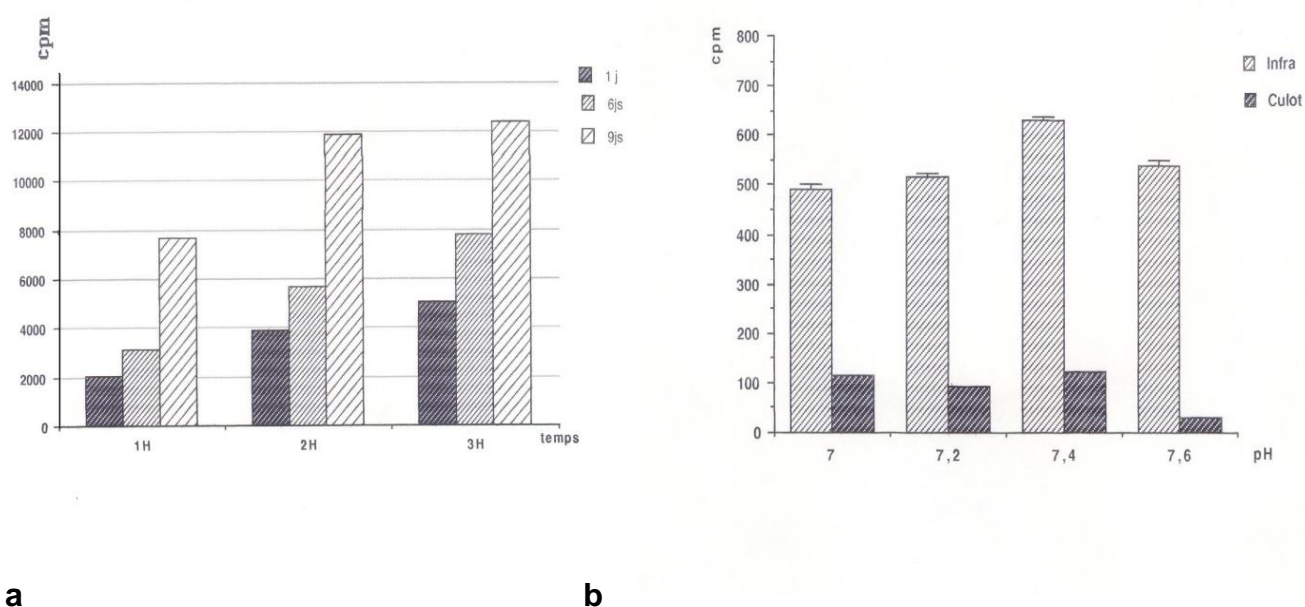
- La détermination du pH du tampon où l'activité lipasique est maximale.
- La détermination de la durée d'incubation d'activité maximale.
- Enfin la détermination d'activité entre le culot et le surnageant des solutions.

Les lipoprotéines représentent la principale forme de transport des lipides dans l'organisme.

La réaction utilisée pour étudier la lipase est l'hydrolyse de la trioleine. Cette réaction est réalisée en milieu tamponné et à température constante et favorable. On mesure la disparition du substrat en fonction du temps.



A cet effet, nous avons déterminé le pH où l'activité lipasique est optimum en appliquant la technique de Hiramaya et Chino (1987). Nous avons réalisé les analyses déterminant le pH optimum et le temps d'activité lipasique nécessaire pour les œufs d'1 jour, 6 jours et 9 jours, (Fig. 22).



**Fig. 22 : Test des techniques d'activité lipasique**

Détermination du pH optimum et vitesse d'activité lipasique dans des œufs de *L. riparia* à 1.2 et 3 h.

a. pH optimum d'activité enzymatique ( pH : 7 ;7.2 ;7.4 ;7.6)

b. Vitesse d'activité enzymatique des œufs a 1 h, 2h et 3 h.

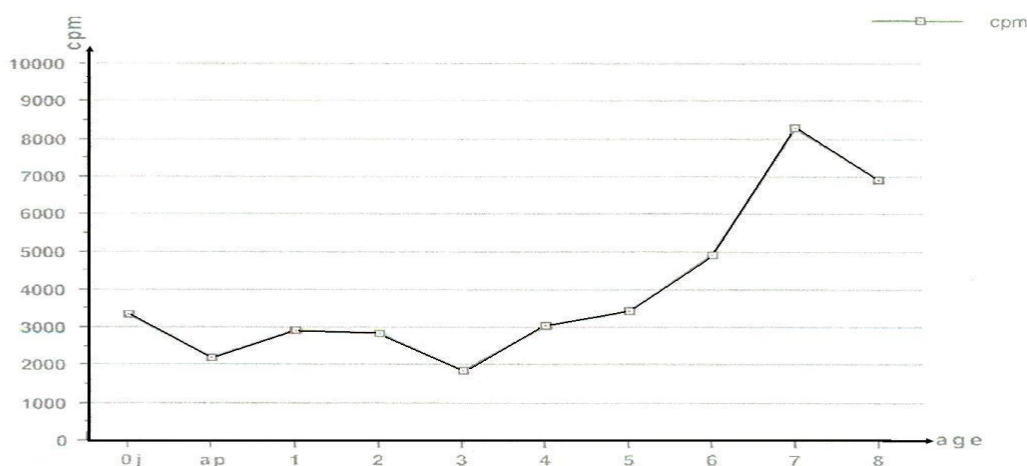
A la suite des tests réalisés, nous avons retenu le pH optimum de 7,4 et la durée des réactions enzymatiques à 2 heures.

## B. Evolution de l'activité lipasique

Représenté sur la Fig. (23) la courbe d'évolution de l'activité lipasique chez les embryons de *L. riparia* est répartie en deux temps. Du premier au troisième jour de développement embryonnaire, l'activité est constante et demeure très faible.

Ce n'est qu'à partir du quatrième jour que nous assistons à une élévation d'activité qui s'accélère pour atteindre son maximum à environ 8300 cpm au 7<sup>ème</sup> jour de développement.

L'activité enzymatique chez l'embryon coïncide avec la formation de la bandelette embryonnaire. Cela va dans le sens que l'embryon utilise d'abord les sucres et ensuite les autres sources énergétique, lipidiques et protéiques. L'augmentation de l'activité lipasique s'explique par les mouvements et la formation de l'embryon, blastocinèse et fermeture dorsale qui demande de l'énergie. Cette énergie nécessaire à l'embryogenèse est fournie par les triglycérides (chapitre – dosage des lipides).



**Fig. 23 : Activité Lipasique en cpm durant le développement embryonnaire de *L. riparia*.**

## V. DISCUSSION

Les électrophorèses couplés ou non à des incorporations de traceur radioactifs *in vivo* et *in vitro* ont permis une analyse du métabolisme protéique dans le tissu adipeux, l'hémolymphe et les ovaires au cours des cycles reproducteurs de *L. riparia*. (Breuzet, 1990). Dans notre cas nous avons repris les travaux de Breuzet, 1990, pour travailler sur des populations récentes de notre Insectes et éliminer les éventuelles modifications qui peuvent apparaître après une longue période d'élevage, (nourriture, conditions d'élevage...).

L'étude de la cinétique d'incorporation d'un acide aminé radioactif dans les fractions du tissu adipeux, de l'hémolymphe et de l'ovaire a permis de corréler les synthèses dans ces tissus avec les deux principales périodes du cycle reproducteur. La période de vitellogenèse est synchrone de l'enrichissement en protéines et particulièrement en vitellogénines de l'hémolymphe. Ceci a été déjà montré par Rouland (1979). Le métabolisme du tissu adipeux semble essentiellement orienté vers la production de métabolites indispensables à la croissance des ovocytes. Pendant la période de repos ovarien, la protéinémie hémolympatique est faible suite au ralentissement de synthèse protéique du tissu adipeux. Le phénomène d'alternance, de phase de libération massive et de phase d'accumulation protéique est fréquent chez les Insectes à cycles reproducteurs successifs. C'est le cas des blattes ovovivipare *Diploptera punctata* (Tay et coll., 1971 ; Mundall et coll., 1981).

Concernant les vitellogénines et les vitellines, des recherches antérieures ont établi l'existence d'une protéine spécifique de la femelle en vitellogenèse, présente dans le tissu adipeux, l'hémolymphe et constituant l'essentiel du vitellus protéique (Rouland et coll., 1978). Plus tard, des électrophorèses en condition dénaturantes ont permis de séparer deux sous unités de cette vitellogénines F1 et F2 de poids moléculaire respectif de 250kD et 60kD (Rouland et coll., 1981). Dans nos conditions d'analyse, incorporations de traceur protéique, couplés avec des électrophorèses en PAGE-SDS, nous avons mis en évidence, dans les ovocytes en vitellogenèse, la présence de quatre fractions protéiques majeures (O1, O2, O3, et O4) dont les poids moléculaires sont de 115 kD, 95kD, 75 kD et 60kD, auxquelles s'ajoute une fraction d'origine endogène de 28kD.

L'analyse comparative des résultats des électrophorèses, des dosages au Bradford et des dosages des activités lipasique durant le développement

embryonnaire de *Labidura riparia* nous montre deux périodes de fortes activités. La première se situe du deuxième au quatrième jour de développement embryonnaire et la deuxième du cinquième au neuvième jour.

Durant la première période nous notons en ce qui concerne les électrophorèses une diminution d'intensité des fractions protéiques les plus importantes. Le dosage des protéines au Bradford, montre une forte diminution qui passe de 1,035µg/µl à l'éclosion à 0,930µg/µl au troisième jour avant de remonter à 1,030µg/µl. Enfin pour l'activité lipasique nous notons environ 2200 cpm au premier jour qui augmente au deuxième et troisième jour pour atteindre environ 3000 cpm avant de chuter par la suite à environ 1900 cpm au troisième jour. Cette première période correspond en ce qui concerne les différentes parties de l'embryogenèse à l'apparition du blastoderme syncycial et l'édification de l'ébauche embryonnaire. A la fin du quatrième jour qui suit la ponte la bandelette embryonnaire allongée, segmentée est déjà entièrement formée.

Durant la seconde période nous observons une diminution d'intensité des fractions protéiques et apparition de nouvelles en nombre important. Le dosage des protéines montre une légère baisse jusqu'au huitième jour de développement embryonnaire où l'on assiste à une chute qui passe de 0,96µg/µl à 0,84µg/µl au neuvième jour. Quant à l'activité lipasique, celle-ci montre une progression à partir du troisième jour où elle est de 3070µg/µl pour atteindre 8300µg/µl au huitième jour.

Cette période est caractérisée en ce qui concerne les étapes de l'embryogenèse par l'augmentation du volume de l'œuf suite à l'absorption d'eau, par l'achèvement de la segmentation et la formation des appendices. Durant cette période se déroule également les mouvements de catatrepsis, la fermeture dorsale de l'embryon et enfin la formation des cuticules, rudimentaire au cinquième et la cuticule typique au septième jour.

Chez les Insectes, l'accumulation du vitellus dans les œufs fait intervenir en plus de l'ovaire le tissu adipeux, et le corps gras. La protéine principale produite par le tissu adipeux, la vitellogénines.

La segmentation de la masse des réserves est indiscutablement liée à l'activité des vitellophages. Celle-ci amène une réorganisation complète des rapports entre les inclusions et les cellules du système vitellin. Autour des noyaux de segmentation se concentre de plus en plus les expansions cytoplasmiques des cellules vitellines qui se sont multipliées au dépend du réticuloplasme ovulaire. (Fig. 20b). Ainsi, le vitellus est diversement modifié, les granules sont plus petits autour des cellules vitellines que ceux qui sont éloignés. (Fig. 20b). Les altérations vitellines s'amplifient avec l'âge de

l'embryon soit par dégradation soit par liquéfaction des granules. Observé quelques heures après la ponte, le vitellus apparaît en lots de granules à forme polyédrique délimités par des franges brillantes (fig. 20a), c'est un indice de segmentation vitelline précoce. De nombreux granules protéiques subissent une fragmentation en multiples petits morceaux qui restent proches des grandes inclusions. Plusieurs autres granules présentent des érosions au contact d'expansions cytoplasmiques de vitellophages.

L'étude réalisée par Fausto et al., (1997) sur l'embryogenèse de *C. morosus* a montré la dégradation du vitellus et a mis en évidence la fusion progressive des granules vitellins. Les vitellophages envahissent le vitellus et le transforment en paquet de cellules hétérogènes, bien réparties en compartiments distincts. Les vitellophages sont considérés donc par leur invasion de l'ooplasm, comme étant le premier événement qui rend disponible les granules protéiques au traitement protéolytiques (Liu et al. 1997).

Enfin, chez les Insectes dont *L. riparia*, la localisation des protéines composant les œufs, leurs récepteurs et également la caractérisation des organites auxquelles elles sont associées doivent être sujets à de futures recherches. Bien que les granules vitellins semblent morphologiquement très semblables, ils sont probablement très hétérogènes dans leurs compositions et dans leurs fonctions. Le développement des embryons commence dès la fertilisation par la fusion des noyaux suivi de divisions nucléaires mitotiques sans division cytoplasmique ayant pour résultats un blastoderme syncytial. La cellularisation a lieu à la périphérie de l'œuf et l'embryon lance son développement dans le secteur cortical. Le vitellus est employé graduellement pendant l'embryogenèse, assurant la fourniture de matériaux pour répondre à la demande métabolique de l'embryon. Cette fourniture sélective et graduelle est dictée par le programme génétique de l'Insecte. Des études récentes, Georgie et al., (2005) ont montré que les granules vitellins ne composent pas de simples vésicules digestives mais sont plutôt des emplacements où un métabolisme complexe se produit, finement réglé par rapport au temps et à l'espace. À l'avenir le travail doit porter sur l'identification et le devenir des composants maternellement hérités et de comprendre comment et où ces produits sont épuisés et ce grâce aux progrès réalisés dans le domaine biochimiques, de la biologie cellulaire et des technologies de la biologie moléculaire.

## CHAPITRE IV

### CUTICULOGENESE ET EVOLUTION DES ECDYSTEROÏDES

Au cours de leur développement les embryons d'Insectes synthétisent plusieurs cuticules. Généralement 3 cuticules sont déposées successivement; c'est le cas par exemple de *Locusta migratoria*, (Lagueux et al. 1979); *Schistocerca gregaria*, (Sbrena ,1974) *Leucophaea maderae*, (Rinterknecht et Matz, 1977) et *Carausius morosus* (Louvet, 1974). Cependant, seulement deux cuticules différentes ont été observées au cours de l'embryogenèse de *Blabera craniifer* (Bullière, 1973) et de *Calliphora erythrocephala* (Bordes-Alléaume et Sami, 1987). Signalons ici que la cuticule chez les Crustacées est largement étudiée, (Havemann, 2008), cependant les différences dans le développement de ces derniers et les Insectes ne nous permettent pas de faire la comparaison.

La présence d'ecdystéroïdes dans les œufs de diverses espèces d'Insectes a amené à envisager un contrôle des mues embryonnaires comparable à celui qui règle les mues larvaires. Effectivement des corrélations ont été établies entre les taux d'ecdystéroïdes et la formation des cuticules embryonnaires chez différentes espèces, telles *L. migratoria* (Lagueux et al. 1979), *S. gregaria* (Sbrena ,1974), *C. erythrocephala* (Bordes-Alléaume et Sami, 1987).

Chez le Dermaptère *Labidura riparia* les ecdystéroïdes s'accumulent dans l'ovaire au cours de la vitellogenèse (Sayah, 1993). Aucune donnée n'existe ni sur l'évolution des ecdystéroïdes ni sur la cuticulogenèse au cours de l'embryogenèse de cet Insecte. Heymons (Heymons 1895) ne donne aucune indication sur les conditions dans lesquelles se développent les œufs dans sa description de l'embryogenèse de *Forficula auricularia*, autre Dermaptère.

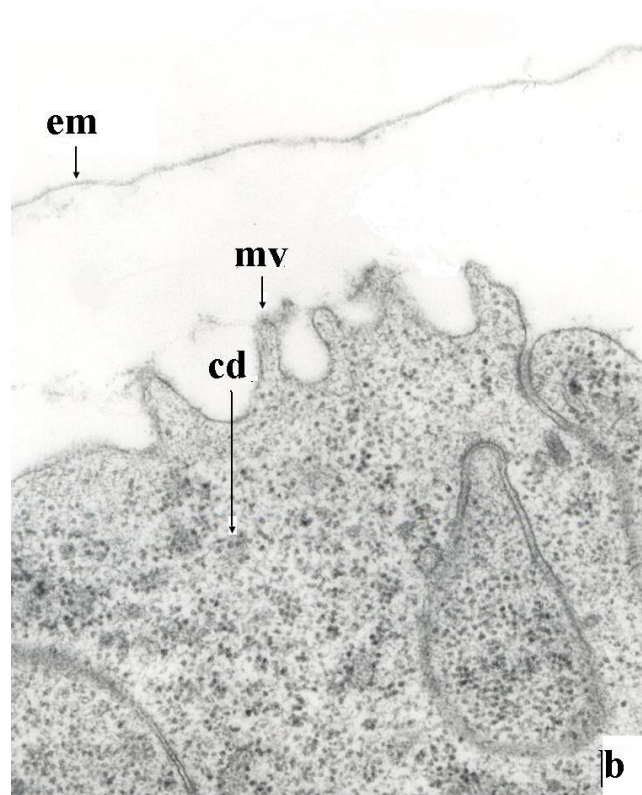
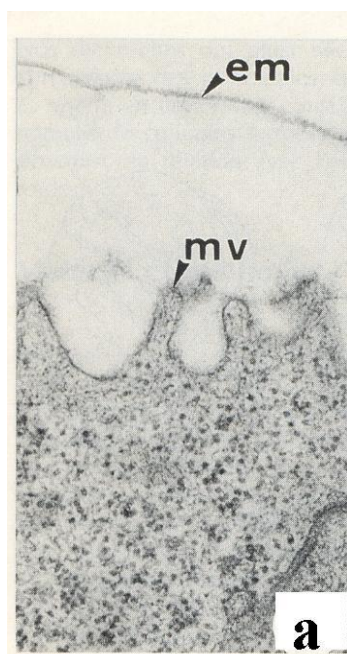
Nos recherches ont ainsi nécessité l'établissement d'une chronologie des principales étapes du développement de *L. riparia* en conditions constantes. Nous avons précisé le nombre de cuticules formées par l'embryon ainsi que leur structure, en relation avec l'évolution des taux

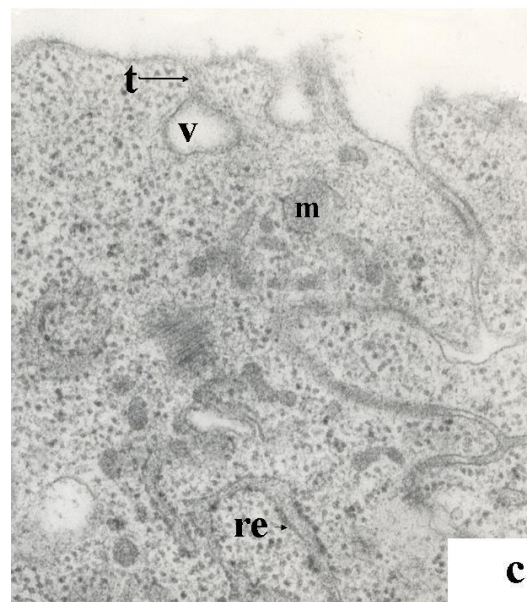
d'ecdystéroïdes. Nous avons également à titre expérimental repris les travaux réalisés sur les ecdystéroïdes des ovaires (Sayah et al., 1991) chez la femelle de *Labidura riparia*.

## I. CUTICULOGENESE EMBRYONNAIRE

Les sécrétions cuticulaires ont été observées en microscopie électronique au niveau du thorax depuis le 5<sup>ème</sup> jour de l'embryogenèse jusqu'à l'éclosion.

Au stade bandelette embryonnaire à son élongation maximale (5<sup>ème</sup> jour après la ponte), l'épiderme est pourvu par endroits de microvillosités irrégulièrement disposées. Une fine enveloppe d'aspect légèrement granuleux est présente. Elle est très nettement séparée de l'épiderme (Fig. 24a). Nous la considérons comme une première cuticule embryonnaire rudimentaire car elle est incomplète. Elle se maintient durant tout le développement. A ce stade de développement embryonnaire les microvillosités ne présentent toujours pas de matériel dense à leurs extrémités (Fig.24b). Nous commençons à observer une importante activité sécrétrice des cellules hypodermiques (Fig.24c). Cette observation est vérifiée par la présence d'appareils de Golgi bien développés, un réticulum endoplasmique abondant ainsi que des vésicules claires ou légèrement denses.



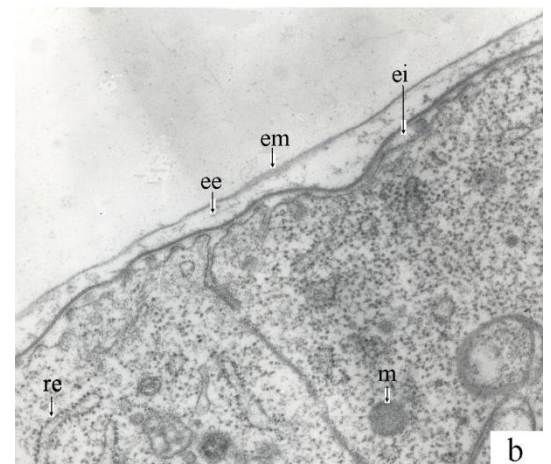
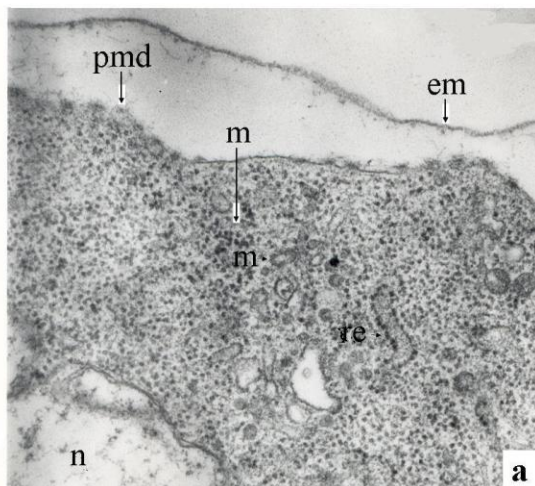


**Fig. 24 : Cuticulogénèse au niveau du thorax à différents stades de développement embryonnaires chez *Labidura riparia*. (5<sup>ème</sup> jour)**

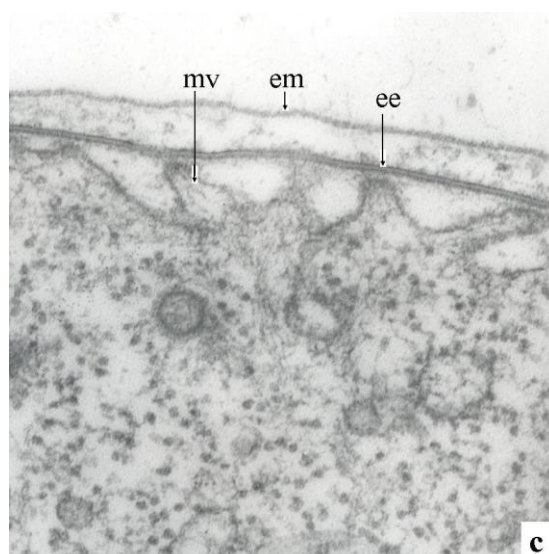
**a-** 5<sup>ème</sup> jour : enveloppe embryonnaire (em) correspondant à la cuticule rudimentaire, épiderme avec de fines microvillosité (mv) (x40 000).

**b-** 5<sup>ème</sup> jour : Détail, montrant l'absence de matériel dense à l'extrémité de microvillosité (mv) des cellules épidermiques. Notons les organites cellulaires : Mitochondries (m), Corps dense (cd) (x60 000).

**c-** 5<sup>ème</sup> jour : Partie apicale d'une cellule hypodermique montrant des vésicules (v) s'ouvrant sur la cuticule par des tubules. Notons la forte présence de réticulum endoplasmique (Re) à la partie basale de la cellule. (x60 000).







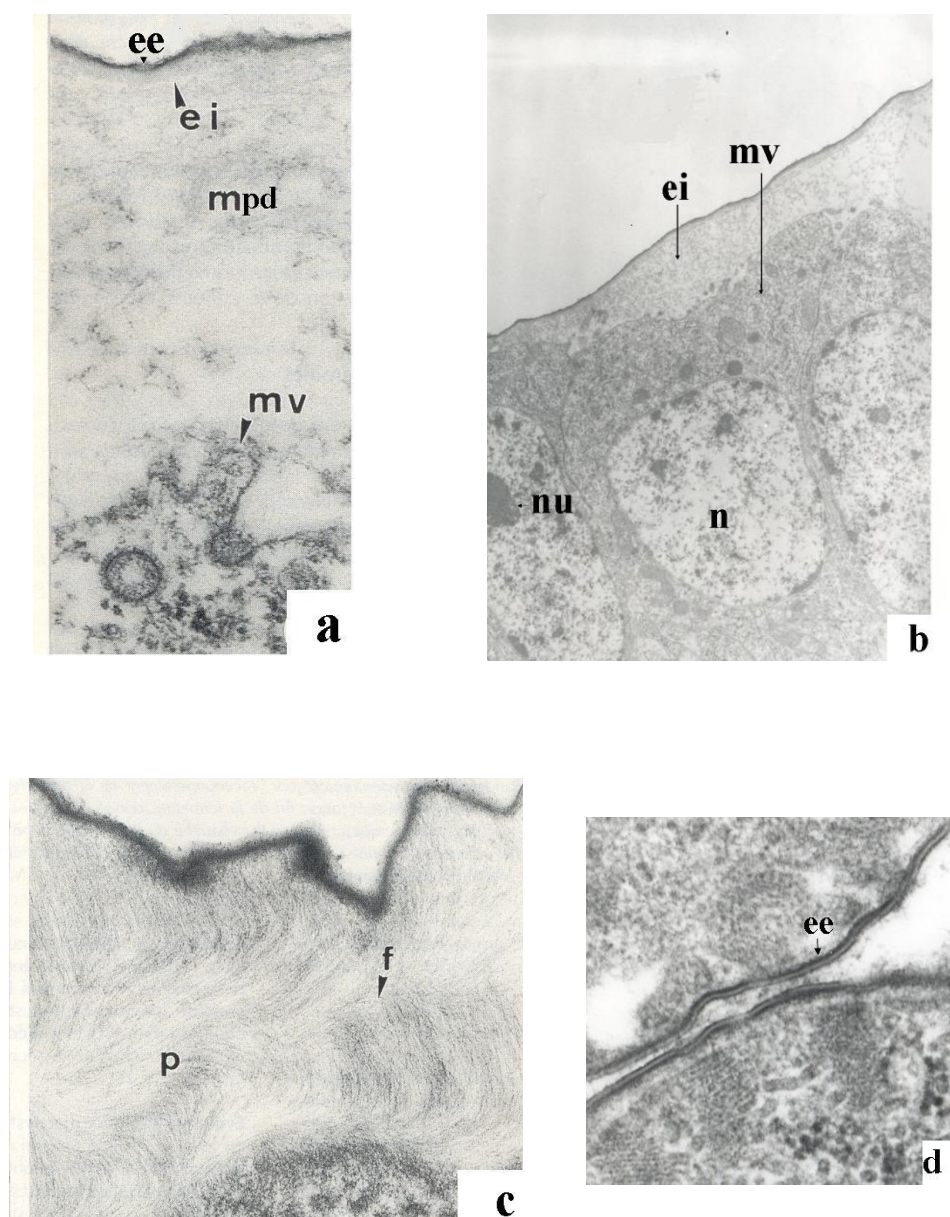
**Fig. 25 : Cuticulogenèse au niveau du thorax à différents stades de développement embryonnaires chez *Labidura riparia*. (6 et 7<sup>ème</sup> jour)**

**a-** 6<sup>ème</sup> jour : Accumulation de matériel dense en plaque espacées (pmd) à la surface des cellules épidermiques, signe de début de dépôt cuticulaire. (x60 000).

(n) noyau, (re) réticulum endoplasmique, vésicules (v), (m) Mitochondrie.

**b-** 7<sup>ème</sup> jour : Formation d'une couche continue, l'épicuticule externe (ee), l'épicuticule interne (ei) apparaît moins dense, remarquons la présence des organites cellulaires en abondance comparativement aux stades précédent (x60 000).

**c-** 7<sup>ème</sup> jour : Détail montrant le dépôt de la cuticule avec épicuticule externe a architecture trilamellaire ; matériel peu dense à l'extrémité des microvillosités (mpd) (x90 000).



**Fig. 26 : Cuticulogénèse au niveau du thorax à différents stades de développement embryonnaires chez *Labidura riparia*. (8 et 9<sup>ème</sup> jour et larve à l'éclosion)**

**a-** 8<sup>ème</sup> jour : Epicuticule externe (ee) et épicuticule interne (ei) ; dépôt de matériel peu dense (mpd) entre l'épicuticule interne et l'épiderme (x 60 000).

**b-** 8<sup>ème</sup> jour : Portion apicale de cellule épidermique. La membrane apicale présente de très courtes microvillosités (mv). Notons l'abondance de mitochondrie (m), de corps denses (cd) et les noyaux des cellules volumineux (N) pourvu de nucléole (Nu).

**c-** 9<sup>ème</sup> jour : Dernier jour embryonnaire avant éclosion. Procuticule (P) constituée de fibrilles (f) aux orientations diverses (x40 000).

**d-** Larve à l'éclosion : Epicuticule externe à architecture trilamellaire de la 2<sup>ème</sup> cuticule larvaire.

Au 6<sup>ème</sup> jour nous assistons à un raccourcissement de la bandelette embryonnaire. A ce stade les cellules hypodermiques présentent des microvillosités aux sommets chargés d'un matériel dense aux électrons et granuleux (Fig.25a). Après la catatrepsis et une fois que l'embryon a amorcé sa fermeture dorsale (7<sup>ème</sup> jour après la ponte), commence le dépôt d'une deuxième cuticule (Fig. 25b). Chez les embryons de ce stade une épicuticule externe typique est mise en place: d'aspect trilamellaire, elle est constituée de deux couches denses aux électrons séparées par une couche peu opaque (Fig. 25c).

L'épicuticule perd assez rapidement cette structure trilamellaire et devient uniformément dense aux électrons. Elle est doublée au 8<sup>ème</sup> jour de l'embryogenèse par une épicuticule interne plus épaisse mais moins opaque aux électrons (Fig. 26a). L'épicuticule interne est séparée de l'épiderme par un espace assez vaste occupé d'un matériel peu dense, celui-ci correspond à la mise en place de la procuticule. Nous observons à ce stade une activité plus intense des cellules marquée par une abondance des organites et des noyaux volumineux, (Fig. 26b). Au 9<sup>ème</sup> jour la procuticule est maintenant relativement épaisse, elle est constituée de fibrilles moyennement denses, diversement orientées (Fig. 26c). L'apolyse de cette 2<sup>ème</sup> cuticule coïncide approximativement avec l'éclosion. Ainsi la jeune larve est encore recouverte par cette deuxième cuticule, mais la sécrétion d'une nouvelle épicuticule interne soit a juste commencé, soit est achevée chez la larve qui vient d'éclore. Cette nouvelle épicuticule marque le début de la sécrétion de la cuticule du 2<sup>ème</sup> stade larvaire (Fig. 26d).

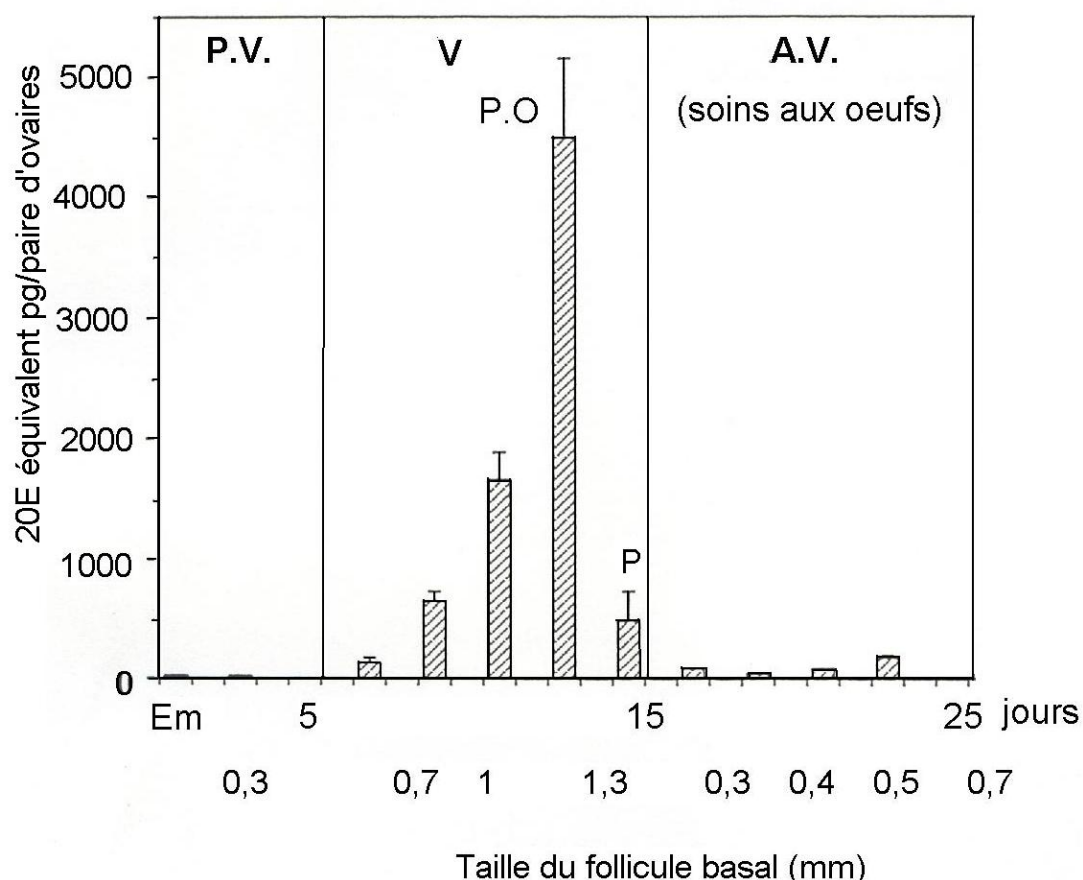
## II. EVOLUTION DES TAUX D'ECDYSTÉROÏDES

### A. Les ecdystéroïdes ovariens

Les fluctuations des taux d'ecdystéroïdes contenus dans les ovaires au cours du cycle reproducteur sont illustrées par la figure 27. Les dosages concernent les femelles adultes en période de prévitellogenèse, en période de vitellogenèse (V. I) et durant la première période d'arrêt de vitellogenèse (A. V). Les taux d'ecdystéroïdes ovariens sont exprimés ici en pg par paire d'ovaires, c'est-à-dire par femelle.

Aux premiers jours de la vie imaginaire, lorsque les follicules ovariens ne dépassent pas 0,3 mm, la concentration en ecdystéroïdes est très faible ( $17 \pm 1$  pg par paire d'ovaire). A partir du cinquième jour, lorsque la vitellogenèse commence, les titres hormonaux augmentent, faiblement

d'abord puis très rapidement au fur et à mesure que la vitellogenèse avance : de  $142 \pm 30$  pg par paire d'ovaires quand le plus grand diamètre des follicules basaux est compris entre 0.5 et 0.7 mm à  $1670 \pm 25$  pg par paire d'ovaire quand les follicules ont un diamètre de 1 mm environ. Un pic de  $4500 \pm 600$  pg par paire d'ovaire est observé, lorsque les follicules mesurent 1.3 mm, au moment de l'ovulation qui survient vers le 13<sup>ème</sup> jour. Ces taux chutent au moment de la ponte et demeurent inférieurs à 100 pg/paire d'ovaire pendant la majeure partie de la phase d'arrêt de vitellogenèse.



**Fig. 27 : Evolution des taux d'ecdystéroïdes ovariens au cours du cycle chez la femelle de *Labidura*. Les résultats sont exprimés en pg de 20-hydroxyecdysone équivalent par paire d'ovaires. L'âge et la taille du follicule sont indiqués en abscisse. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de 4 à 10 femelles.**

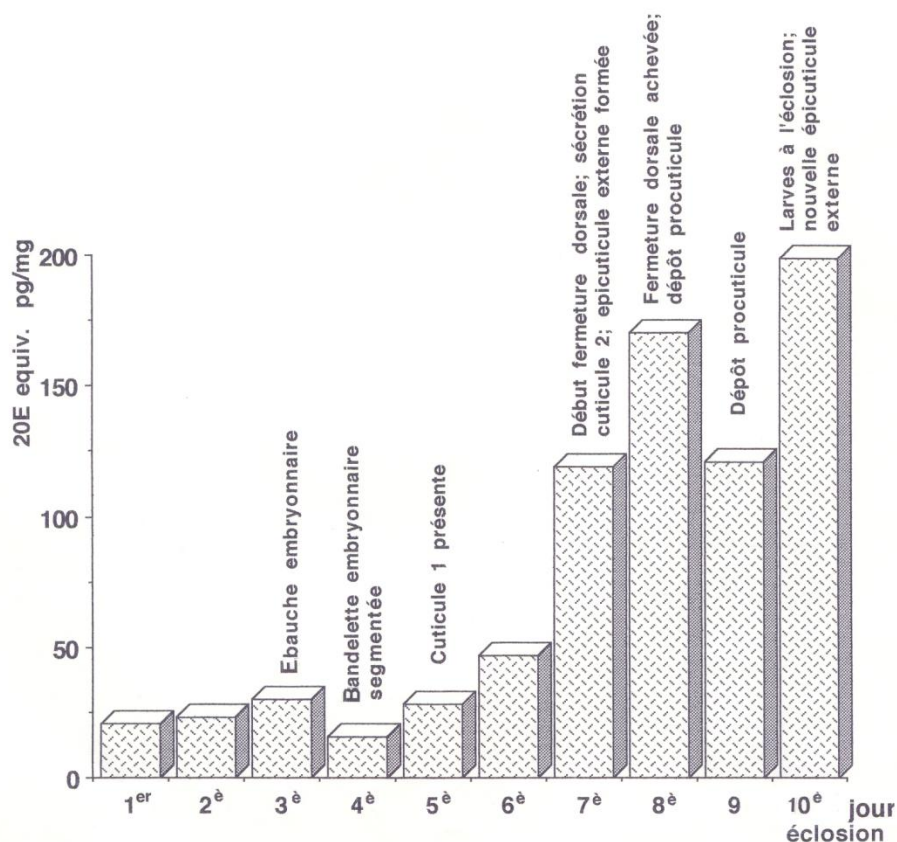
A.V : arrêt de vitellogenèse ; Em. : émergence ; P. : ponte ; P.O : ponte ovulaire ; P.V : prévitellogenèse ; (phase de maturation sexuelle) ; V.I: phase de vitellogenèse.

## B. Les ecdystéroïdes chez les embryons

Les ecdystéroïdes libres ont été dosés chaque jour tout au long du développement embryonnaire et à l'éclosion (Fig. 4).

Leur concentration s'est révélée très faible dans les œufs juste après la ponte (20 pg/mg) par rapport à celle observée dans les ovaires et les œufs accumulés dans les oviductes chez les femelles en ponte ovulaire où leur taux atteint 90 pg/mg (Syah et al., 1993.).

Les taux d'ecdystéroïdes libres varient peu au cours des 5 premiers jours du développement. Ils atteignent 30 pg/mg le 3<sup>ème</sup> jour, juste avant la segmentation et chutent à 16 pg/mg au 4<sup>ème</sup> jour. A partir du 5<sup>ème</sup> jour, ces taux augmentent progressivement pour atteindre 170 pg/mg au 8<sup>ème</sup> jour. Cette élévation coïncide avec la formation de la 2<sup>ème</sup> cuticule embryonnaire et l'achèvement de la fermeture dorsale. Une chute significative du taux d'ecdystéroïdes libres (120 pg/mg) s'observe juste avant l'éclosion. Chez les jeunes larves à l'éclosion ce taux remonte à 198 pg/mg.



**Fig. 28:** Evolution des taux d'ecdystéroïdes libres au cours du développement embryonnaire de *L. riparia* exprimés en 20E equiv. pg/mg d'œuf.

### III. DISCUSSION

Au cours de leur développement les embryons de *L. riparia* produisent deux cuticules. Nous avons noté tout d'abord la présence d'une fine enveloppe dense aux électrons chez les bandelettes embryonnaires segmentées à leur élongation maximale. Cette enveloppe a le même aspect que celle décrite chez *S. gregaria* (Sbrena, 1974), *C. morosus* (Louvet, 1974), *C. erythrocephala* (Bordes-Alléaume et Sami, 1987). Elle correspondrait au dépôt d'une première cuticule, très mince et rudimentaire. Chez *L. migratoria*, (Lagueux et al. 1979), cette cuticule comprend deux couches électro-denses séparées par un espace clair et a donc les caractéristiques d'une épicuticule externe. Ainsi l'épiderme des jeunes embryons serait capable de synthétiser une épicuticule externe plus ou moins typique selon les Insectes. Cette première cuticule a été observée chez tous les Insectes étudiés à l'exception de *B. craniifer* (Bullière, 1973). Elle est certainement extensible car après son apolyse, elle continue à entourer l'embryon malgré l'accroissement et les changements morphologiques importants de celui-ci.

Chez tous les Insectes une deuxième cuticule est mise en place au moment de la fermeture dorsale de l'embryon ou juste après. Beaucoup plus épaisse que la première cuticule, elle comprend toujours une épicuticule externe, une épicuticule interne ainsi qu'une procuticule. Chez *C. morosus* (Louvet, 1974), cette procuticule ne serait pas une couche stabilisée; chez *S. gregaria* (Sbrena, 1974) et *L. migratoria* (Lagueux et al., 1979) un espace sous-cuticulaire fibreux sépare les épicuticules d'une procuticule bien identifiable. Notons qu'à cette deuxième cuticule embryonnaire succédera à la fin de l'embryogenèse de ces Insectes une troisième cuticule qui sera celle de la larve de premier stade.

Chez *L. riparia* la deuxième cuticule comporte au contraire une procuticule épaisse et tout à fait typique. Elle constituera la cuticule des larves de 1<sup>er</sup> stade et elle acquiert une pigmentation bien caractéristique. Elle a ainsi la même signification que la 2<sup>ème</sup> cuticule déposée après la fermeture dorsale chez *C. erythrocephala* (Bordes-Alléaume et Sami, 1987). Chez ce Diptère, cette dernière est également la cuticule de la larve de 1<sup>er</sup> stade; elle est ornée de soies qui seront présentes chez les larves.

Ainsi, la sécrétion d'une première cuticule rudimentaire a lieu de façon très générale, tôt au cours de l'embryogenèse des Insectes, tandis que la 2<sup>ème</sup> cuticule qui apparaît pendant ou juste après

la fermeture dorsale représente, selon les Insectes, soit une cuticule embryonnaire qui sera remplacée avant l'éclosion, soit déjà la cuticule du premier stade larvaire.

C'est d'abord chez *L. migratoria* (Lagueux et al., 1979) que des corrélations ont été nettement montrées entre les pics d'ecdystéroïdes et la cuticulogénèse embryonnaire, trois pics correspondent aux sécrétions successives des trois cuticules observées. Le premier pic qui correspond à la mise en place de la 1<sup>ère</sup> cuticule chez *L. migratoria* n'a été observé ni chez *S. gregaria* (Sbrena, 1974) ni chez *C. erythrocephala* (Bordes-Alléaume et Sami, 1987). Il nous est difficile d'assurer que la légère augmentation du taux d'ecdystéroïdes libres observée au 3<sup>ème</sup> jour de l'embryogénèse de *L. riparia* est bien en relation avec le dépôt de la première cuticule, qui rappelons-le est extrêmement mince.

A la mise en place de la 2<sup>ème</sup> cuticule et à celle de la 3<sup>ème</sup> cuticule lorsqu'elle est présente est toujours associée une élévation du taux des ecdystéroïdes libres. En général le dernier pic est suivi d'une diminution du taux d'ecdystéroïdes libres pendant toute la fin de l'embryogénèse ce que l'on observe aussi chez *L. riparia*; elle est suivie d'une forte élévation de la quantité d'ecdystéroïdes libres juste après l'éclosion qui est nettement en relation avec une apolyse et le démarrage d'une nouvelle cuticulogénèse.

Dans les œufs d'Insectes fraîchement pondus, les ecdystéroïdes sont d'origine maternelle. Ils sont synthétisés au niveau des cellules folliculaires et transférés dans les ovocytes au cours de la vitellogénèse (Scalia et Morgan, 1982 ; Lagueux et al., 1984).

Chez *L. riparia*, les ecdystéroïdes libres accumulés dans les œufs se retrouvent en faible quantité à la ponte alors que leur taux était élevé dans les ovaires en fin de vitellogénèse, (Fig.26), Il en est de même chez d'autres Insectes tels que *B. craniifer* (Bullière et al., 1979) et *C. erythrocephala* (Bordes-Alléaume et Sami, 1987). Au cours de la deuxième moitié de l'embryogénèse à partir du 6<sup>ème</sup> jour on assiste chez *L. riparia* à une augmentation des taux d'ecdystéroïdes. Cette élévation peut résulter soit d'une activation des ecdystéroïdes conjugués d'origine maternelle, soit d'ecdystéroïdes synthétisés de novo par le système endocrine de l'embryon, soit encore des deux. On a montré que cette augmentation vers la fin du développement embryonnaire résulte d'une synthèse des ecdystéroïdes par l'embryon chez le grillon *Gryllus bimaculatus* (Espig et al., 1989) et chez le papillon *Pieris brassicae* (Beydon et al., 1989).

Chez *L. riparia* nous avons enregistré non seulement une augmentation des ecdystéroïdes libres mais également des quantités élevées de conjugués. Cela résulte probablement d'une

synthèse de ces hormones par l'embryon. Une analyse de ces ecdystéroïdes par HPLC est nécessaire pour préciser leur nature.

## CHAPITRE V

# EVOLUTION DES LIPIDES AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET REGULATION NEUROENDOCRINE

Chez les Insectes les lipides sont reconnus comme étant la source principale d'énergie au cours du développement embryonnaire. La teneur en lipides des œufs mûrs est en général élevée: elle représente 20 à 40% du poids sec des œufs selon les espèces (Allais et al., 1964; Kinsella et Smith, 1966; Chino, 1985; Kenneth et al., 1975; Kawooya et al., 1988). Cette teneur décroît fortement au cours du développement; ainsi on a montré une perte d'environ 1/3 des lipides totaux durant l'embryogenèse chez *Periplaneta americana* (Kinsella et Smyth, 1966) et des 2/3 chez *Spodoptera exigua* (Hoppe et al., 1975)

Les lipides s'accumulent dans les ovocytes en croissance sous forme de globules intracytoplasmiques, constitués essentiellement de triacylglycérols; mais on y décèle aussi des diacylglycérols, des phospholipides en quantités non négligeables et du cholestérol (Lubzens et al., 1981).

La teneur décroissante en lipide du tissu adipeux par rapport à celle, croissante, des œufs durant la vitellogenèse a conduit à suggérer leur transfert du tissu adipeux aux ovaires via l'hémolymphe (Gilbert, 1967; Hill et al., 1968). Les lipides synthétisés par le tissu adipeux y sont stockés sous forme de triacylglycérols; ils doivent être hydrolysés en diacylglycérols avant d'être libérés dans l'hémolymphe. Ils sont alors liés à des protéines, transporteuses les lipophorines, et les vitellogenines, qui les véhiculent jusqu'aux ovocytes en croissance (Chino et al., 1977; Raikhel et al., 1986), (Ziegler et al. 2001). Dans les ovocytes les diacylglycérols sont en grande partie reconvertis en triacylglycérols et stockés. Outre les diacylglycérols,



l'hémolymphe transporte aussi des phospholipides vers les ovocytes (Giorgi et al., 1999)

Les triacylglycérols sont donc les constituants majeurs des lipides de l'œuf, à la ponte, emmagasinant sous forme condensée et stable les réserves énergétiques. Ils sont progressivement hydrolysés en mono- et diacylglycérols, fournissant ainsi l'énergie nécessaire à l'édification de l'embryon. Durant le développement embryonnaire les triacylglycérols demeurent cependant toujours majoritaires, alors que les mono- et les diacylglycérols sont des intermédiaires labiles.









Chez *Labidura riparia* seuls ont été étudiés les lipides du tissu adipeux de la femelle adulte (Sayah, 1993). Dans ce tissu, les TAG représentent les lipides majoritaires, variant entre 70 à 80 µg/mg de tissu adipeux, les lipides mobiles sont plus faiblement représentés, 1 à 6 µg/mg pour les DAG et pour les phospholipides 8 à 33 µg/mg selon la période du cycle.

Des modifications cycliques des globules lipidiques ont été observées et sont particulièrement marquées dans les adipocytes situés au contact d'ovocytes en vitellogenèse. Partant de là Sayah, 1993 s'est proposé d'analyser les facteurs de régulations du métabolisme lipidique en étudiant les rôles exercés par les ecdystéroïdes et certains centres neuroendocrines, dont la *pars lateralis*. L'auteur a montré des modifications importantes de la composante des lipides en l'absence de la *pars lateralis*.

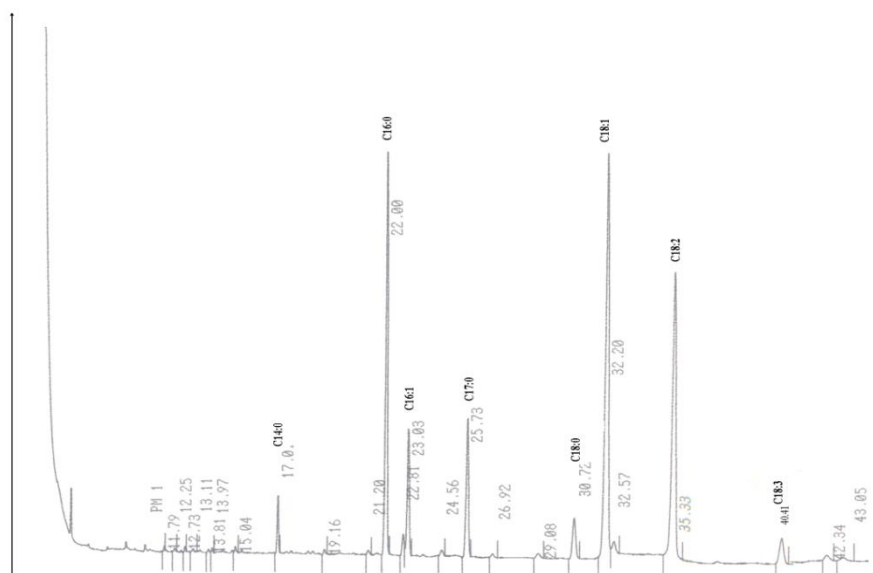
Pour continuer le travail et dans le même ordre d'idée, j'ai voulu suivre l'évolution des lipides dans les œufs au cours du développement embryonnaire. J'ai également cherché à mettre en évidence par une étude expérimentale, l'effet éventuel d'un centre neuroendocrine, la *pars-lateralis* sur l'incorporation des lipides dans les ovocytes et leur répercussion par leur analyse à partir des œufs à la ponte.

## **EVOLUTION DES LIPIDES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES OEUFS DE FEMELLE NORMALE**

La nomenclature des acides gras que nous avons pu identifier chez *L. riparia* est représentée sur la (Fig. 28a). A titre indicatif, nous donnons un exemple de chromatogramme en phase gazeuse (Fig. 28b).

Nom de l'acide gras	Notation	Structure
Arachidique	C <sub>20:0</sub>	HOOC- 
Linoléinique	C <sub>18:3</sub>	HOOC- 
Linoléique	C <sub>18:2</sub>	HOOC- 
Oléique	C <sub>18:1</sub>	HOOC- 
Stéarique	C <sub>18:0</sub>	HOOC- 
Palmitoléique	C <sub>16:1</sub>	HOOC- 
Palmitique	C <sub>16:0</sub>	HOOC- 
Myristique	C <sub>14:0</sub>	HOOC- 

a



b

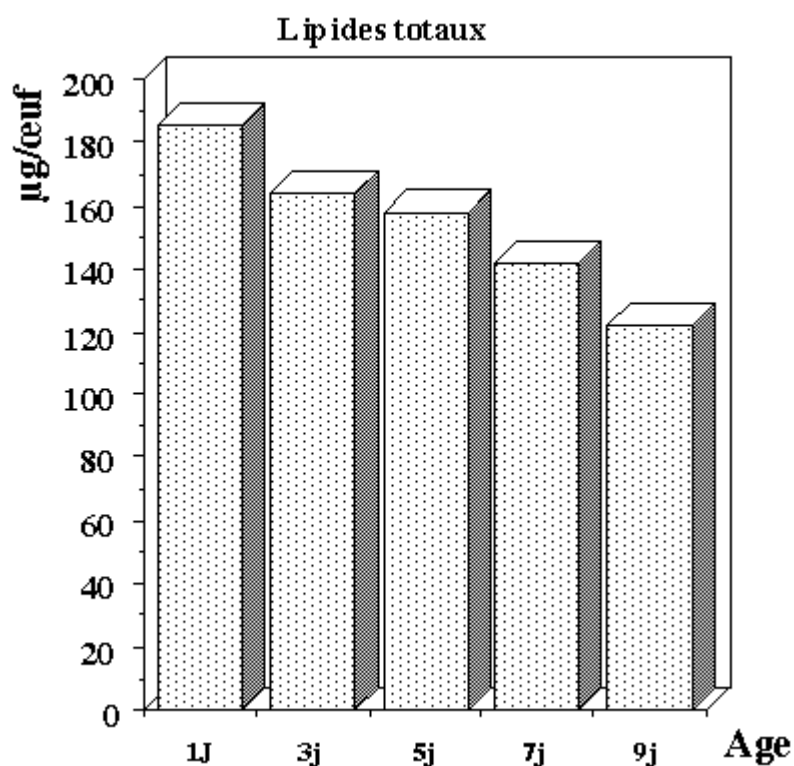
**Fig.28 : Nomenclature des différents acides gras identifiés chez *L. riparia* (a). Exemple de Chromatogramme obtenu pour les lipides totaux des œufs de 07 jours de *Labidura riparia*. (b). Les principaux pics correspondent à des acides gras identifiés par comparaison avec un chromatogramme standard (chap. I, Fig.5). Le temps de rétention de chaque acide gras est indiqué à coté de chaque pic en minute. S : représente le signal donné par l'enregistreur (b).**

## A. Lipides totaux

### 1. Evolution quantitative

Au cours du développement embryonnaire les quantités de lipides totaux de l'œuf chez *L. riparia* diminuent fortement et de façon très régulière (fig.29). Juste après la ponte la teneur en lipides totaux des œufs est de 186 $\mu\text{g}/\text{œuf}$ , pour atteindre quelques heures avant l'éclosion au 9<sup>ème</sup> jour 122 $\mu\text{g}/\text{œuf}$ , soit une chute d'environ 35%.

Nous remarquons toutefois que la chute du taux de lipides est assez régulière, elle est marquée par deux baisses plus ou moins importantes d'environ 11  $\mu\text{g}$  au début et à la fin de l'embryogenèse.

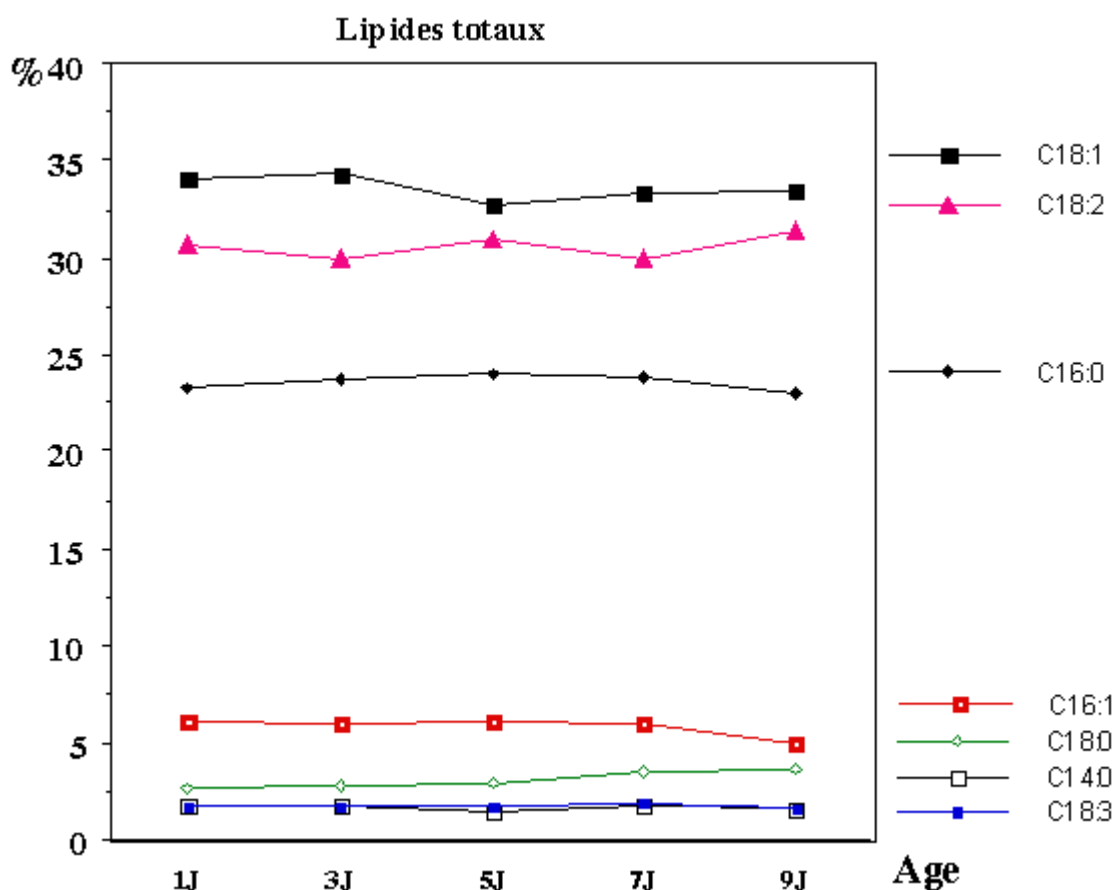


**Fig.29 : Evolution des quantités de lipides totaux au cours du développement embryonnaire.**

## 2. Composition en acides gras

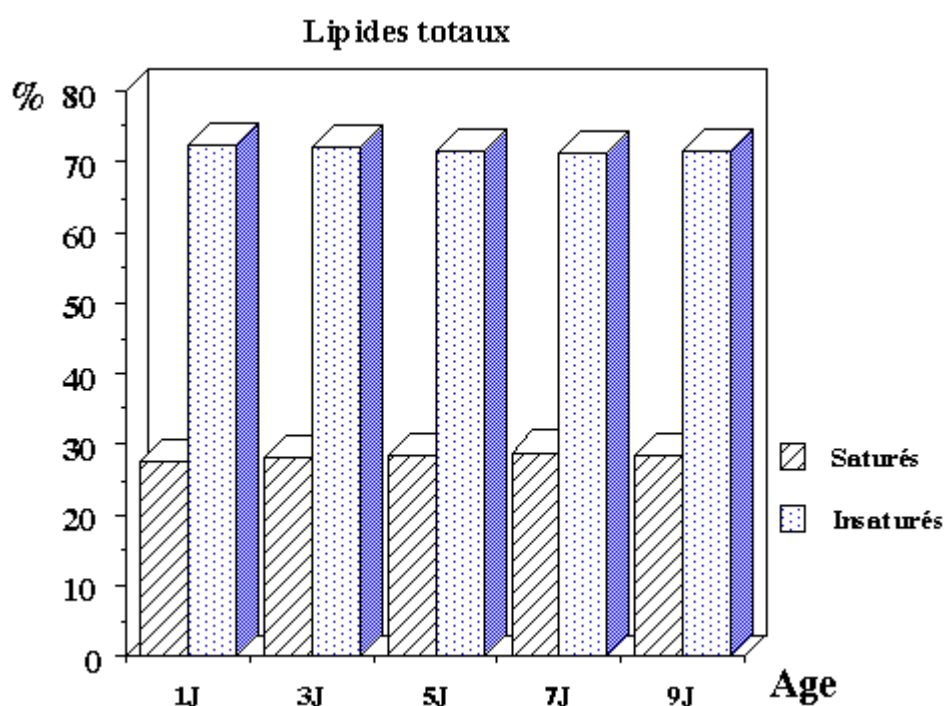
La composition en acides gras des lipides totaux (Fig.30) montre que les pourcentages relatifs des différents acides gras restent pratiquement stables au cours du développement embryonnaire. Les acides oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et l'acide palmitique (C16:0) sont les acides gras majeurs. Les deux premiers représentent chacun plus de 30% des acides gras totaux et ceci durant tout le développement embryonnaire.

Les acides, linoléique (C18:3), stéarique (C18:0), palmitoléique (C16:1) et myristique (C14:0) représentent chacun moins de 6% de l'ensemble.



**Fig. 30 : Evolution des pourcentages des différents acides gras au sein des lipides totaux au cours du développement embryonnaire**

Enfin, nous notons pour le pourcentage des acides gras saturés et insaturés (fig. 31) que ces derniers sont toujours majoritaires. Ils atteignent environ 73% des lipides totaux et ce pourcentage ne varie pas durant le développement embryonnaire.



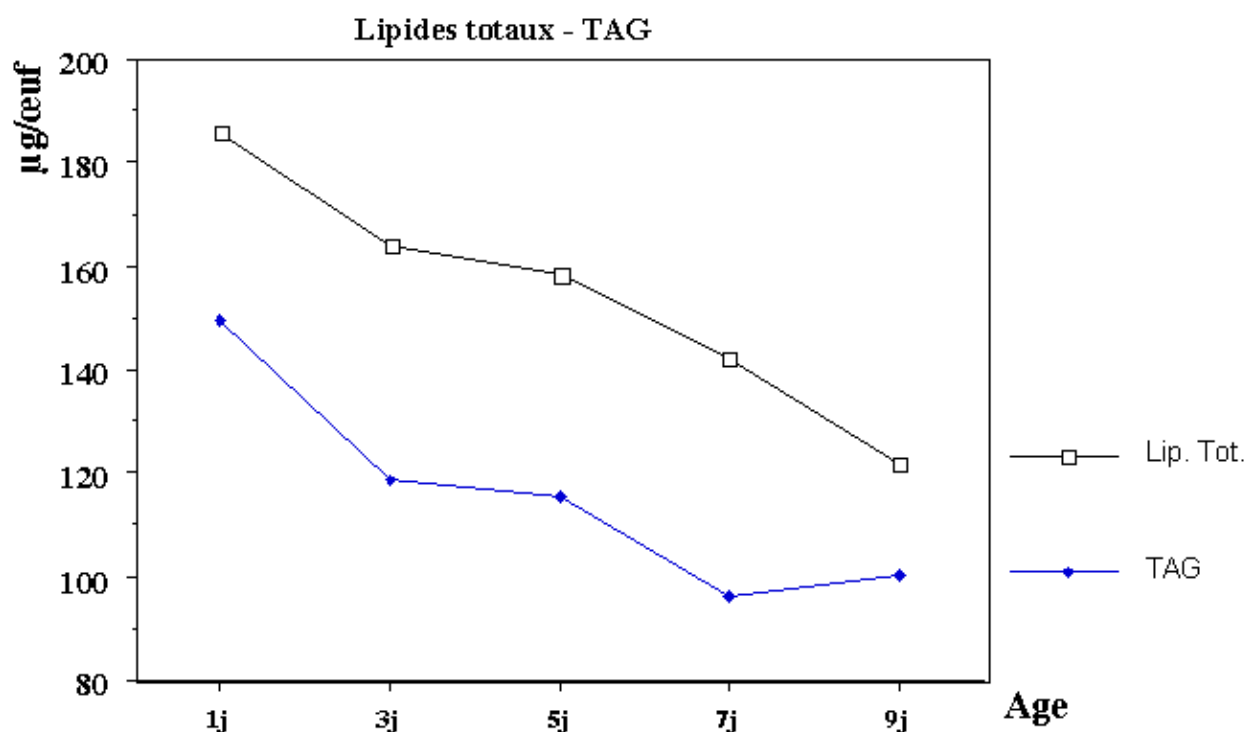
**Fig.31 : Pourcentage des acides gras saturés et insaturés dans les lipides totaux des œufs au cours du développement embryonnaire.**

## **B. Évolution des différentes classes lipidiques**

Les différentes classes lipidiques, triacylglycérols (TAG), diacylglycérols (DAG), phospholipides et acides gras libres (AGL) sont séparés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les stérols ne sont pas pris en considération.

## 1. Évolution quantitative

Les TAG qui constituent l'essentiel des réserves lipidiques à la ponte représentent les lipides majoritaires tout au long du développement. Leur évolution reflète celle des lipides totaux, ce qui nous a amenés à les représenter ensemble sur la figure (32). Le lendemain de la ponte la teneur en TAG est de 150  $\mu\text{g}/\text{œuf}$ . Elle chute progressivement pour atteindre 100  $\mu\text{g}/\text{œuf}$  avant l'éclosion. Les TAG représentent 80% des lipides totaux; et ce pourcentage demeure assez constant durant tout le développement.



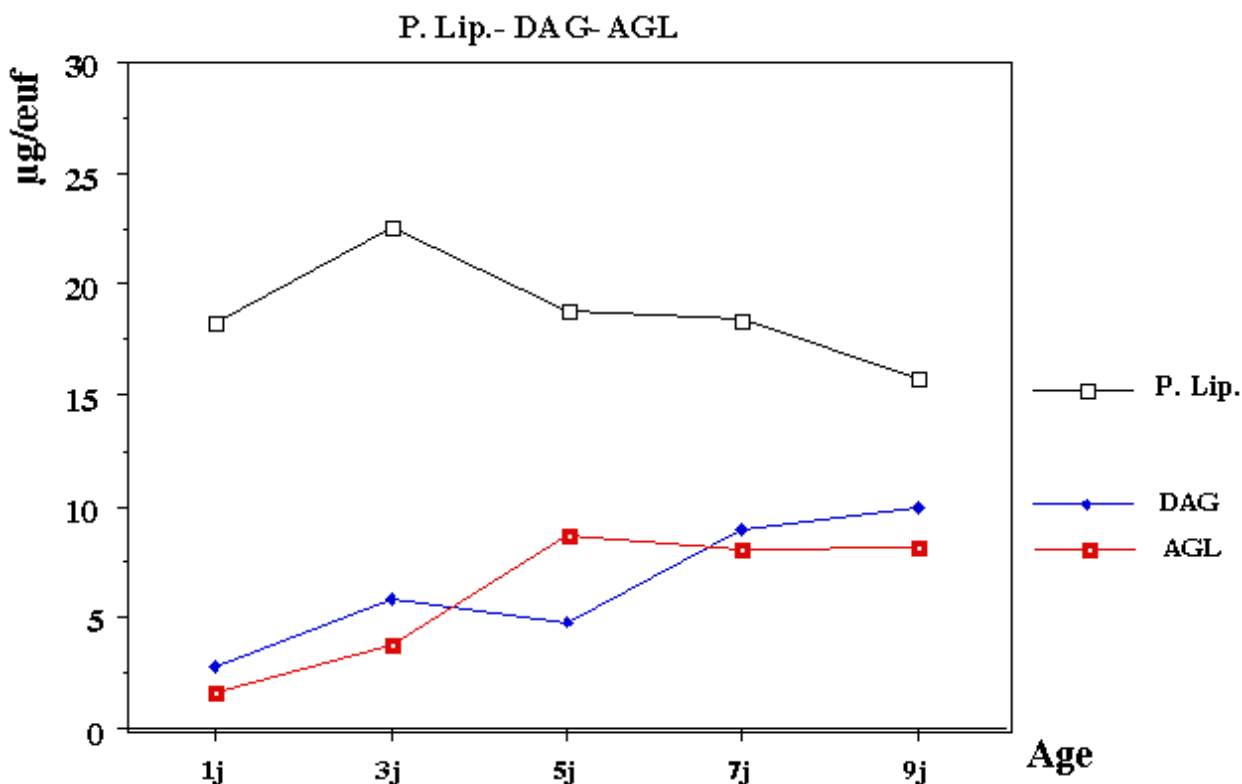
**Fig. 32 :** Evolution des lipides totaux et des triacylglycérols (TAG) en  $\mu\text{g}/\text{œuf}$  au cours du développement embryonnaire.

Les phospholipides, les diacylglycérols et les acides gras libres sont représentés en (Fig.33).

Les diacylglycérols 1-2 et 1-3 sont regroupés et quantifiés ensemble. Les teneurs en DAG sont toujours faibles, de l'ordre de  $3\mu\text{g}/\text{œuf}$  au jour 1, et augmentent progressivement pour atteindre  $10\mu\text{g}/\text{œuf}$  à la fin du développement. En pourcentage par rapport aux lipides totaux on note leur forte augmentation, elle passe de 1,6% à la ponte à 8% au 9ème jour.

Les acides gras libres sont présents durant tout le développement. Leur taux et leur évolution sont analogues à ceux des DAG, atteignant environ  $10\mu\text{g}/\text{œuf}$  soit environ 8% des lipides totaux, à partir du 5<sup>ème</sup> jour, ce taux se maintient jusqu'à la fin du développement embryonnaire.

Les phospholipides sont présents en quantités non négligeables dans les œufs de *L. riparia*. Leur taux reste à peu près stable au cours du développement embryonnaire, se situant entre 16 et  $23\mu\text{g}/\text{œuf}$ . Leur pourcentage par rapport à l'ensemble augmente cependant fortement, passant de 9,6% à 13,1% des lipides totaux.



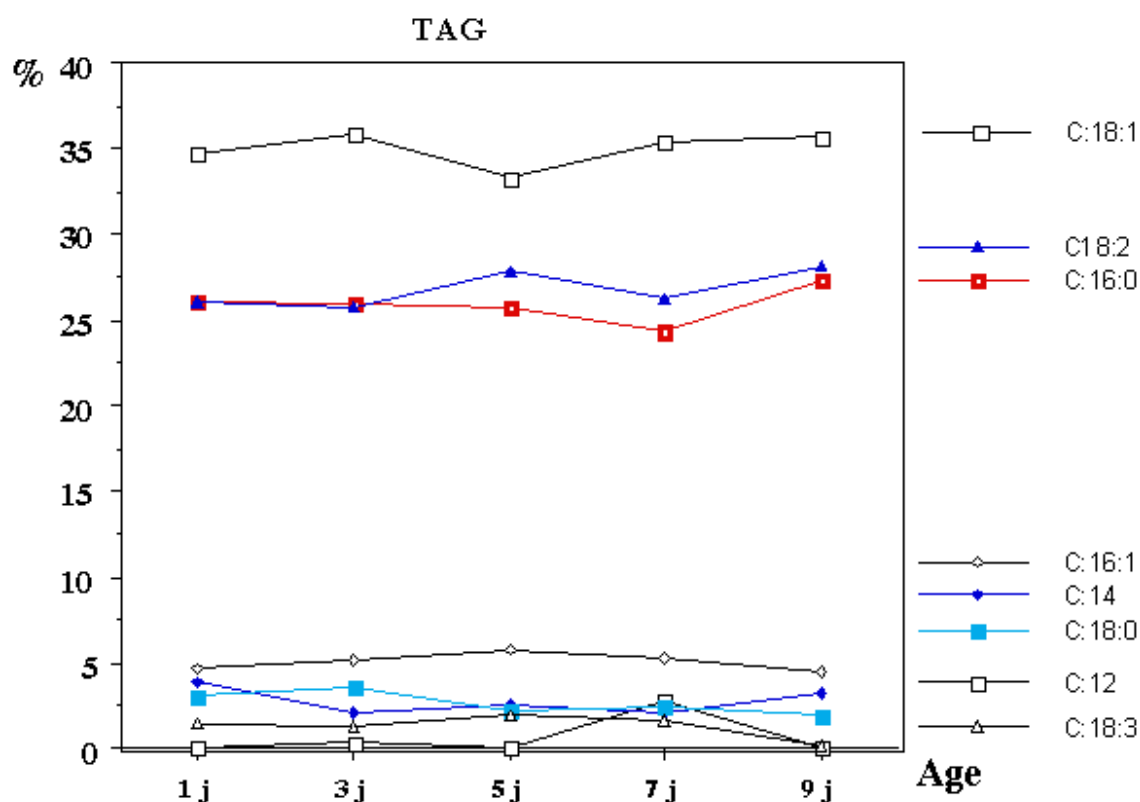
**Fig. 33 : Evolution des phospholipides (P.lip.), des diacylglycérols ( DAG), et des acides gras libres (AGL) en  $\mu\text{g}/\text{œuf}$  au cours du développement embryonnaire.**

## 2. Composition en acides gras

J'ai étudié les pourcentages des différents acides gras au sein des TAG, DAG et Phospholipides; la nature des AGL n'a pas été précisée ici.

### . Triacylglycérols

L'analyse des TAG, (Fig. 34), nous montre ici comme pour les lipides totaux que les trois principaux acides gras sont (C18:1), (C18:2), (C16:0). L'acide oléique (C18:1) est nettement majoritaire avec 35% de l'ensemble des acides gras comme dans les lipides totaux. L'acide linoléique (C18:2) représente ici seulement 26%, alors que dans les lipides totaux il était très proche du (C18:1). L'acide palmitique (C16:0) a une teneur sensiblement égale à celle du (C18:1). Les autres acides gras, les acides myristiques (C14:0), palmitoléique (C16:1), stéarique (C18:0), et linoléique (C18:3) représente chacun une teneur inférieure à 5%; l'ensemble fluctue peu au cours du développement embryonnaire. Notons enfin la présence de l'acide laurique en (C12:0) aux jours 3 et 7 du développement. Sa teneur bien que faible, reste

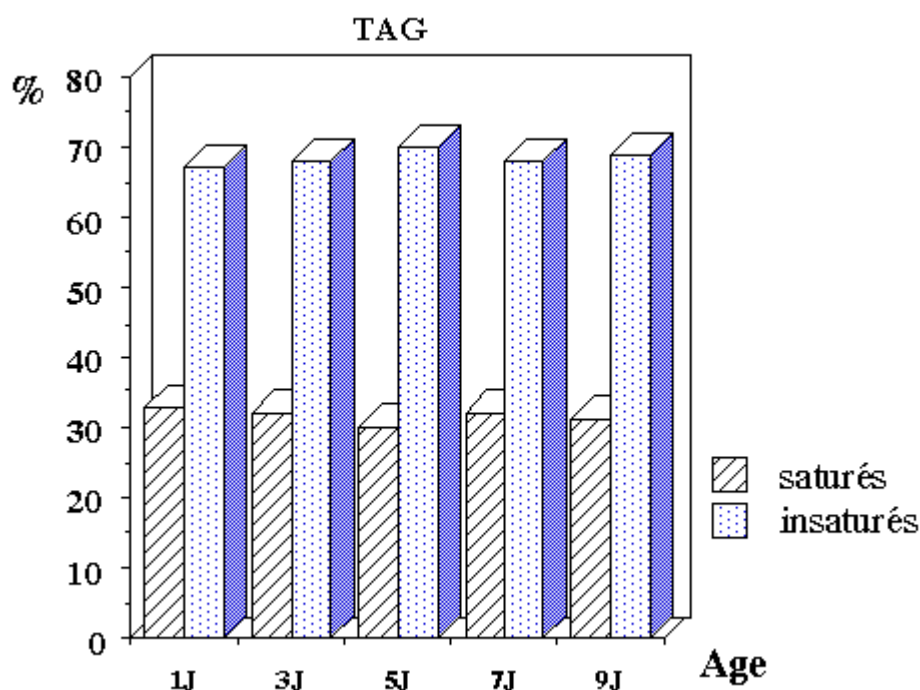




suffisante pour être quantifiée surtout au jour 7 où elle atteint près de 3% de l'ensemble des TAG.

**Fig. 34 : Evolution des pourcentages des acides gras au sein des triacylglycérols au cours du développement embryonnaire.**

Les pourcentages des acides gras saturés et insaturés dans les TAG ne fluctuent pratiquement pas au cours du développement embryonnaire. Les acides gras insaturés restent majoritaires avec près de 70% du total comme dans les lipides totaux (Fig. 35).



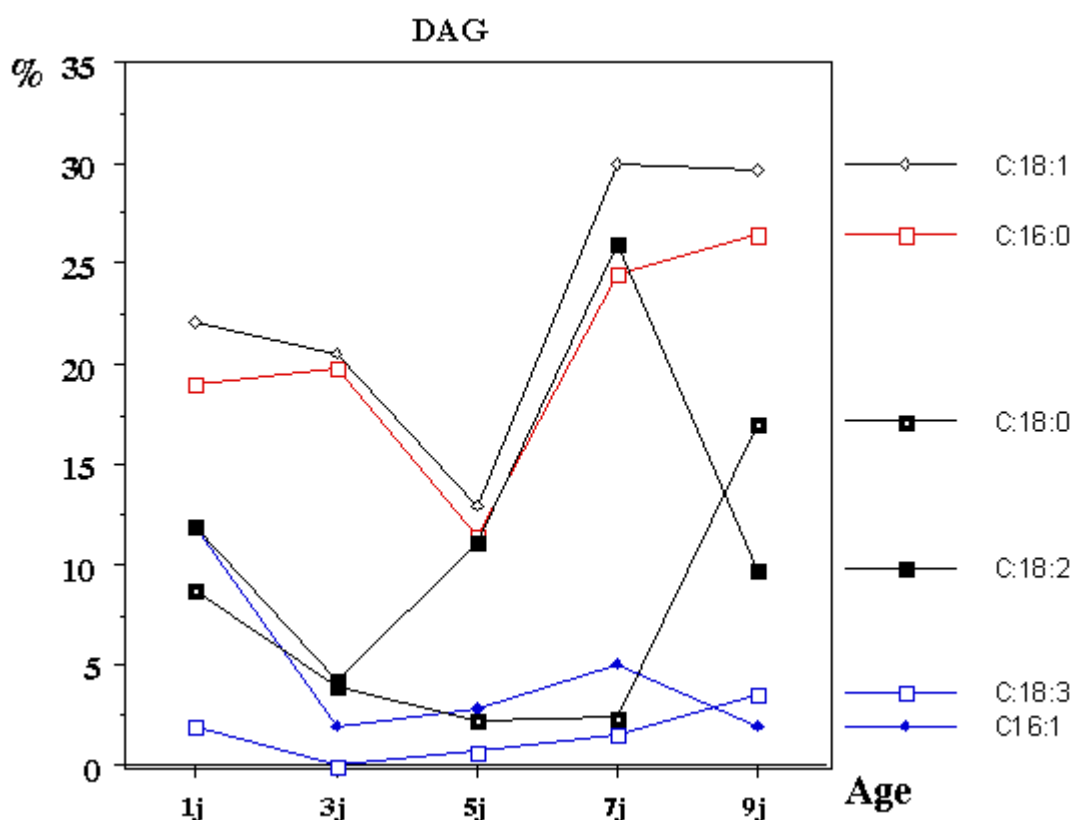
**Fig. 35 : Pourcentage des acides gras saturés et insaturés dans les triacylglycérols au cours du développement embryonnaire.**

### . Diacylglycérols

Il est assez difficile ici de préciser quels sont les acides gras majoritaires: en effet les pourcentages des différents acides gras subissent des fluctuations très

importantes au sein des DAG au cours du développement embryonnaire. En outre, certains sont absents ou très faiblement représentés à certains moments du développement. Ces fluctuations entraînent des chevauchements importants des graphiques, ce qui nous a amenés à séparer pour la clarté de la représentation les acides gras à relativement faible fluctuation (Fig. 36) de ceux à forte fluctuation (Fig. 37).

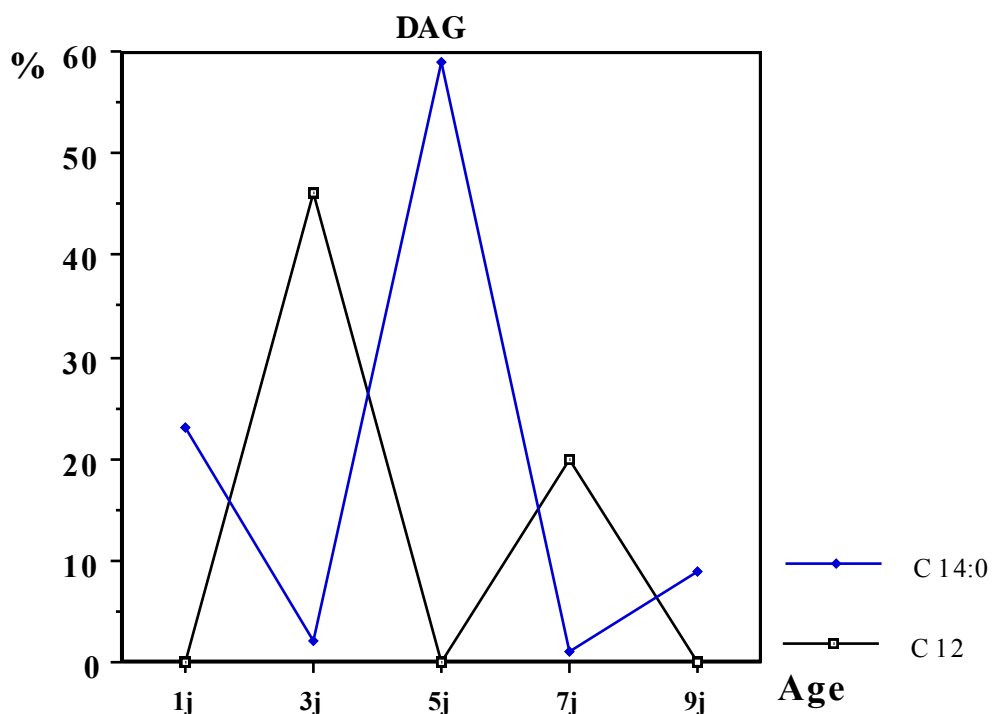
Les acides gras dont le pourcentage fluctue le moins sont les acides gras minoritaires, C18:3 (moins de 3% de l'ensemble) et C16:1 qui atteint 12% au début du développement et se stabilise aux environs de 3% par la suite (Fig. 36).



**Fig. 36 : Evolution des pourcentages des acides gras fluctuants au sein des diacylglycérols au cours du développement embryonnaire.**

D'autres acides gras présents tout au long du développement fluctuent plus fortement. Les acides stéarique (C18:0) et linoléique (C18:2) sont ceux dont les

fluctuations sont les plus accusées, avec des écarts allant de 2 à 17% du total pour le premier et de 4 à 24% pour le deuxième. L'acide oléique, C18:1 et l'acide palmitique, C16:0, nettement majoritaires dans l'ensemble, présentent une baisse importante au jour 5 où ils chutent de près de moitié, pour remonter ensuite. Malgré ces fluctuations, on peut constater que les acides oléiques, palmitique, et dans une moindre mesure l'acide linoléique, restent dominants dans les DAG comme dans les TAG. Ils représentent à eux trois au moins 35% et atteignent environ 80% des DAG le 7<sup>ème</sup> jour

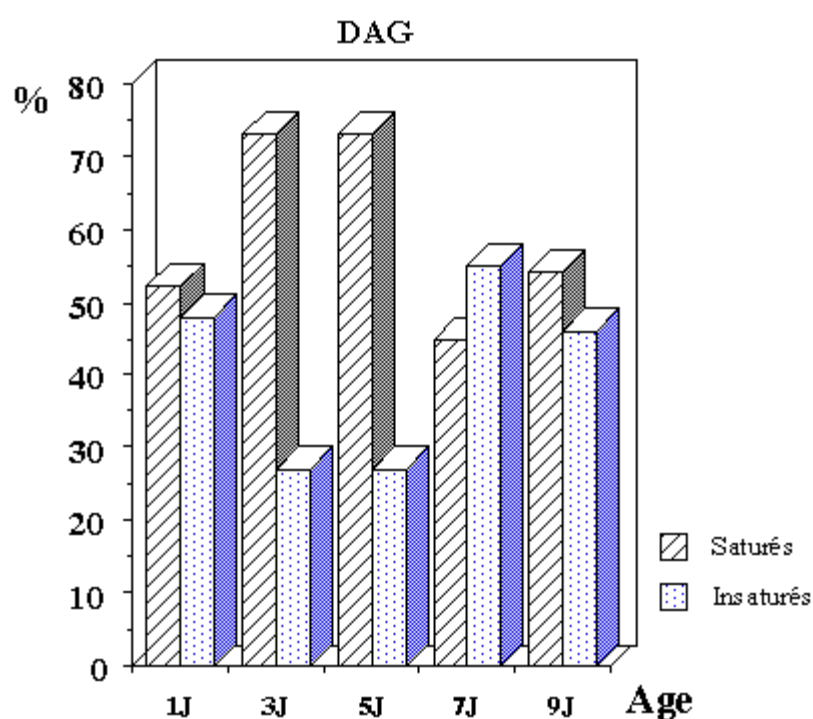


**Fig. 37 : Evolution des pourcentages des acides gras très fluctuants au sein des diacylglycérols au cours du développement embryonnaire.**

Au sein des DAG, l'acide myristique, C14:O, (Fig. 7) se comporte de façon tout à fait à part: il fluctue entre de 2 à 60% de l'ensemble au cours du développement. Les fluctuations relatives de cet acide gras sont parallèles à ses variations quantitatives qui sont très importantes, passant de 0,1µg/œuf au jour 3 à près de

3 $\mu$ g/œuf au jour 5, pour chuter à nouveau ensuite. Cette remarque s'applique d'ailleurs à l'ensemble des acides gras des DAG, dont les quantités varient parallèlement à leurs pourcentages. Enfin il faut noter la présence en quantité non négligeable de l'acide laurique (C12:0) au jour 3 où il se révèle majoritaire avec 46% de l'ensemble et au jour 7.

Aux jours 3 et 5 les acides gras saturés sont ici très fortement majoritaires (fig: 38); bien que leur pourcentage fluctue au cours du cycle ils restent toujours importants contrairement à ce que l'on observe dans les TAG.



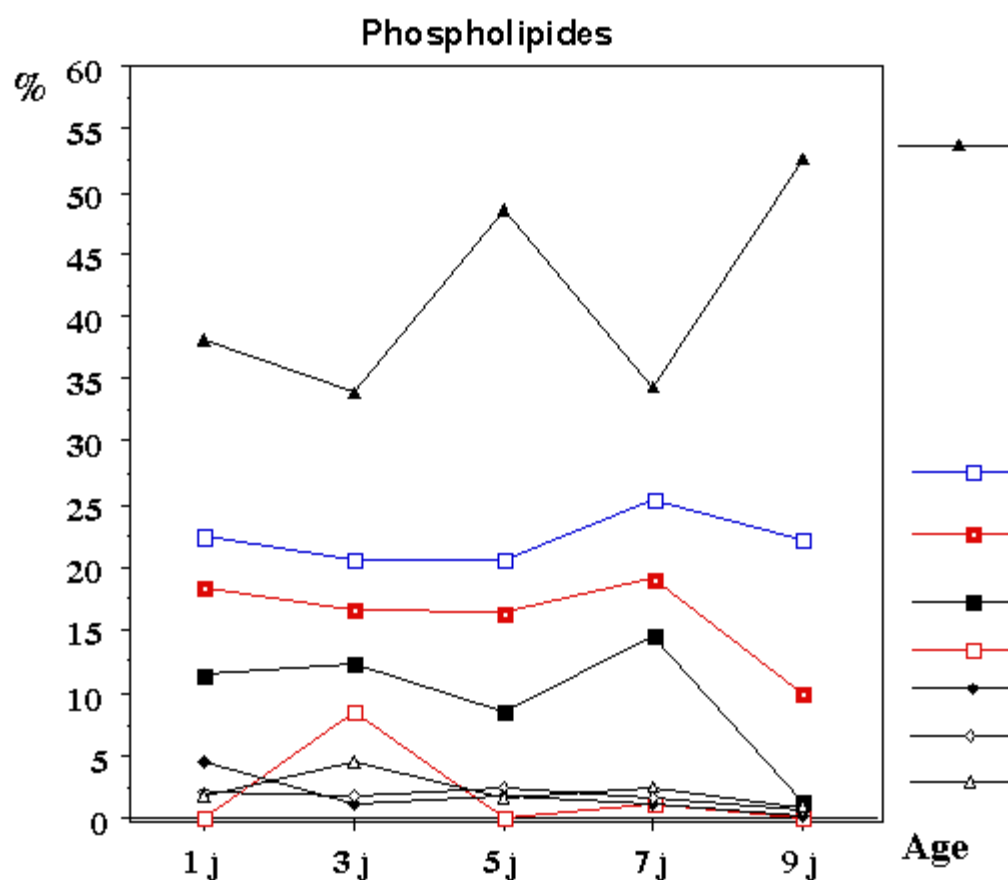
**Fig. 38 : Pourcentage des acides gras saturés et insaturés dans les diacylglycérols au cours du développement embryonnaire.**

### . Phospholipides

La composition en acides gras des phospholipides (fig. 39) nous montre qu'à la ponte les différents acides gras sont présents, la majorité étant constituée comme dans les autres classes lipidiques par les (C18:2) (C18:1), et (C16:0), suivis de près

par (C18:0). Cependant, à la différence de ce qu'on observe dans les TAG et les DAG, l'acide majeur est ici le (C18:2): il représente à lui seul toujours plus du tiers des acides gras, mais il fluctue au cours du développement, dépassant 50% au 5<sup>ème</sup> et au 9<sup>ème</sup> jour.

Les acides gras en (C16:0), (C18:0) et en (C18:1) fluctuent de façon parallèle et représentent respectivement environ 18%,12% et 23% de l'ensemble.

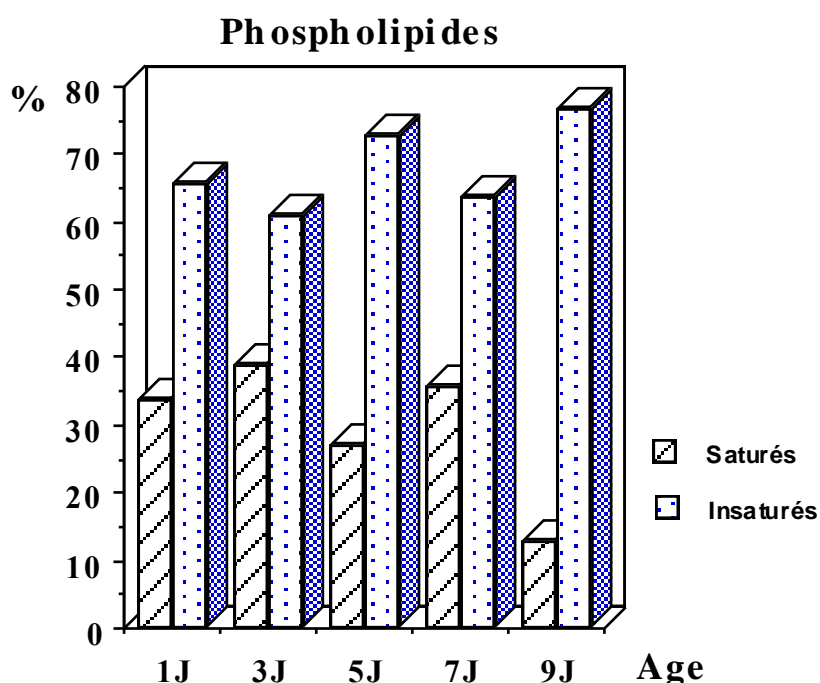


**Fig. 39 : Evolution des pourcentages des acides gras au sein des phospholipides au cours du développement embryonnaire.**

A la fin du développement juste avant l'éclosion les trois acides gras majoritaires (C18:1), (C18:2) et (C16:0) représentent ensemble près de 85% des phospholipides,

les autres n'apparaissant qu'à l'état de traces. Comme dans les DAG, l'acide laurique (C12:0) est observé au 3<sup>ème</sup> et au 7<sup>ème</sup> jour du développement.

Les acides gras insaturés sont en général majoritaires dans les phospholipides, comme pour les TAG, mais contrairement à ce qu'on a observé pour les DAG (Fig 40). Des fluctuations importantes sont notées au jour 5 et surtout au jour 9 où les acides gras insaturés atteignent près de 80%.



**Fig. 40 : Pourcentages des acides gras saturés et insaturés dans les phospholipides au cours du développement embryonnaire.**

## I. DISCUSSION

Les lipides constituent une part non négligeable des réserves stockées dans les œufs d'Insectes. Ainsi, ils représentent 26% chez *Locusta migratoria* (ALLAIS et al. 1964); 17-22% chez *Melanopolis differentialis* (SLIFER, 1930); 40% chez *Carausius morosus* et 39,5% chez *Periplaneta americana* (KINSELLA et SMYTH, 1966).

Les œufs de *L. riparia* à la ponte contiennent environ 60% de lipides par rapport au poids sec. Ce taux de lipides est très élevé comparativement à celui des autres Insectes étudiés

L'étude de l'évolution des lipides au cours de l'embryogenèse a été peu abordée d'une façon générale et les travaux sont relativement anciens.

La consommation globale de lipides au cours du développement embryonnaire montre une assez grande disparité selon l'espèce étudiée (Tableau .N°1)

Tableau N°1 : Evolution Quantitative des lipides totaux chez quelques Insectes au cours du développement embryonnaire

Insectes	Teneur en lipides en µg/œuf		Chute en % des lipides totaux
	à la ponte	à l'éclosion	
<i>Labidura riparia</i>	186µg/œuf	122µg/œuf	34
<i>Locusta migratoria</i> (Allais et al. 1964)	920µg/œuf	630µg/œuf	31
<i>Acheta domesticus</i> (Lipsitz et McFarlane, 1970)	174µg/œuf	70µg/œuf	60
<i>Plodia interpunctella</i> (Yurkiewicz et Oelsner, 1969)	2,73µg/œuf	1,67µg/œuf	38,8
<i>Spodoptera exigua</i> (Hoppe et al., 1975)	7,3µg/œuf	2µg/œuf	74%

Chez *L. migratoria*, la teneur totale en lipides chute de près de 31% durant le développement embryonnaire. La diminution des glycérides dont la majorité sont des triglycérides est de 52%. Les di. et monoglycéride semblent ne présenter aucune variation durant toute l'embryogenèse, alors que les phospholipides augmentent légèrement au cours du développement embryonnaire, (Allais et al., 1964).

Chez *P. americana* la teneur en lipides totaux chute de près de 36%. La chute des triglycérides est de 50% durant le développement embryonnaire. Les mono et les diglycérides sont présents en petite quantité (KINSELLA, 1966).

Chez *L. riparia* nous retrouvons pour le développement embryonnaire les principaux points dégagés chez les autres Insectes. Au fur et à mesure que l'embryogenèse se poursuit, le vitellus se résorbe et en même temps on observe une chute de la teneur en lipides totaux. Ici chute d'un tiers durant le développement embryonnaire. Celle-ci concerne principalement les triglycérides qui constituent plus de 80% des lipides; la disparition des lipides confirme leur rôle comme source d'énergie au cours du développement. La chute des lipides n'est cependant pas uniforme au cours du développement embryonnaire; elle se fait à vitesse variable avec une accélération au début et vers la fin du développement embryonnaire. Cette accélération dans l'utilisation des lipides coïncide avec la mise en place de l'ébauche embryonnaire au début et à la disparition des réserves vitellines observées sur coupes histologiques à la fin du 7<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire. Nos résultats rejoignent ceux des auteurs qui ont étudié l'évolution des lipides au cours de l'embryogenèse. Ainsi quel que soient les Insectes considérés il a été noté la diminution au cours du développement embryonnaire de 30 à 60% des réserves lipidiques. Les lipides neutres représentent à eux seuls près de 70%.

En même temps que les lipides diminuent, leur composition évolue: la chute des quantités de TAG est semblable à celle des lipides totaux, mais elles représentent toujours le même pourcentage au sein des lipides totaux (ici 80% environ). Chez *Spodoptera exigua* la chute des lipides totaux, parallèle à celle des triglycérides est d'environ 74% du total. (Hoppe et al., 1975).

La quantité de DAG chez *L. riparia* augmente au cours de l'embryogenèse et leur pourcentage s'accroît assez fortement au fur et à mesure que les lipides totaux diminuent: d'environ 1,6% à la ponte ils atteignent 8% des lipides à la fin du développement.

Les acides gras libres, produit de dégradation des TAG et DAG, sont toujours présents en faible quantité; ne s'accumulent pas car sont toxiques. Mais leur pourcentage par rapport aux lipides totaux augmente parallèlement à celui des DAG, indiquant une rapide dégradation de ces derniers, puis une utilisation immédiate des



acides gras libres comme source d'énergie. Chez *S. exigua* les DAG et les acides gras libres constituent 2 à 8% des lipides totaux (Hoppe et al. 1975).

Enfin, les phospholipides augmentent peu au cours du développement embryonnaire; ils représentent 9,7% des lipides totaux au début et 13% à la fin. Quantitativement les phospholipides augmentent jusqu'au jour 3 où ils atteignent 22,5µg/œuf soit 13,7% des lipides totaux pour ensuite diminuer graduellement jusqu'à la fin du développement embryonnaire. L'augmentation en phospholipides coïncide avec la phase de la mise en place de l'ébauche embryonnaire. On peut donc penser que les phospholipides sont faiblement synthétisés durant les 2 premiers jours du développement embryonnaire au moment où les mitoses sont nombreuses avant d'augmenter lors de la mise en place de l'ébauche embryonnaire. Nos résultats sont proches de ceux présentés chez *L. migratoria* (Allais et al., 1964). Chez cet Insecte les phospholipides sont quantitativement stables mais leur pourcentage augmente: 19% à la ponte, 31% à l'éclosion. Une baisse des phospholipides est observée chez la même espèce entre le 8 et le 9<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire et a été lié à la baisse des mitoses et au mouvement de blastocinèse (Allais et al 1964). Chez *P. americana* les phospholipides représente 5,6% des lipides totaux et triple durant le développement embryonnaire (Kinsella, 1966)

Tableau: N°2 : Quantités et taux de phospholipides par rapport aux lipides totaux à la ponte et à l'éclosion chez quelques Insectes.

Lipides Insectes	Lipides totaux		Phospholipides		% Phospholipides	
	ponte	éclosion	ponte	éclosion	ponte	éclosion
<i>L. riparia</i>	186 µg/œuf	122µg/ œuf	18µg/ œuf	16µg/ œuf	9,7	13,1
<i>L. migratoria</i> (Allais et al., 1966)	0,92 mg/œuf	0,63 mg/œuf	0,18 mg/œuf	0,2 mg/œuf	19,5	31,5
<i>A. domesticus</i> (Lipsitz et Mc Farlane, 1970)	174 µg/œuf	70 µg/œuf	26,3 µg/œuf	32,5 µg/œuf	15	46

<i>S. exigua</i> Kenneth et al., 1975)	7,3 µg/ œuf	2 µg/œuf	1,1 µg/œuf	0,3 µg/œuf	15	15
---	----------------	-------------	---------------	---------------	----	----

En général les pourcentages des phospholipides augmentent chez plusieurs Insectes au cours de l'embryogenèse comme nous le montre le tableau. (N° 2). Notons la forte augmentation du pourcentage des phospholipides chez *A. domesticus* (Lipsitz et Mc Farlane, 1970). L'augmentation des pourcentages des phospholipides n'est pas observée cependant chez tous les Insectes; chez *S. exigua* par exemple ils demeurent constant au cours du développement embryonnaire (Kenneth et al., 1975). Notons toutefois chez *S. exigua* que près de 73% des phospholipides initiaux sont catabolisés au cours du développement embryonnaire (Kenneth et al., 1975).

En ce qui concerne la composition en acide gras des œufs on peut constater une certaine variabilité selon la catégorie lipidique envisagée. Dans les lipides totaux, les phospholipides et les TAG, les acides oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et palmitique (C16:0) sont majoritaires suivis par le reste des acides gras. L'évolution de ces acides gras correspond d'une manière générale à celle observée chez *S. exigua* où il a été mis en évidence en plus des acides gras cités l'acide arachidique (C20:0) à l'état de traces (Kenneth et al. 1975). L'apparition du (C12:0) aux jours 3 et 7 coïncide respectivement avec la formation de la bandelette et l'achèvement de la catatrepsis à laquelle fait suite l'étalement latéral des flancs de l'embryon entamant sa fermeture dorsale. Le (C14:0) évolue à l'inverse du (C12:1).

Les acides gras insaturés dominent largement et ne fluctuent pas ou peu dans les lipides totaux, les TAG et les phospholipides. Ces résultats sont proches de ceux décrits chez le même insecte sur les lipides du tissu adipeux des femelles adultes (Sayah, 1993). Notons toutefois le pourcentage élevé des acides gras insaturés au niveau des phospholipides au jour 9.

## II. CONSEQUENCE DES MODIFICATIONS HORMONALES

### A. Effet de la Cautérisation de *pars lateralis* sur les lipides des œufs.

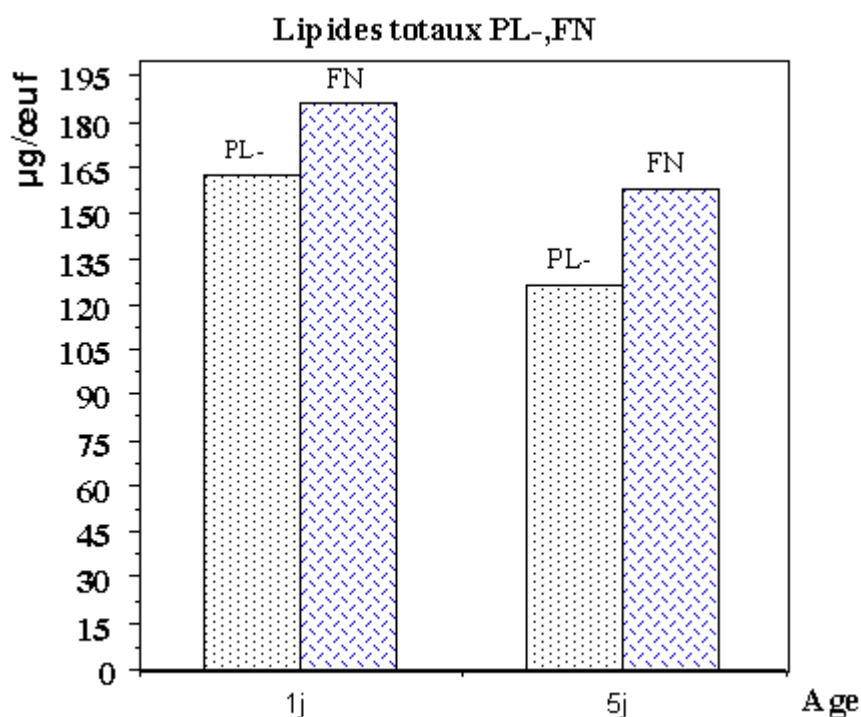
L'étude du contrôle du métabolisme lipidique est souvent limitée au tissu adipeux et au phénomène de vitellogénèse, essentiellement sur les synthèses lipidiques. Breuzet, (1990) et récemment Sayah, (1993), ont étudié le contrôle du métabolisme lipidique du tissu adipeux chez *Labidura riparia*. Le tissu adipeux des femelles, à la *pars lateralis* cautérisée, présente des différences importantes au niveau des DAG et des Phospholipides tant du point de vue qualitatif que quantitatif, (Sayah, 1993). Ces résultats nous ont amené à étudier le devenir des fractions lipidiques dans leur site final, les œufs, après suppression de la *pars lateralis* (pl-) des femelles.

Pour des raisons de développement embryonnaire inachevé des œufs de femelles (pl-) nous avons analysé les lipides totaux au 1<sup>er</sup> et au 5<sup>ème</sup> jour. L'analyse des classes lipidiques est limitée seulement aux œufs d'un jour.

## 1. Lipides Totaux

### 1.1. Variations quantitatives

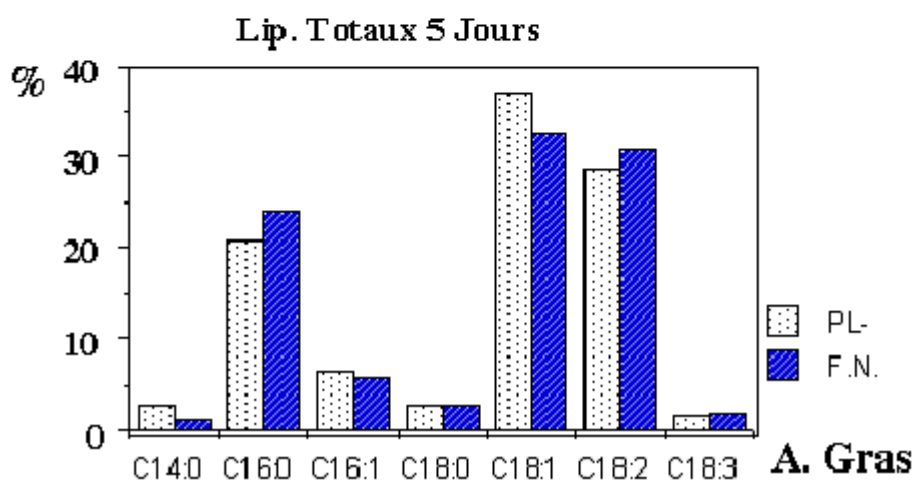
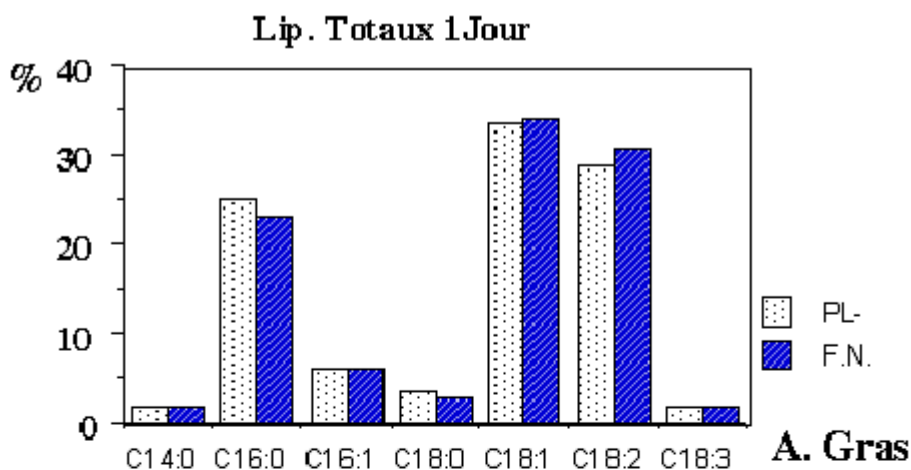
La quantité de lipides totaux des œufs des femelles opérées et témoins (normales) est représentée sur la (fig. 41). La teneur des œufs des femelles pl- en lipides totaux est inférieure d'environ 13% et 20% respectivement au 1<sup>er</sup> et au 5<sup>ème</sup> jour par rapport à celle des œufs des femelles normales.



**Fig. 41 : quantités de lipides totaux dans les œufs de femelles (PL-) et de femelles normales (en µg/œuf).**

## 1.2. Composition en acides gras

L'analyse de la composition en acides gras des lipides totaux des femelles PL- montre que leurs pourcentages sont presque identiques à ceux des femelles normales. Les acides gras insaturés avec environ 70% de l'ensemble sont majoritaires comme chez les femelles normales.

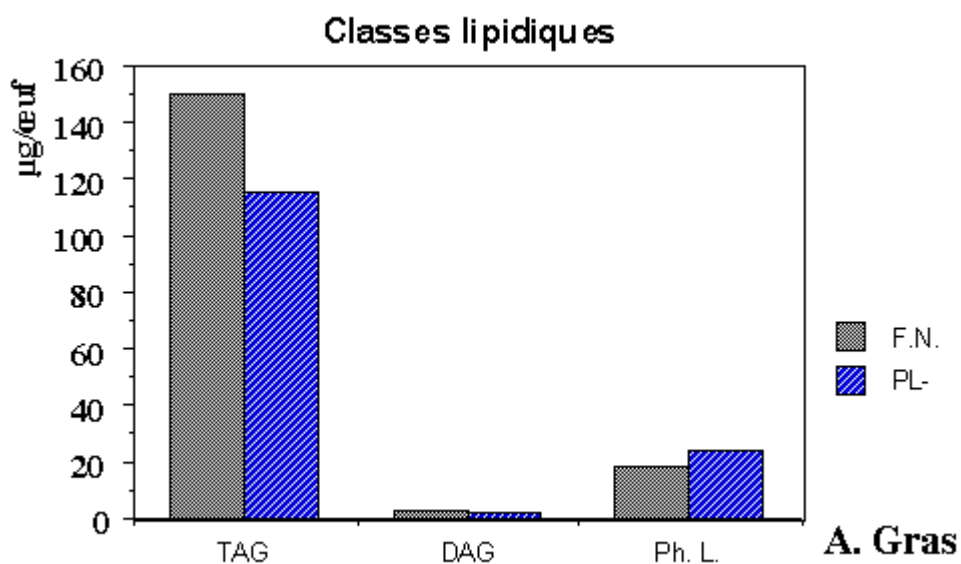


**Fig. 42 : Comparaisons des quantités d'acides gras des lipides totaux des femelles (PL-) et des femelles normales (F.N.) aux jours 1 et 5 du développement embryonnaire.**

## 2. Différentes classes lipidiques

### 2.1. Variations quantitatives

Les TAG sont les lipides majoritaires, comme dans les œufs des femelles normales. Chez les PL-, la baisse en lipide, concerne surtout les TAG. Les phospholipides chez les femelles pl- sont légèrement supérieurs avec 24 $\mu$ g/œuf contre 18 $\mu$ g/œuf chez les femelles normales. (Fig. 43). La teneur en DAG des œufs d'un jour pondus par les femelles pl- avec une quantité inférieure à 2 $\mu$ g/œuf ne présente pas de différences importantes avec ceux des femelles normales.



**Fig. 43 :** Quantités en  $\mu\text{g}/\text{œuf}$  des TAG, DAG et des Phospholipides des œufs de femelles PL- et de femelles normales (F.N.) au jour 1 du développement embryonnaire.

## 2.2. Composition en acides gras

### . Triacylglycérols

Chez les femelles PL- par rapport aux femelles normales au jour 1, nous notons une différence importante entre les acides gras en (C16:0) et en (C16:1). En effet, chez les PL- l'acide palmitique représente moins de 5% des TAG, alors qu'il est supérieur à 25% chez les femelles normales. Inversement l'acide palmitoléique chez Les PL- est d'environ 25% des TAG et près de 5% acides gras insaturés sont majoritaires, leur pourcentage dépasse les 70% chez les femelles PL- comme chez les femelles normales, (Fig. 44).

### . Diacylglycérols

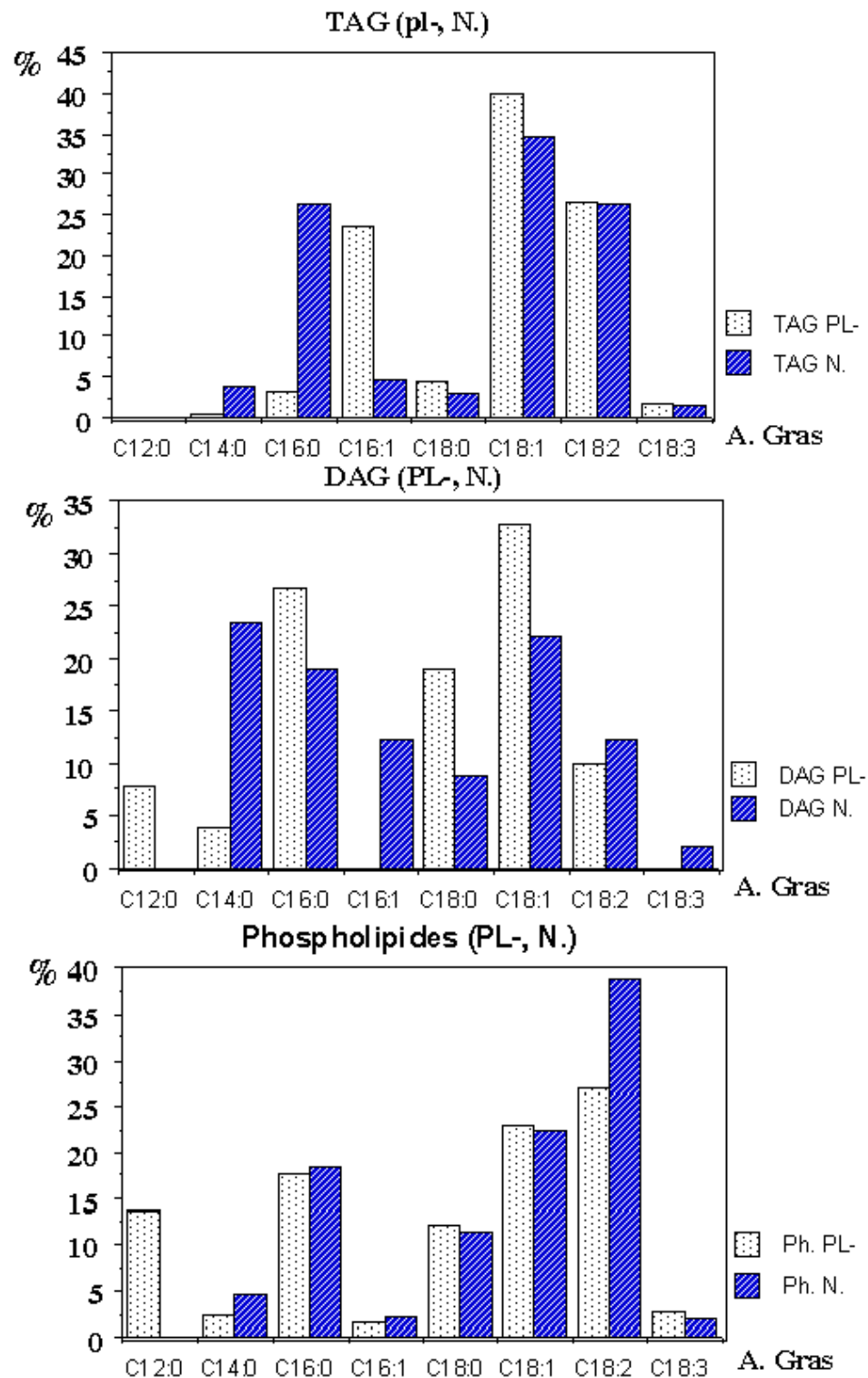
Les œufs des femelles opérées présentent des différences très importantes dans la composition en acides gras des DAG par rapport à des femelles normales (Fig. 44). Les variations concernent l'ensemble des acides gras. Les pourcentages des acides gras en (C14:0) et (C16:1) sont très fortement inférieurs à ceux des femelles normales. Le (C14:0) baisse de 23% à 4% et le (C16:1) disparaît alors qu'il atteignait près de 13% chez les femelles normales. En revanche les acides gras en (C16:0), (C18:0) et le (C18:1) sont plus élevés chez les femelles PL-. Ils passent respectivement d'environ 27%, 19% et 33% à 19%, 9% et 22% chez les femelles normales.

Notons enfin la présence de l'acide laurique (C12) dans les œufs de femelles p<sup>l</sup> dès la ponte alors que cet acide n'est présent qu'au 3<sup>ème</sup> jour du développement dans les œufs des femelles normales. Concernant les acides gras saturés et insaturés nous n'observons pas de différence entre les femelles opérées et les femelles normales.

#### **. Phospholipides**

La composition en acides gras des œufs de femelles opérées est presque identique à celle des acides gras des œufs de femelles normales, (Fig.44) à l'exception de deux acides gras. Nous notons en effet, d'abord la présence du (C:12) à environ 13% alors qu'il n'est pas observé à la ponte chez les femelles normales et aussi le pourcentage de (C18:2) inférieur de près de 12% chez les femelles opérées.

Enfin les acides gras insaturés sont toujours majoritaires dans la ponte des deux types de femelles.



**Fig. 44 :** Composition en acides gras des TAG, DAG, et Phospholipides des œufs des femelles PL- et des femelles normales au jour 1.

### III. Discussion



Chez *L. riparia* la cautérisation de la *pars lateralis* provoque une vitellogenèse continue et les dégénérescences folliculaires cycliques n'apparaissent plus. (SAYAH, 1993). La destruction de la *pars lateralis* n'inhibe ni l'activité protéosynthétique ni la production des vitellogenines au niveau du tissu adipeux par contre elle empêche la mobilisation des lipides osmiophiles et leur substitution par des lipides non osmiophiles, (Sayah et al., 1992). Dans cette espèce le métabolisme lipidique des femelles adultes serait régulé par des neurohormones de la *pars lateralis*, dont l'action pourrait être directe ou par l'intermédiaire d'une autre hormone.

A la ponte les quantités de lipides totaux et de triacylglycérols et leur composition sont semblables dans les œufs des femelles normales et les opérées. Par contre on note une différence qualitative importante au niveau des diacylglycérols et des phospholipides. dans ces 2 classes lipidiques les œufs des femelles privées de *pars lateralis* voient apparaître de l'acide laurique (C12:0). Au niveau des DAG les différences touchent les acides gras (C14:0) et (C16:1).

L'absence de *pars lateralis* provoque chez les femelles de *L. riparia* au niveau du tissu adipeux une diminution des DAG (près de 3/4) et des phospholipides, ce qui suggère soit une inhibition de la mobilisation des TAG en DAG, soit peut être une accélération de la libération des lipides considérés comme mobiles (DAG et phospholipides) dans l'hémolymphe (Sayah et al., 1993). Dans les œufs à la ponte des femelles pl-, ne retrouvant pas de baisse importante des lipides totaux par rapport au femelles normales et sachant que les lipides sont incorporés dans les œufs sous forme de DAG nous considérons que nos résultats vont dans le sens de la deuxième hypothèse, à savoir que l'ablation de la *pars lateralis* accélérerait la libération des lipides mobiles. Toutefois il resterait l'apport des lipides par la nourriture qui pourrait corriger le déficit engendré par l'ablation de la *pars lateralis*. L'ablation de la *pars lateralis* chez la femelle provoque dans les lipides du tissu adipeux comme sur ceux des œufs une désorganisation dans les rapports existants entre les différents acides gras au niveau des DAG et des phospholipides.

## CONCLUSION GENERALE

Les travaux exposés dans cette thèse nous permettent d'apporter notre contribution à préciser quelques points de la physiologie de la femelle de *Labidura riparia* plus particulièrement sur le développement embryonnaire. Certains résultats peuvent être considérés comme originaux et d'autres confirment des résultats acquis antérieurement. Les cycles reproducteurs de la femelle de *L. riparia* résultent d'un complexe d'états comportementaux physiologiques qui se superposent et interfèrent. Les premiers travaux ont mis en évidence l'existence de cycles reproducteurs caractérisés par l'alternance de deux périodes distinctes. Celles-ci sont définies pour la première fois par Caussanel, (1970). La première période est une période de vitellogenèse à l'issue de laquelle environ 90 œufs sont pondus. La seconde qui est appelée « période de soin aux œufs » s'étend depuis la ponte jusqu'à l'éclosion des jeunes. Cette période est également appelée « période de repos ovarien », Breuzet, (1991), car l'ovaire conserve une taille réduite et il est le siège de dégénérescences folliculaires.

Dans notre cas la période de soins est celle qui nous a particulièrement intéressé du fait que notre travail s'est porté sur les œufs. Durant cette phase la femelle observe un jeûne total. Son activité est essentiellement tournée vers les œufs. Elle les brosse, évitant ainsi l'installation des moisissures. Elle assure également leur rotation qui est indispensable au développement des embryons. Cette attitude et ce comportement demeurent soumis à un certain nombre d'exigences écologiques et physiologiques en l'absence desquelles la femelle dévore sa ponte. Ces exigences nous demandent durant notre travail une attention soutenue et une application sans faille de mesures très strictes des modalités d'élevage de l'insecte. En effet, l'assèchement des pondoirs déclenche immédiatement une activité fébrile. Une augmentation ou une baisse de quelques degrés de la température, une intervention ou prélèvement brutal ou brusque des œufs pour échantillonnage peuvent provoquer un arrêt d'activité maternelle ou entraîner des réactions d'oophagie.

Les premiers résultats concernent les principales étapes de l'embryogenèse. L'édification d'une ébauche embryonnaire est visible *in vivo* vers la fin du troisième jour après la ponte. L'allongement et la segmentation de l'ébauche embryonnaire sont rapides et à la fin du 4<sup>ème</sup> jour qui suit la ponte, l'embryon forme une bandelette allongée, segmentée. Le volume de l'œuf, jusque là stable, augmente à partir du 5<sup>ème</sup> jour par suite de l'absorption de l'eau. Le raccourcissement de la bandelette embryonnaire et son élargissement commencent vers la fin du 5<sup>ème</sup> jour. Au 6<sup>ème</sup> jour les mouvements de la catatrepsis amènent l'embryon à prendre son

orientation définitive sur la face ventrale de l'œuf. La fermeture dorsale débute au 7<sup>ème</sup> jour et s'achève au 8<sup>ème</sup> jour. Le fait important qu'il faut mettre en évidence est que l'embryogenèse chez les Dermaptères est intermédiaire entre le développement considéré primitif des œufs à periplasme très réduit et le développement évolué à periplasme épais et bandelette d'emblée allongée. Il resterait à poursuivre les travaux sur la présence d'ébauches appendiculaires rudimentaire sur le segment intercalaire pour confirmer ces observations.

Dans nos conditions d'analyse, l'incorporation de traceur protéique, couplée avec des électrophorèses en Page-SDS, nous a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment (Breuzet, 1990) et mis en évidence dans les ovocytes en vitellogenèse, la présence de quatre fractions protéiques majeures (O1, O2, O3, et O4) dont les poids moléculaires sont respectivement de 115 kD, 95 kD, 75 kD, et 60 kD. Trois fractions protéiques sont observées, Vg1, Vg2, et Vg3, synthétisées dans le tissu adipeux uniquement pendant la période de vitellogenèse. L'analyse d'homogénat d'ovaire de femelles en période de vitellogenèse comme en période de repos ovarien a montré la synthèse constante de la fraction 28 kD spécifique à l'ovaire. D'une manière générale la vitellogenèse fournit des vitellogénines des phosphoglycoprotéines, des oligomères contenant des sous unités de masse moléculaire s'étendant de 50 à 180 kD. La synthèse et la sécrétion de vitellogénines est extra-ovarienne, dans la plus grande partie dans le corps gras des femelles.

Les polypeptides vitellins sont dégradés sélectivement et d'une façon limitée produisant des sous unités de faibles poids moléculaires. Le phénomène est mis en évidence pour la première fois suite à l'étude de polypeptides composant les œufs de *Artemia salina* (DeChaffoy et Kondo, 1980). L'activité protéique démontrant la dégradation des protéines a été démontrée chez plusieurs Insectes *Dociaustaurus maroccanus* (Lichethenstein et al., 1949) ; *Schistocerca gregaria* (Kuk-Meiri et al. 1966) ; *Locusta migratoria* (Shulov et al. 1957) ; *Blatella germanica* (Purcell et al. 1988) ; *Bombyx mori* (Liu et al., 1997). Une protéinase cystéine-cathépsine de 39 kD a été observée associée aux granules vitellins des œufs de la drosophile (Medina et al., 1988). Les études les plus avancées sont réalisées sur le *Bombyx mori* où il a été démontré l'activité régulée de la protéase à un pH acide (Yamamoto et al., 1994). Des observations similaires ont montré chez le moustique *Aedes aegypti*, une carboxypeptidase synthétisée par le corps gras de la femelle internalisée par les ovocytes comme proenzyme. Celle-ci est activée dans l'embryon en développement (Cho et al., 1991).

Chez *Prolixus rodhnius*, triatomines, trois populations de vitellines dénommées Vt1, Vt2, Vt3 ont été également observées (Salerno et al., 2002). Cependant, l'évolution des fractions

protéiques observées à partir des préparations SDS-PAGE nous montre uniquement leurs présences leurs intensités et leurs apparitions ou leurs disparitions.

L'explication de l'apparition de fractions protéiques durant le développement embryonnaire résulterait de la dégradation et l'hydrolyse des polypeptides. (Masetti et Giorgi, 1989 ; Bownes et Hames, 1978 ; Irie et Yamashita, 1983 ; Mendes et Schoeller-Raccaud, 1986). Reste à savoir comment se fait cette dégradation et comment se déclenche-elle ? Selon Giorgi et al. (1999), la dégradation est limitée et se fait par étape. La restriction de la dégradation des polypeptides est imposée par la structure des protéines elles-mêmes, la nature des enzymes protéiques ou encore des produits de protéines aux fonctions inconnus, inapurés chez l'embryon.

Bien que des expériences soient nécessaires pour clarifier la nature des matières intervenant dans la dégradation des protéines durant le développement embryonnaire des Insectes quelques hypothèses peuvent être prises en considération et faire l'objet de futures recherches. En premier, la protéolyse limitée ou contrôlée peut être le seul mécanisme compatible avec la présence fortement spécifique de pro-protéases d'origine maternelle qui sont confinées dans les granules vitellins pendant la vitellogenèse. L'enzyme protéolytique doté d'une spécificité large ne pourrait pas être internalisée même sous une forme inactive. En second lieu, la protéolyse limitée et non généralisée à l'ensemble du vitellus constituant les réserves dans l'œuf peut être un mécanisme approprié de dégradation étalé dans le temps. A partir de ces deux procédés, la protéolyse limitée peut fournir selon la demande de l'embryon ou son état de développement des dérivés de protéines de faibles poids moléculaires. De cette manière, ce procédé graduel accélérerait la dégradation complète des granules vitellins. D'ailleurs, la dégradation limitée au début du développement embryonnaire des protéines accompagnerait la diminution de la pression osmotique et ionique, force qui accompagne nécessairement la dégradation complète des protéines en acides aminées avant leur activation et polymérisation. Notons aussi l'importance de l'acidification des granules vitellin qui est responsable de l'activation certaines protéases pendant l'embryogenèse (Takahashi et al., 1996, Ryouichi et al., 2005). Les protéases isolées du vitellus sont essentiellement actives dans les gammes pH de 3 à 5 et inactives au pH neutre. Plus complexe encore, l'acidification des granules vitellins n'est pas entière dans l'ensemble de l'œuf. Chez *C. morsus* elle évolue d'un compartiment de granules à l'autre au fur et à mesure du développement embryonnaire (Fausto et al., 1997). Si l'acidification est un événement qui déclenche la protéolyse du vitellus la

question posée est comment se fait ce procédé sélectif et différentiel. Sachant que les granules vitellin ont été internalisés dans les œufs en polypeptides ou en compartiment cellulaires distinct pendant la vitellogenèse, ensuite dégradées par les vitellophages envahissants, alors le mécanisme ferait qu'il ait création à nouveau des canaux d'ions et de protons composant la membrane formant les sacs de granules vitellin.

Les dosages au Bradford des protéines ont montré que lors de la formation de l'embryon entre le 4<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour bien qu'il y ait une activité intense chez l'embryon dans sa formation et dans ses mouvements de blastocinèse et catatrepsis nous avons noté une stabilité du taux de protéine d'environ 0.8 µg/œuf. Durant cette période la technique de mesure au Bradford nous montre uniquement une forte activité protéolytique aux périodes de développement indiquées et qui sont mises en évidence par les protéines à faibles poids moléculaires. L'utilisation des protéines n'est donc pas entière chez l'embryon de *L. riparia* durant une bonne période de son développement. Chez *R. prolixus* seulement 15% de vitellus est utilisé pour la formation de l'embryon jusqu'au déroulement de sa catatrepsis et plus de 50% est utilisée à l'intérieur de l'intestin de l'embryon (Oliveira et al., 1989).

Les insectes parcourent leur vie larvaire en un certain nombre de stades séparés par des mues, exuviation et ecdysis qui sont marquées par le rejet de l'ancienne cuticule, l'exuvie. Chez l'embryon plusieurs auteurs ont signalé l'existence de ces mues appelées, mue embryonnaires (Muller, 1963) ; (Buillière, 1970-1971) ; (Louvet, 1976). La cuticule chez les insectes est largement étudiée particulièrement chez la drosophile Guan et al., (2006), Moussian et al., (2006). Si chez les larves les exuviations sont faciles à observer et à suivre, chez l'embryon par contre enfermé dans les enveloppes de l'œuf, ne subit pas d'ecdysis et donc pas de mue au sens strict.

L'observation en microscopie électronique nous permet de suivre la sécrétion, le dépôt des cuticules et également de déterminer les stades de développement correspondant, de l'embryon.

Les cuticules sont secrétées d'après nos observations et celles des auteurs que nous avons cités toujours de la même façon ; du matériel diffus s'accumule au sommet de microvillosités à l'extérieur des cellules.

Ce matériel va former progressivement une couche continue. Cette couche, épicuticule, se décolle des microvillosités tandis que du matériel fibrillaires se dépose entre les microvillosités et l'épicuticule. Ce matériel et au début clair ensuite il s'assombri.

Chez *Labidura riparia*, la première cuticule secrétée dès le 5<sup>ème</sup> jour n'acquiert pas les caractéristiques connues d'une vraie cuticule. Elle est mince et rudimentaire.

La deuxième cuticule est par contre chez la plupart des Insectes une cuticule typique. Nous l'avons précisé chez *L. riparia*. Cette cuticule qui est observée qu'à partir du 7<sup>ème</sup> jour embryonnaire, à la fermeture dorsale est en fait la cuticule larvaire. La 2<sup>ème</sup> cuticule chez *Labidura riparia* a la même signification que celle observée chez *C. erythrocephala* (Bordès-Alleaum et sami, 1987).

On sait depuis longtemps que chez la larve d'insecte la production des cuticules est sous la dépendance des hormones de mue ou ecdystéroïdes. Par ailleurs on sait qu'au moment de leur ponte les œufs d'insectes contiennent des ecdystéroïdes en quantité plus ou moins importantes selon les espèces étudiées. Chez *Locusta migratoria* plusieurs auteurs (Lagueux et al., 1984), (Gilbert., 1980), (Sealia et Morgan, 1982) ont montré que des ecdystéroïdes étaient stockés dans l'œuf sous la forme conjugués. Les conjugués seraient ensuite hydrolysés par les cellules sérosales ou embryonnaires selon les besoins du développement, libérant ainsi des hormones libres et actives jusqu'à ce que les glandes spécialisées de l'embryon soient devenues fonctionnelles.

Chez les embryons décapités de *carausius morosus* (Fournier, 1985), la production globale des ecdystéroïdes ne paraissait guère affectée par l'absence de tout le complexe endocrine Céphalique. Les embryons décapités montraient en particulier un pic des réponses à la genèse de la deuxième cuticule à la fermeture dorsale.

Dans notre cas, le taux faible des ecdystéroïdes observé à la ponte, 20 pg/mg, comparé à celui des pontes ovulaires, 90 pg/cm supposerait que les tissus embryonnaires sont capables d'assurer des processus métaboliques ; C – 20 hydroxylation et conjugaison de la 20 – Hydroxyecdysone. Les cellules embryonnaires doivent donc contenir les enzymes spécifiques indispensables à leur réalisation.

L'étude des ecdystéroïdes libres montrent que l'embryon de *L. riparia* contient ces substances en quantité relativement faible par rapport à celles trouvées par exemple chez *Locusta migratoria* (Lagueux, 1978), *Schistocerca gregaria* (Gande et Morgan, 1979 ; Dinan et Rees, 1981) ou *Carausius morosus* (Louvet et al., 1976). La quantité des ecdystéroïdes chez l'embryon inférieure à 25 pg/ œuf est également inférieure à celle obtenue dans les ovocytes des femelles et qui est de 221 pg, (résultat non montré). Si l'origine des ecdystéroïdes est maternelle qu'en est-il pour ceux que nous dosons particulièrement à partir du 7<sup>ème</sup> jour de

développement embryonnaire. A partir de quel moment le jeune embryon est-il capable de synthétiser lui-même l'ecdysone ?

Les recherches sur les ecdystéroïdes se sont orientées beaucoup plus sur leur nature et leur composition, c'est-à-dire leur identification. Actuellement les recherches à la suite des avancées réalisées en génie génétique s'orientent sur des études caractérisant les gènes intervenant dans tel ou tel action des ecdystéroïdes (Simdut, 2004)

On admet en général que chez les femelles adultes d'Insectes l'ovaire est le site de biosynthèse des ecdystéroïdes revue dans Hagedorn, (1985). Chez *L. migratoria* (Coltzené et al., 1978) ; *Nauphoeta cinerea* (Zhu et al., 1986) et *Tenebrio molitor* (Soltani et al., 1999). La cellule folliculaire entourant l'ovocyte représente le site précis de cette biosynthèse. Par ailleurs on sait que chez la larve d'Insecte la production de cuticule est sous la dépendance des hormones de mue et d'ecdystéroïdes sécrétées par des glandes spécialisées comme les glandes prothoraciques chez *L. migratoria* ou les glandes ventrales de la tête chez le phasme. Des travaux ont montré après décapitation des embryons de *Clitumnus* et *Carausius* la production des ecdystéroïdes indispensable à la genèse de la 2<sup>ème</sup> cuticule embryonnaire en l'absence des glandes ventrales et de corps allates. Il n'en reste donc pas moins vrais que les tissus embryonnaires, ni endocrines ni céphaliques, sont capables d'assurer deux processus métabolique : C-20 hydroxyecdysone et conjugaison de la 20 hydroxyecdysone. Leurs cellules doivent donc contenir les enzymes spécifiques indispensables à leur réalisation. Peut-être contiennent-elles aussi d'autres facteurs permettant le contrôle de ces processus tout au long du développement embryonnaire.

Le taux de lipide enregistré dans les œufs de *L. riparia* d'environ 60% du poids sec fait de cet Insecte l'une des espèces riche en réserves lipidiques emmagasinées dans les ovocytes. Durant le développement embryonnaire la teneur des lipides chute de près de 31%. Cette chute concerne principalement les triglycérides qui constituent plus de 80% des lipides. L'utilisation des lipides n'est cependant pas uniforme durant le développement embryonnaire. Nous avons noté une utilisation accrue des lipides au début et à la fin du développement embryonnaire.

La première utilisation a coïncidé avec la formation de l'ébauche embryonnaire. Notons que la chute des lipides ne présente pas ou peu de corrélation avec les dosages des activités lipasiques. Si les lipides diminuent d'une manière constante à l'exception des chutes accélérées citées précédemment, l'activité lipasique ne commence à s'élever qu'à partir du 4<sup>ème</sup> jour, période coïncidant avec la segmentation embryonnaire et la formation de la première cuticule. L'évolution des acides gras au sein des différentes classes lipidiques a montré toujours la

dominance de l'acide oléique. Si au niveau des TAG, l'évolution des acides gras est semblable à celle des lipides totaux, au niveau des DAG on a plutôt noté des fluctuations importantes de ces derniers. Concernant les phospholipides dont le taux passe de 9.7% à la ponte à 13.1 % à l'éclosion, les acides gras majoritaires, (C 18 :1), (C 18 :2) et (C 16 :0) les composent pour environ 85%. L'acide laurique (C 12 :0) est observé au jour 3 et 7 du développement embryonnaire, ce qui suppose sa participation dans la formation de la bandelette embryonnaire et à la fermeture dorsale.

Les résultats obtenus sur le contrôle endocrine par la *pars-lateralis* observé dans notre cas directement sur la nature des œufs après sa cautérisation ne montre pas de différences importantes en ce qui concerne les quantités de lipides totaux et les triacylglycérols. L'ablation cependant de la *pars-lateralis* chez la femelle de *L. riparia* Provoque dans les lipides une désorganisation dans les rapports existants entre les différents acides gras au niveau des DAG et des phospholipides.

Pendant l'ovogenèse les œufs accumulent une grande quantité de lipides qui lui sont fournis par des lipophorines. (Chino et al., 1981, Kawooya et al., 1988, Sun et al., 2000, Ziegler et Ibrahim, 2001). L'activité lipasique dans les œufs chez *L. riparia* a montré une accélération à partir du 7<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire. En général nous avons des taux de lipides faible en acide gras libres et en diacylglycérols. Ce taux est de l'ordre de 3% au premier jour et évolue lentement pour atteindre 8 à 10% des lipides totaux à la fin du développement embryonnaire. Ces taux d'acides gras libres et des diacylglycérols expliqueraient l'activité lipasique faible au début et qui s'intensifie vers la fin du développement embryonnaire. Le taux d'acide gras saturés ( AGS) et insaturés (AGI) et leur rapport dans les différentes classes lipidique montrent des variations notables. Dans les lipides totaux et triacylglycérol, le rapport AGS/AGI qui est de 0.4 demeure constant durant toute la durée du développement larvaire. Cependant au niveau des diacylglycérols nous observons un remaniement important. Au jour 3 et 5 les AGS sont très fortement majoritaire, le rapport AGS/AGI est de 3. Ce rapport durant les autres jours de développement embryonnaire est toujours proche de un(1). Enfin, au niveau des phospholipides nous retrouvons la dominance des AGI. Il est à souligné aussi le rapport AGS/AGI au 9<sup>ème</sup> jour où il n'est que de 0.16.

Sachant que les plantes comme les animaux, ne peuvent synthétiser des acides gras insaturés directement. La production des acides gras ne peut se faire qu'à partir des acides gras saturés sous l'action d'enzyme, désaturases. Ceci expliquerait les variations des rapports



GS/AGI et du degré d'insaturation des acides gras qui varie selon les besoins de l'embryon pendant son développement.

Une étude de l'évolution des lipides au cours des principales étapes, émergence, en milieu de vitellogenèse et à la fin de la vitellogenèse à la ponte ovulaire du cycle de reproduction chez la femelle de *L. riparia* a été réalisée par Sayah (1993). Comparativement à notre travail, cette dernière étape, ponte ovulaire correspondrait aux dosages que nous avons réalisés sur les œufs à la ponte. A ce titre nous n'avons pas observé de différences importantes à retenir sur l'évolution des différents acides gras dans les classes lipidiques. Cependant, les rapports AGS/AGI au niveau des phospholipides sont de l'ordre de 2.6 et 0.5 respectivement pour les ovocytes à la ponte ovulaire et les œufs d'un jour. Le rapport élevé à la ponte ovulaire est la conséquence de l'apparition de l'acide arachidique (C 20 :0) (Sayah, 1993). Nous assistons donc à une désaturation en un temps très court de quelques heures seulement. L'autre fait important porte sur les diacylglycérols où l'on note entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire de *L. riparia* un rapport identique de l'ordre de 0.37 alors qu'il est très proche de un (1) au 1<sup>er</sup>, au 7<sup>ème</sup> et au 9<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire. Ces résultats demeurent exceptionnels du fait qu'ils ne soient notés qu'à l'âge indiqué des embryons et uniquement au niveau des DAG.

Chez les animaux le métabolisme des acides gras comprend deux composantes, la lipogénèse et la lipolyse. La lipogénèse consiste à synthétiser un acide gras par condensation de molécule d'acide acétique à deux carbones en consommant de l'énergie sous forme d'ATP. La lipogénèse ou  $\beta$  oxydation qui consiste à dégrader des acides gras en unités acétyl en produisant de l'énergie sous forme d'ATP. La lipogénèse a lieu dans le cytoplasme des cellules (foie, tissus adipeux et glandes mammaires chez les mammifères) sans pouvoir de synthèse d'acides gras insaturés. La synthèse est réalisée par un complexe multienzymatique. Chez l'embryon de *L. riparia* et chez les Insectes on pourrait considérer que le phénomène n'aurait lieu qu'après la dégradation des granules vitellins et un développement d'un cytoplasme intergranulaire et la liquéfaction du vitellus à la suite du développement des vitellophages. Les acides gras concernés sont l'acide laurique C12 :0 et l'acide myristique C14 :0. Ces deux acides confirment donc la lipogénèse qui permet la synthèse uniquement d'acides gras saturés à moins de 16 carbones. La synthèse d'acides gras insaturés à partir d'acides gras saturés a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique par certaines enzymes de la lipolyse des acides gras désaturases.

Quant à l'effet de cautérisation de la pars lateralis et ses conséquences sur la constitution et l'évolution des lipides dans les œufs lors du développement embryonnaire, nous ne pourrions que confirmer la désorganisation dans les rapports entre les acides gras au niveau des TAG et des phospholipides.

Les résultats auxquels nous sommes arrivés et l'étude menée, portant sur la chronologie du développement embryonnaire, ou sur la cuticulogenèse et l'évolution des ecdystéroïdes, ou encore sur l'utilisation des protéines et des lipides au cours du développement embryonnaire de *L. riparia* sont à notre sens un ensemble de données et de procédés qui peuvent servir dans l'étude physiologique de tout Insecte. A cet effet et dans la perspective de l'approfondissement des connaissances de la biologie des Insectes ravageurs des productions agricoles, notre travail apporterait des informations précises sur chacune des phases de développements de l'embryon, informations, qui serviraient pour l'élaboration d'éventuelles interventions de lutte dont à titre d'exemple, l'utilisation d'ooparasite, de produit de synthèse inhibant la mue.

## R E F E R E N C E S   B I B L I O G R A P H I Q U E S

1. ALLAIS J.P., BERGERARD J., ETIENNE J., and POLONOVSKI J. (1964) - Nature et évolution des lipides au cours de l'embryogénèse de *Locusta migratoria migratorioides* (L.), J. Insect. Physiol. 10, 753-772.
2. BAST R.E., TELFER. W. H., (1976). Follicle cell protein synthesis and its contribution to the yolk of the *Cecropia* moth oocyte. Developmental Biology, Volume 52, Pages 83-97.
3. BEYDON P., PERMANA A.D., COLARDEAU J., MORINIÈRE M., LAFONT R. (1989). Ecdysteroids from developing eggs in *Pieris brassicae*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 11: 1-12.
4. BORDES-ALLEAUME N., SAMI L. (1987). Ecdysteroid titres and cuticle depositions in embryos of the Dipteran *Calliphora erythrocephala*. Invert. Reprod. Dev. 11: 109-122.
5. BOROV D. et WHITNEY P.L. (1987), Biosynthesis, purification and characterization of *Aedes aegypti* vitellin and vitellogenin. Arch. Ins. Biochem. Pysiol., 4, 81-99.
6. BOROVSKY D., HANDEL, E.V. (1979). Does ovarian ecdysone stimulate mosquitoes to synthesize vitellogenin. Journal of Insect Physiology, Volume 25, Pages 861-865.
7. BOSE G., RAIKHEL A.S., (1988). Mosquito vitellogenin subunits originate from a common precursor. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 155, Pages 436-442.
8. BOWNES M. (1982). The role of 20-hydroxy-ecdysone in yolk-polypeptide synthesis by male and female fat bodies of *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology, Volume 28, Pages 317-328.
9. BOWNES M., B. HAMES, D. (1978). Analysis of the yolk proteins in *Drosophila melanogaster*: Translation in a cell free system and peptide analysis FEBS Letters, Volume 96, Pages 327-330.
10. BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantified of protein utilising the principle of protein-dye-binding. Annal. Biochem. 72 :245-54.
11. BREUZET M. (1990), Analyse du tissu adipeux et des ovaires au cours des cycles reproducteurs chez *Labidura riparia* (Insectes, Dermaptère); contrôles endocrines. Thèse ès Sciences, Univ. P. et M. Curie. Paris, 170 p.
12. BREUZET M., LAVERDURE A.M., et THOMAS A. (1984). Synthèses protéiques intr-ovocytaire chez les Insectes. 7<sup>ème</sup> Colloque de physiologie de l'Insecte, France.
13. BULLIERE D. (1970). Régénération et facteurs endocriniens chez les Insectes. C.R. Acad. Sci., Paris 271, 353-356.
14. BULLIERE D. (1971). Utilisation de la régénération intercalaire pour l'étude de la détermination cellulaire au cours de la morphogénèse chez *Blabera craniifer* (Insecte Dictyoptère). Developmental Biology, Volume 25, August, Pages 672-709.

15. BULLIERE F. (1973). Cycles embryonnaires et sécrétion de la cuticule chez l'embryon de blatte, *Blaber craniifer*. J. Insect Physiol. 19: 1465-1479.
16. BULLIERE D., BULLIERE F., DE REGGI M. (1979). Ecdysteroid titres during ovarian and embryonic development in *Blaber craniifer*. Wilhem Roux arch., 186: 103-114.
17. CAPINERA JL. (2008). Encyclopedia of entomology. 2<sup>ème</sup> éd. Vol. 4 pp. 1274-1280.
18. CAUSSANEL C. et VANCASSEL M, (1968), Contribution à l'étude descriptive du comportement de la biologie de *Labidura riparia* (Dermaptère, *Labiduridae*). Rev. Comp. Anim., 2, 1-8.
19. CAUSSANEL C. (1970). Principales exigences écophysiologiques du forficule des sables, *Labidura riparia* (Derm. *Labiduridae*). Ann. Soc. Ent. Fr. (N S). 6: 589-612.
20. CAUSSANEL C. (1971). Phénomènes de dégénérescence folliculaires avant la ponte et pendant les soins aux œufs chez le Forficule : *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptère). C. R. Acad. Sci. Paris. 272: 83-86.
21. CAUSSANEL C. (1975), Cycles reproducteurs de la femelle de *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptère) et leurs contrôles neuroendocrines. Thèse Doctorat ès Sciences, Univ. Paris VI, 127 p.
22. CAUSSANEL C., OLIVIER A., ARNAULT C., BREUZET M., et KARLINSKY A., (1981). Modes d'action des œufs dans le comportement de *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptère). C.R. Acad. Sc. Paris, 293. 727-729.
23. CHEN T.T., COUBLE P., De LUCCA F.L. et WYATT G.R. (1976), Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria*. In "the Juvenile Hormone ". Ed. Gilbert L.I., Plenum Press, New-york and london, 505-529.
24. CHEN T. T., SRAHLENDORF and WYATT G.R. (1978), Vitellin and vitellogenin from locusts (*Locusta migratoria*): Properties and post-translational modification in the fat body. J. biol. Chem. 253, 5325-5331.
25. CHINO H., DOWNER R.G.H. and TAKAHASHI K. (1977). The role of diacylglycerol-carrying-lipoprotein I in lipid transport during insect vitellogenesis. Biochem. Biophys. Acta, 487-516.
26. CHINO H., DOWNER R.G.H., WYATT G.R., GILBERT L.I. (1981). Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect haemolymph. Insect Biochemistry, Volume 11, Page 491.
27. CHINO H. (1985). Lipid transport: Biochemistry of hemolymph lipophorin. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacologie" vol.10 (Eds G.A. Kerkut and L.I. Gilbert), pp. 115-136. Pergamon Press; Oxford.
28. CHO W-L., DEITSCH K.W., RAIKHEL A.S. (1991). An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. Proceedings of National Academy of Science, USA, 88 10 821-10 824.
29. DeCHAFFOY D. et KONDO M. (1980). Vitellin from the crustacean *Artemia salina*. Biochemical analysis of lipovitellin complex from the yolk granules. Journal of biological Chemistry 255, 6727-6733.
30. DELLA-CIOPPA, C; et ENGLEMAN, F. (1984), Juvenil hormone regulation of phospholipid synthesis in endoplasmic reticulum of vitellogenic fat body cells from *Leucophaea maderae*. Insect Biochem., 14:27:36.

31. DINAN L. N., REES H.H. (1981). The identification and titres of conjugated and free ecdysteroids in developing ovaries and newly-laid eggs of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, Volume 27, Pages 51-58.
32. ENGELMANN F. (1979). Insect Vitellogenin: Identification, Biosynthesis, and Role in Vitellogenesis, *Advances in Insect Physiology*, Volume 14, Pages 49-108.
33. ESPIG W., THIRY E., HOFFMANN K.H. (1989). Ecdysteroids during ovarian development and embryogenesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer. *Invert. Reprod. Dev.* 15, 143-154.
34. FAUSTO A.M., MAZZINI M., CECCCHITTINI A. GIORGI F., (1997). The yolk sak in late embryonic development of the stick insect *Carausius morosus* Br. *Tissu and cell.*, 29 (3) 257-266.
35. FAUSTO A.M., GAMBELLINI G., MAZZINI M., CECCHETTINI A., GIORGI F. (2001). Yolk granules are differentially acidified during insect emryo development in stick insect *Carausius morosus*. *Cell and tissue Research*. Vol. 305, 3. 437-443.
36. FOLCH J., LEES M. et SLOAN-STANLEY G.H. (1957), A simple méthode for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226; 497-509.
37. FOURNEY, R. M., PRATT, G. F., HARNISH, D. G., WYATT, G. R., WHITE B. N. (1982). Structure and synthesis of vitellogenin and vitellin from *Calliphora erythrocephala*. *Insect Biochemistry*, Volume 12, Pages 311-321.
38. FOURNIER B., (1985). Secrétions cuticulaires et ecdysteroïdes chez les embryons décapités du phasme *Carausius morosus* Br. *Intern. j. of inver. Reprod.and dvpt.* 1985, vol. 8, no6, pp. 349-362.
39. GABE M. (1968), *Techniques histologiques*. Ed. Masson, Paris, 113.
40. GANDE A. R., MORGAN E. D. (1979). Ecdysteroids in the developing eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, Volume 25, Pages 289-293.
41. GILBER L.I., (1967). Lipid metabolism and function in Insects. *Adv. Insect Physiol.*, 69-211.
42. GEORGIE C.A., KATIA C.G., EDNILDO A.M., HATISABURO M. (2005). Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Acad. Brasileira de Ciencias Vol. 77 Rio De Janeiro*.
43. GIORGI F., BRADLEY J.T., NORDIN J.H., (1999). Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron.* 30, 579-596.
44. GLASS H. et EMMERICH H. (1981). Properties of two follicles proteins and their possible role for vitellogenesis in the African locust. *Wilh. Roux's. Arch.*, 190, 22-26.
45. GOLTZENE F., LAGUEUX M., CHARLET M., and HOFFMANN J.A. (1978). The follicle cell epithelium of maturing ovaries of *Locusta migratoria*: a new biosynthetic tissue for Ecdysone. *Z. physiol. Chem.* 359. 1427-1434.
46. GRELLET P. 1971. Analyse expérimentale de l'absorption d'eau dans l'œuf de *Scapsipedus marginatus* (Orthoptère, Gryllidé). *Journal of Insect Physiology*, Volume 17, Pages 1533-1553.
47. GUAN X, MIDDLEBROOKS BW, ALEXANDER S, WASSERMAN SA. (2006). Mutation of Tweedle D., a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:16794–16799.

48. GULTZEIT H.O. (1980). Expression of the zygotic genome in blastoderm stages of *Drosophila*: analysis of a specific protein ; wilh. Roux's Archiv. 188. 153-156.
49. HADGET A. (1977). L'Embryologie des Insectes. Traité de zoologie, ed. P.P. Grassé, t.VIII, fas. V-B. 2-238, Masson, Paris.
50. HAGEDORN P. (1979). A special case of integrability in a system with one quasi-cyclic coordinate. International Journal of Non-Linear Mechanics, Volume 14, Pages 143-147.
51. HAGEDORN H.H., et KUNKEL J.G., (1979). Vitellogenin and vitellin in Insects. Ann. Rev. Entomol., 24, 475-505.
52. HASS JK., CASSIAS KA, Woodhead AP, STAY B. (2003). The Effect of Ovary Implants on Juvenile Hormone Production by Corpora Allata of Male Diptera Punctata. 6 pp. Journal of Insect Science, 3:30.
53. HAVEMANN J., MÜLLER U., BERGER J., SCHWARZ H., GERBERDING M., MOUSSIAN B. (2008). Cuticle differentiation in the embryo of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. Cell Tissue Res; 332(2): 359–370.
54. HEYMONS R. (1895). Die Embryonal entwicklung von Dermapteren und Orthopteren unter besonderer Berücksichtigung der Keimblätterbildung, Gustav Fischer, 136 p.
55. HILL L., LUNTZ A.J., and STEEL P.A. (1968). The relationships between somatic, ovarian growth and feeding activity in the adult desert locust. J. Insect. Physiol., 14: 1-20. Kerkut and LI. Gilbert), pp. 115-136. Pergamon Press; Oxford.
56. HOPPE, K.T., HADLEY, N.F., TRELEASE, R.N. (1975). Changes in lipid and fatty acid composition of eggs during development of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Journal of Insect Physiology, Volume 21, Pages 1427-1430.
57. INDRASITH, L.S., FURUSAWA, T., SHIKATA, M., YAMASHITA, O. (1987). Limited degradation of vitellin and egg-specific protein in *Bombyx* eggs during embryogenesis. Insect Biochemistry, Volume 17, Pages 539-545.
58. IRIE K. et YAMASHITA O. (1983). Egg-specific protein in the silkworm *Bombyx mori*: purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. Insect Biochemistry 13, 71-80.
59. KAWOOYA J.K., LAW J.H. (1983). Purification and properties of microvitellogenin of *Manduca sexta* role of juvenile hormone in appearance and uptake. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 117, Pages 643-650.
60. KAWOOYA J.K., OSIR E.O., et LAW J.H. (1988). Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the Insect egg. J. Biol. Chem., 263: 8740-8747.
61. KENNETH T.H., NEIL F.H., and RICHARD N.T. (1975). Changes in lipid and fatty acid composition of eggs during developpement of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, J. Insect. Physiol. 21, pp. 1427-1430.
62. KINSELLA J.E., 1966. Phospholipid patterns of *Periplaneta americana* during embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology, Volume 17, Pages 635-640.
63. KINSELLA J.E., et SMYTH JR, T. (1966). Lipid metabolism of *Periplaneta americana* L. during embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology, Volume 17, Pages 237-242.
64. KUK-MEIRI S., LICHTENSTEIN, N., SHULOV, A., PENER, M. P. (1966). Cathepsin-type proteolytic activity in the developing eggs of the African migratory locust

- (*Locusta migratoria migratorioides* R. & F.). Comparative Biochemistry and Physiology, Volume 18, Pages 783-795.
65. KUNKEL J.G., et PAN M.L. (1976). Insect vitellogenin: comparative properties and specific uptake. *Am. Zool.*, 10, p 513.
  66. LAGUEUX M. (1978). Recherches sur l'ecdysone présente dans les ovaires adultes de *Locusta migratoria*: biosynthèse, destinée, fonction. Thèse de doctorat d'Etat, Univ. Louis Pasteur, Strasbourg, France ;
  67. LAGUEUX M. HETRU C., GOLTZENE F., KAPPLER F.C., HOFFMANN J. A. (1979). Ecdysone titre and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, Volume 25, Pages 709-723.
  68. LAGUEUX M., HOFFMANN J.A., GOLTZENE F., KAPPLER C., TSOUPRAS G., HETRU C., LUU B. (1984). Ecdysteroids in ovaries and embryos of *Locusta migratoria*. Biosynthesis, Metabolism and Mode of action of Invertebrate hormones. (ed. by J.A. Hoffmann and M. Porchet) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 168-180.
  69. LAVERDURE A.M., BREUZET M., et THOMAS A. (1986). Les protéines ovariennes : caractères et évolution. 8<sup>ème</sup> colloque de physiologie de l'Insecte. France.
  70. LIPSITZ E.Y., MCFARLANE J.E. (1970). Total lipid and phospholipid during the life cycle of the house cricket, *Acheta domesticus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Volume 34, Pages 699-705.
  71. LICHTHENSTEIN N., BODENHEIMER F.S., SHULOV A. (1949). Proteolytic enzymes of insects. II. Proteases of the eggs of the Moroccan locust (*Dociostaurus maroccanus* Thnbg). *Enzymologia* 13, 276-280.
  72. LIU X.D., Mc. CARRON R.C., NORDIN J.H. (1997). A cysteine protease that processes insect vitellin. *Journal of Biological Chemistry* 271, 33, 344-351.
  73. LOUVET J. P. (1974). Observations en microscopie électronique des cuticules édifiées par l'embryon, et discussion du concept de mue embryonnaire dans le cas du phasme *Carausius morosus* Br. (*Insecta Phasmidae*). *Z. Morph. Tiere.* 78: 159-179.
  74. LOUVET J.P. (1976). Morphogenèse du pleuropode chez l'embryon de *Carausius morosus* Br. (Phasmida : Lonchodidae): étude au microscope électronique à balayage. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, Volume 5, Pages 35-49.
  75. LUBZENS TIETZ A., PINES M., APPLEBAUM S. W. (1981). Lipid accumulation in oöcytes of *Locusta migratoria migratorioides*. *Insect Biochemistry*, Volume 11, Pages 323-329.
  76. LUFT J.H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 409-414.
  77. MALTETE F. (1962). Contribution à l'étude chronologique de l'embryogénèse chez *Locusta migratoria* R. et F., développement des corps allates et de glandes ventrales de la tête. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Univ. Bordeaux France. 211p.
  78. MARTOJA R. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale Ed. Masson, Paris, 346 p.
  79. MASETTI M. et GIORGI F. (1989). Vitellin degradation in developing embryos of the stick insect *Carausius morosus*. *Journal, Insect. Physiol.* 35, 689-697.

80. MEDINA L., LEON P., VALLEJO C.G. (1988). *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. Archives of Biochemistry and Biophysics 263, 355-363.
81. MENDES H. et SCHOELLER-RACCAUD J. (1986). Evolution comparative des granules vitellins et des vitellin au cours de l'embryogenèse de *Calliphora vicina* (= *Erythrocephala*) (Diptère Cyclorraphe). C.R. Acad. Sci. Paris. 303, 391-396.
82. MCGREGOR D.A. and LOUGHTON B.G. (1974). Yolk protein degradation during embryogenesis of the african migratory locust. Canad. J. Zool. 52. 907-917.
83. MOUSSIAN B, SEIFARTH C, MÜLLER U, BERGER J, SCHWARZ H. (2006). Cuticle differentiation during *Drosophila* embryogenesis. Arthropod. Struct. Dev. 35:137-152
84. MULLER N.S. (1963). An experimental analysis of molting in embryos of *Melanoplus differentialis*. Devel. Biol. 8. 222-240.
85. MULLER N.S. et BUCKLIN D.H. (1985). Developments and molting of *Hyalophora cecropia* embryos in vitro. Ann. Soc. Zool. 5. 206-212.
86. MUNDALL EC., TOBE SS., STAY B. 1981. Vitellogenin fluctuations in haemolymph and fat body and dynamics of uptake into oocytes during the reproductive cycle of *Diploptera punctata*. Journal of Insect Physiology 27:821-827.
87. OLIVEIRA PL., PETRETSKI MDA and MASUDA H. (1989). VT processing and degradation during embryogenesis in *R. prolixus*. Insect Biochem 19: 489-498.
88. OLIVIER A. (1984). Rôle des œufs et des voies génitales dans le comportement maternel chez *Labidura riparia* Thèse 3<sup>ème</sup> Cycle. Univ. Paris VI. 218p.
89. ONO S., NAGAYAMA H. et SHIMURA K., (1975). The occurrence and synthesis of female-and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 5, 313-329.
90. PEFEROEN M., DE LOOF A. (1986). Synthesis of vitellogenic and non-vitellogenic yolk proteins by the fat body and the ovary of *Leptinotarsa decemlineata* Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, Volume 83, Pages 251-254.
91. PETAVY G. (1979). Le système extra-embryonnaire de l'œuf du criquet migrateur : constitution, évolution, rapports avec le développement de l'embryon et l'hydratation de l'œuf. Thèse de doctorat, Univ. Paris sud.
92. PETAVY G. (1986). Contribution of the vitellogens to yolk digestion and cytophagocytosis during embryogenesis of the migratory locust, *locusta migratoria* L. (*Orthoptera: Acrididae*). International Journal of Insect Morphology and Embryology, Volume 15, Pages 343-361.
93. PORCHERON P., MORINIERE M., GRASSI J., PRADELLES P. (1989). Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. Insect Biochem. 19: 117-122.
94. PURCELL J.P., KUNKEL J.G., NORDIN J.H., (1988). Yolk hydrolase activities associated with polypeptide and oligosaccharide processing of *Blatella germanica* vitellin. Archives of Insect Biochemistry and physiology 8, 39-58.
95. RAIKHEL A.S. et LEA A.O. (1983). Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body; selective degradation of golgi complexes and secretory cells. Tissue and cell, 15, 281-300.



96. RAIKHEL A.S., PRATT L.H., LEA A.O. (1986). Monoclonal antibodies of yolk protein in the mosquito: production and characterize. *J. Insect. Physiol.* 32:879-90.
97. REYNOLDS E. S. (1963). The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-211.
98. RINTERKNECHT E., MATZ G. (1977). Etude ultrastructurale des dépôts cuticulaires chez l'embryon de *Leucophaea maderae* Fabr. (Insecte Dictyoptère) *C. R. Acad. Sci. Paris.* 284: 3295-2397.
99. ROULAND C. (1979). Protéïnémie et vitellogenèse au cours des cycles reproducteurs de la femelle de *Labidura riparia*. Thèse 3ème Cycle, Univ. Paris VI, 90 p.
100. ROULANT C., TARROUX P., KARLINSKY A. et CAUSSANEL C. (1981), La vitellogénine et son évolution au cours des cycles reproducteurs de la femelle de *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptère); variation expérimentales. *C.R. Acad. Sc.*, 292, 565-568.
101. RYOUICHI Y., YAMAHAMA Y., and SONOB H., (2005). Realise of Ecdysteroid-Phosphates from Egg Yolk Granules and Their Dephosphorylation during Early Embryonic Development in Silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Sci. Japan*, 22: 187-198
102. SALERNO, A.P., DANSA-PETRETSKI, M., SILVA-NETO, M.S.L., COELHO, H.S.L., MASUDA, H. (2002). Rhodnius prolixus vitellin is composed of three different populations: comparison with vitellogenin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 32, Pages 709-717.
103. SAYAH F., BREUZET M., et KARLINSKY A. (1992). Régulation des métabolismes protéique et lipidique au cours des cycles reproducteurs chez *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptère). *C. R. Acad. SC. Paris*, 314:309-315.
104. SAYAH F. (1993). Roles des ecdysteroides et des centres neuroendocrines dans les controles du métabolisme lipidique et du cycle reproducteur de *Labidura riparia* (Insecte Dermaptère). Thèse Doct. Univ. ParisVI p157.
105. SAYAH F., BLAIS C., BREUZET M., et KARLINSKY A. (1991). Ecdysteroids during the gonadotrophic cycle of the *Labidura riparia* females (Dermaptera). *Invert. Reprod. Dev.* 19: 185-192.
106. SAYAH F., BLAIS C., BREUZET M., et KARLINSKY A. (1993). Neuroendocrine control of ecdysteroid titres and gonadotrophic cycles in the insect *Labidura riparia* females. *Invert. Reprod. Dev.* 19 : 185-192
107. SBRENNA G. (1974). The fine structure and formation of the cuticles during the embryonic development of *Schistocerca gregaria* forskal (Orthoptera, Acridiida), *J. Submicr. Cytol.* 6: 287-295.
108. SCALIA S., et MORGAN E. D. (1982). A re-investigation on the ecdysteroids during embryogenesis in the desert Locust, *Schistocerca gregaria*, *J. Insect Physiol.* 28: 647-654.
109. SHULOV A., et PENNER M.P. (1959). A contribution to knowledge of the development of the egg of *Locusta migratoria migratorioides* (R. and F.). *Locusta*, 6, 73-88.
110. SHULOV A., PENER, M. P., KUK-MEIRI, S., LICHTENSTEIN, N. (1957). Proteolytic enzymes in various embryonic stages of the eggs of *Locusta migratoria migratorioides* (R. and F.). *Journal of Insect Physiology*, Volume 1, Pages 279-285.
111. SLIFER E.M., (1930). Insect development: Fatty acids in the grasshopper egg. *Physiol. Zool.* 3, 503-518.
112. SOLTANI-MAZOUNI N., EL-MAHDI KHEBBEB M., SOLTANI N. (1999). Production d'ecdysteroides ovariens Durant la maturation des ovocytes chez *Tenebrio molitor* (L.). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* Vol.35, pp82-86.

- 113.SOLTANI A., GHASSEMI-GOLEZANI, K., KHOOIE, F. R., MOGHADDAM M. (1999). A simple model for chickpea growth and yield. *Field Crops Research*, Volume 62, Pages 213-224.
- 114.STORELLA JR. WOJCHOWSKI et KUNKEL J.G., (1985). Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach, *Periplaneta Americana*. *Insect Biochem.* 15:259-275.
- 115.STORELLA J.R., WOJCHOWSKI, D.M., KUNKEL, J.G. (1985). Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach, *Periplaneta americana* *Insect Biochemistry*, Volume 15, Issue 2, 1985, Pages 259-275.
- 116.SUN J, HIRAOKA T, DITTMER NT, CHO K AND RAIKHEL AS. (2000). Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 1161-1171
- 117.TAKAHASHI S.Y., YAMAMOTO Y., ZHAO X.F., WATABE S. (1996). Bombyx acid cysteine proteinase. *Invertebrate Reproduction and Development.* 30, 265-281.
118. TAWFIF A.I., TANAKA Y., TANAKA S. (2002). Possible involvement of ecdysteroids in embryonic diapause of *Locusta migratoria*. *J. Insect. Physiol.* 48(7):743-749.
- 119.TELFER W.H. (1954). Immunological studies of Insect metamorphosis.II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by *Cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.*, 37, 539-558.
- 120.URKIEWICZ W.J., OELSNER, J. (1969). Neutral lipid metabolism during embryonic development of the Indian-meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Volume 28, Pages 955-958.
- 121.VANCASSEL M. et CAUSSANEL C., (1968). Contribution à l'étude du comportement de *Labidura riparia* (Dermaptère, Labiduridae) (revue du comportement animal, tome 2:1-8.
- 122.YAMAMOTO Y., ZHAO X., SUZUKI A., TAKAHACHI S.Y. (1994). Cysteine proteinase from the egg of the silkworm *Bombyx mori*: site of synthesis and a suggested role in yolk degradation. *Journal of Insect Physiol.* 40, 447-454.
- 123.YAMASAKI K. (1973). Characterization and partial purification of a mannam-like polysaccharide in the eggs of *Locusts migratoria*. *Insect Biochem.* 3, 79-90.
- 124.ZALOCAR M. (1971). Fixation of *Drosophila* eggs without pricking. *Drosophila inf. Serv.* 47: 128-129.
- 125.ZHU J., INDRASITH LS., and YAMASHITA O. (1986). Characterization of VT, egg-specific protein and 30 kDa protein from *Bombyx* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta* 882: 427-436.
- 126.ZIEGLER R. et IBRAHIM MM., (2001). Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 47: 623-627.
- 127.ZONGZA V., DIMITRIADIS, GJ. (1988). Vitellogenesis in the insect *Dacus oleae*. Isolation and characterization of yolk protein mRNA, *Insect Biochemistry*, Volume 18, Pages 651-660.



## Cuticulogénèse et évolution des ecdystéroïdes chez l'embryon de *Labidura riparia* (insecte dermaptère)

*Cuticulogenesis and ecdysteroids in Labidura riparia embryos (Insecta, Dermaptera)*

NABIL BERTELLA, FOUAD SAYAH, MICHEL BREUZET

Université Pierre-et-Marie-Curie, Laboratoire de physiologie des insectes, 4, place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France.

### RÉSUMÉ

Chez *Labidura riparia* le développement embryonnaire dure 10 jours à 27 °C et 70 % d'humidité. Une ébauche embryonnaire est visible au 3<sup>e</sup> jour. Elle devient une bandelette segmentée au 4<sup>e</sup> jour. La blastocinèse est achevée au 7<sup>e</sup> jour ; en même temps commence la fermeture dorsale de l'embryon. Une 1<sup>re</sup> cuticule rudimentaire est sécrétée avant le 5<sup>e</sup> jour par la bandelette embryonnaire. Une 2<sup>e</sup> cuticule apparaît au 7<sup>e</sup> jour au moment de la fermeture dorsale. Celle-ci est typique et sera la cuticule des larves de 1<sup>er</sup> stade. L'apolyse de cette 2<sup>e</sup> cuticule coïncide avec l'éclosion de la larve. Deux pics d'ecdystéroïdes libres sont observés, le 1<sup>er</sup> au 8<sup>e</sup> jour et le 2<sup>e</sup> au moment de l'éclosion. Il y a donc une corrélation entre les pics hormonaux, la synthèse de la 2<sup>e</sup> cuticule et son apolyse. ▲

**Mots clés :** développement embryonnaire, cuticulogénèse, ecdystéroïdes, insectes.

### ABSTRACT

In *Labidura riparia*, embryonic development lasts 10 days at 27° C and 70% RH. A germ band is perceptible on the 3rd day. It becomes segmented on the 4th day. Blastokinesis is achieved on the 7th day at the beginning of the dorsal closure of the embryo. A first rudimentary cuticle is secreted by the germ band before the 5th day. A second cuticle appears on the 7th day. This cuticle is typical and will cover the first instar larvae. The apolysis of this second cuticle coincides with hatching. Two ecdysteroid peaks are observed during embryonic development. The first peak arises on day 8 and the second one at hatching. There is therefore a correlation between the ecdysteroid titre increase and the synthesis of the second cuticle as also its apolysis. ▲

**Key words:** embryonic development, cuticle deposition, ecdysteroids, insects.

Abridged version (see p. 583-4)

**A**u cours de leur développement, les embryons d'insectes synthétisent plusieurs cuticules. Généralement 3 cuticules sont déposées successivement ; c'est le cas par exemple de *Locusta migratoria* [1], *Schistocerca gregaria* [2], *Leucophaea maderae* [3] et *Carausius morosus* [4]. Cependant, seulement 2 cuticules différentes ont été observées au cours de l'embryogénèse de *Blabera craniifer* [5] et de *Calliphora erythrocephala* [6].

La présence d'ecdystéroïdes dans les œufs de diverses espèces d'insectes a amené à envisager un contrôle des mues embryonnaires comparable à celui qui règle les mues larvaires. Effectivement des corrélations ont été établies entre les taux d'ecdystéroïdes et la formation des cuticules embryonnaires chez différentes espèces, telles *L. migratoria* [1], *S. gregaria* [2], *C. erythrocephala* [6].

Chez le dermaptère *Labidura riparia*, les ecdystéroïdes s'accumulent dans l'ovaire au cours de la vitellogénèse [7]. Aucune donnée n'existe ni sur l'évolution des ecdystéroïdes ni sur la cuticulogénèse au cours de l'embryogénèse de cet insecte. Heymons [8] ne donne aucune indication sur les conditions dans lesquelles se développent les œufs dans sa description de l'embryogénèse de *Forficula auricularia*, autre dermaptère.

Note présentée par Constantin Chararas.

Note remise le 10 mars 1995, acceptée le 13 mars 1995.

Correspondance : N. Bertella.

**Abstract**

Metabolism of the yolk during embryonic development *Labidura riparia* (Insect Dermaptera)

**abstract**

This study was performed on the eggs and embryos from *Labidura riparia*, insect Dermaptère. Embryonic development lasts for 10 days at 27 ° C and 70% humidity. Embryonic draft is visible on the 3rd day. It becomes a strip segmented on the 4th day. Blastokinesis is completed on the 7th day; at the same time begins the dorsal closure of the embryo. Embryonic development is intermediate between the considered primitive periplasme eggs very reduced and development evolved thick periplasme and immediately elongated Strip. 1st rudimentary cuticle is secreted by the embryonic Strip until the 5th day. 2Nd cuticle appears on Apolysis of this 2nd cuticle coincides with the outbreak of the larva. Two free ecdysteroids peaks are observed on the 8<sup>th</sup> day. The second was observed at the time of the outbreak. There is therefore a correlation between hormone peaks, the 2nd cuticle synthesis and its apolysis.

Protein assays, although there is an intense activity in formation and movements of the embryo between the 4th and 8<sup>th</sup> day, showed approximately 0.8 µg/egg protein stability. In the eggs, we note the presence of four major protein fractions (O1, O2, O3 and O4), whose molecular weights are respectively 115 kD 95 kD, 75 kD and 60 kD. The rate recorded in the eggs, approximately 60% of the dry weight, make this insect one of insect species with rich lipid reserves stored in oocytes. During embryonic development, content of lipid falls 31%. This decline mainly concerns triglycerides which constitute over 80% of lipids. The use of lipid is not uniform. It most increased at the beginning and at the end of the embryonic development.

**Keywords:** embryonic development, cuticulogènèse, ecdysteroids, protein, lipid, insects.

**ملخص**

لقد أجريت هذه الدراسة على بيوض وأجنة حشرة *Labidura riparia*، نمو الجنين يستمر لمدة 10 أيام وفي درجة حرارة تقدر ب 27° وبنسبة رطوبة 70%. بداية تشكل الجنين من اليوم الثالث، ليصبح في اليوم الرابع عبارة عن قطعة مجزأة . و في اليوم السابع تكتمل مرحلة البلاستوسينيز . و في الوقت نفسه يبدأ إغلاق الإباط للجنين . نمو الجنين يكون وسطا بين النمو الإبتدائي للبيض ذات البيريبلازم المقلص و النمو المتقدم ذو البيريبلازم السميك، و ظهور فوري لنطفة ممدودة للجنين . في اليوم السابع تتشكل قشرة بدائية قبل اليوم الخامس، و قشرة ثابتة تتشكل ابتداء من اليوم السابع في وقت إغلاق الإباط وهي حقيقية و تتمثل في قشرة اليرقة . يلاحظ وجود قمتان لهرمون الاكتستيرويد الحر. تتشكل القمة الأولى في اليوم الثامن والثانية عند بداية انفتاح اليرقة . هناك إذا ارتباط بين قمم الهرمونات و انتاج القشرة الثانية و انسلاخها . و أظهرت قياسات البروتين نوعا من الإستقرار ( 0,8 ميكروغرام/البيضة)، على الرغم من أن هناك نشاط مكثف في الجنين أثناء تكوينه بين اليوم الرابع والثامن. كما يظهر في البيضة أربعة أجزاء من البروتين ( O<sub>1</sub>، O<sub>2</sub>، O<sub>3</sub> و O<sub>4</sub>) والتي كانت أوزانها على التوالي (11kD، 95kD، 75kD و 60kD) وسجل معدل الدهن في البيض لحشرة *L. Riparia* حوالي 60 % من الوزن الجاف، مما يجعل هذه الحشرة من أكثر الحشرات غنى بالدهون المخزنة في البويضات . أثناء تطور الجنين ينخفض المكون الدهني بحوالي 31 %، و يرجع هذا الانخفاض أساسا إلى Triglycérides الذي يشكل أكثر من 80 % من الدهون . إستخدام الدهون ليس ثابتا خلال مراحل نمو و تطور الجنين، فهو مرتفع في بداية و نهاية النمو.

## Métabolisme des Vitellines au cours du développement embryonnaire de *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptère)

### Résumé

Cette étude a été effectuée sur les œufs et les embryons de *Labidura riparia*, Insecte, Dermaptère. Le développement embryonnaire dure 10 jours à 27°C et 70% d'humidité. Une ébauche embryonnaire est visible au 3<sup>ème</sup> jour. Elle devient une bandelette segmentée au 4<sup>ème</sup> jour. La blastocinèse est achevée au 7<sup>ème</sup> jour; en même temps commence la fermeture dorsale de l'embryon. Le développement embryonnaire est intermédiaire entre le développement considéré primitif des œufs à periplasme très réduit et le développement évolué à periplasme épais et bandelette d'emblée allongée. Une 1<sup>ère</sup> cuticule rudimentaire est sécrétée avant le 5<sup>ème</sup> jour par la bandelette embryonnaire. Une 2<sup>ème</sup> cuticule apparaît au 7<sup>ème</sup> jour au moment de la fermeture dorsale. Celle-ci est typique et sera la cuticule des larves de 1<sup>er</sup> stade. L'apolyse de cette 2<sup>ème</sup> cuticule coïncide avec l'éclosion de la larve. Deux pics d'ecdystéroïdes libres sont observés le 1<sup>er</sup> au 8<sup>ème</sup> jour et le 2<sup>ème</sup> au moment de l'éclosion. Il y a donc une corrélation entre les pics hormonaux, la synthèse de la 2<sup>ème</sup> cuticule, et son apolyse. Les dosages des protéines, bien qu'il y ait une activité intense chez l'embryon dans sa formation et dans ses mouvements de blastocinèse lors de la formation de l'embryon entre le 4<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour, ont montré une stabilité du taux de protéine d'environ 0.8 µg/œuf. Il est mis en évidence dans les œufs, la présence de quatre fractions protéiques majeures (O1, O2, O3 et O4) dont les poids moléculaires sont respectivement de 115 kD, 95 kD, 75 kD, et 60 kD.

Le taux de lipide enregistré dans les œufs de *L. riparia* d'environ 60% du poids sec, fait de cet Insecte l'une des espèces riche en réserves lipidiques emmagasinées dans les ovocytes. Durant le développement embryonnaire, la teneur des lipides chute de près de 31%. Cette chute concerne principalement les triglycérides qui constituent plus de 80% des lipides. L'utilisation des lipides n'est pas uniforme. Elle est accrue au début et à la fin du développement embryonnaire

**Mots clés : Développement embryonnaire, cuticulogénèse, ecdystéroïdes, protéines, lipides, Insectes.**