



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة باجي مختار عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA
Faculté des Sciences
Département de biologie
Laboratoire de Biologie Animale Appliquée

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Troisième Cycle, en
Biologie Animale Environnementale.
Option: Reproduction et Développement.

**Effets d'un biopesticide, l'azadirachtine, sur un modèle de
référence, *Drosophila melanogaster* (Diptera): Toxicité,
Développement et Digestion.**

Présentée par : Mme Radia Bezzar-Bendjazia

JURY :

Président: Mme. Wahida AYAD-LOUCIF

Professeur, Université d'Annaba

Directeur de thèse: Mme. Samira KILANI-MORAKCHI

Professeur, Université d'Annaba

Examineur: Mme. Ouided DASS-MAAMCHA

Professeur, Université d'Annaba

Examineur: Mme. Fouzia TINE-DJEBBAR

MCA, Université de Tebessa

Examineur: Mr. Karim ARAB

Professeur, Université de Boumerdes

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 / 2016

Remerciements

*Je tiens en premier lieu et avant toutes choses, remercier mon directeur de thèse, le Professeur **Samira KILANI-MORAKCHI** (Université d'Annaba), pour l'excellence de l'encadrement et de l'accompagnement qu'elle m'a fournis, également pour son soutien, sa disponibilité ainsi que sa patience.*

Laissez moi vous dire Madame, que c'est grâce à vos conseils aussi éclairés que judicieux et à votre enthousiasme, que j'ai pu réaliser tout ce travail. J'espère avoir été à la hauteur de votre confiance et de vos attentes. Je vous réitère mes remerciements pour avoir en toutes occasions, pour le temps de m'écouter et de me comprendre. Je n'oublierai pas votre humanisme, ainsi que les marques de bonté et de gentillesse que vous n'avez jamais cessé de me témoigner.

*J'exprime également mes vifs et sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Noureddine SOLTANI**, Directeur de Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (Université d'Annaba) pour avoir bien voulu m'accueillir en son laboratoire, et me permettre d'achever mes travaux,*

*Je remercie de la même manière le Professeur **Wahida AYAD-LOUCIF** (Université d'Annaba) pour avoir accepté de présider ce jury. Mes remerciements s'adressent aussi aux membres de mon jury, le Professeur **Karim ARAB** (Université de Boumerdes), le Professeur **Ouïded DASS-MAAMCHA** (Université d'Annaba) et le Docteur **Fouzia TINE-DJEBBAR** (M.C.A, Université de Tébessa), qui ont accepté de juger mon travail.*

*Je remercie toute l'équipe du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée pour le soutien moral qu'elle m'a apporté et les encouragements qui m'ont été prodigués, particulièrement, le Professeur **Nadia ARIBI** (Université d'Annaba), le Docteur **Karima SIFI** (M.C.A, Université d'Annaba) et les ingénieurs de laboratoire M^{me} Dalila et M^{me} Zahra.*

Je voudrais remercier mon père, ma mère, ma belle-mère, mon beau-père, mon frère, mes sœurs et mes beaux-frères pour tout le soutien, la confiance et leurs mots d'encouragement qu'ils m'ont accordés. Je remercie les autres membres de ma famille pour toutes les agréables tranches de vie. Je vous dédie ce manuscrit avec toute ma tendresse.

*Je remercie surtout mon époux **Sami**, mon partenaire, mon confident pour son soutien, sa patience et ses encouragements. Sans oublier ma petite **Zeineb**.*

*Et enfin, je remercie Mme **Fouzia** qui a dû me supporter pendant ma période de thèse et qui n'a pas fini d'en bavarder.*

Je remercie toutes les personnes précédemment citées et toutes celles que j'aurais pu oublier pour m'avoir supporté pendant quatre ans... C'est un tour de force !

Avec une pensée pour les dizaines de milliers de drosophiles dont la vie s'est achevée précocement pour permettre cette étude.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	1
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	9
1. La drosophile: organisme modèle.....	9
2. Taxonomie.....	9
3. Principales caractéristiques de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
4. Cycle biologique.....	12
5. Elevage au laboratoire.....	15
6. Présentation de l'insecticide.....	15
7. Traitement des insectes	16
8. Bioessai.....	16
9. Effets de l'azadirachtine sur le développement.....	17
9.1 Pourcentage de pupaison et d'émergence.....	17
9.2 Analyse morphologique.....	17
9.3 Durée de développement.....	17
9.4 Analyse de la survie	17
10. Préférence d'oviposition en condition de choix ou de non choix.....	19
11. Effets de l'azadirachtine sur la digestion.....	20
11.1 Analyse pondérale.....	20
11.2 Quantité de nourriture ingérée.....	21
11.3 Dosage des enzymes digestives.....	22

1. Préparation des extraits enzymatiques.....	21
2. Dosage de l'activité amylase.....	23
3. Dosage de l'activité chitinase.....	24
- Préparation de la chitine colloïdale.....	24
- Dosage enzymatique.....	24
4. Dosage de l'activité lipase.....	25
5. Dosage de l'activité protéase.....	25
12. Analyse statistique.....	25
III. RÉSULTATS.....	27
1. Toxicité de l'azadirachtine chez les stades immatures.....	27
2. Effets de l'azadirachtine sur le développement.....	31
2.1 Effets de l'azadirachtine sur le pourcentage de pupaison et d'émergence....	31
2.2 Effets de l'azadirachtine sur la morphologie.....	33
2.3 Effets de l'azadirachtine sur la durée de développement.....	35
2.4 Effets de l'azadirachtine sur la survie des adultes.....	37
3. Effets de l'azadirachtine sur la fécondité et la préférence du site d'oviposition....	38
4. Effets de l'azadirachtine sur la digestion.....	42
4.1 Effets de l'azadirachtine sur le poids corporel.....	42
4.2 Effets de l'azadirachtine sur la quantité de nourriture ingéré.....	45
4.3 Effets de l'azadirachtine sur les enzymes digestive.....	48
1. Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique de l' α -amylase.....	48
2. Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique des chitinasés.....	51

3. Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique des lipases.....	54
4. Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique des protéases.....	57
IV. DISCUSSION.....	60
1. Toxicité de l'azadirachtine à l'égard de <i>D. melanogaster</i> et effets sur le développement.....	60
2. Effets de l'azadirachtine sur le choix du site d'oviposition et la fécondité de <i>D. melanogaster</i>	65
3. Effets de l'azadirachtine sur la digestion.....	68
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	74
RÉSUMÉS	
Français.....	76
Anglais.....	77
Arabe.....	78
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	79
ANNEXES (Production Scientifique)	

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Toxicité de l'azadirachtine ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster*: Mortalité corrigée (%) des stades immatures ($m \pm \text{SEM}$, $n= 4$ répétitions de 15 individus chacune).....27
- Tableau 2.** Effets de l'azadirachtine, administré par application topique à différentes doses ($\mu\text{g}/\text{insecte}$) sur les pourcentages de mortalité et les pourcentages d'émergence de *D. melanogaster*. (*) Le pourcentage d'adultes morts représente les mues bloquées et incomplètes.....28
- Tableau 3.** Toxicité de l'azadirachtine ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* : Mortalité corrigée (%) des stades immatures ($m \pm \text{SEM}$, $n= 4$ répétitions de 15 individus chacune) : Analyse de la variance à un critère de classification après transformation angulaire des mortalités enregistrées (%).....29
- Tableau 4.** Toxicité de l'azadirachtine ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster*: Détermination des doses létales chez les stades immatures et leurs intervalles de confiance (95%).....30
- Tableau 5.** Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le pourcentage de pupaison, ($m \pm \text{SEM}$, $n= n= 5$ répétitions de 15 individus chacune). Analyse de la variance à un critère de classification.....31
- Tableau 6.** Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le pourcentage d'émergence, ($m \pm \text{SEM}$, $n= n= 5$ répétitions de 15 individus chacune). Analyse de la variance à un critère de classification.....32
- Tableau 7.** Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la durée de développement (h) des stades larvaire, ($m \pm \text{SEM}$, $n= 30$). Analyse de la variance à un critère de classification.....36

Tableau 8. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la durée de développement (h) des stades pupal, (m ± SEM, n= 30). Analyse de la variance à un critère de classification.....36

Tableau 9. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel des larves L3, (m ± SEM, n= 30). Analyse de la variance à un critère de classification.....43

Tableau 10. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel des pupes. (m ± SEM, n= 30) : Analyse de la variance à deux critères de classification.....43

Tableau 11. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel des adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 30) : Analyse de la variance à deux critères de classification.....43

Tableau 12. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la quantité de nourriture ingérée chez les larves L3, (m ± SEM, n= 30). Analyse de la variance à un critère de classification.....46

Tableau 13. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la quantité de nourriture ingérée chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 5): Analyse de la variance à deux critères de classification.....47

Tableau 14. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de l'α-amylase chez les larves L3. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.....49

<u>Tableau 15.</u> Effets de l'azadirachtine (DL ₂₅ , DL ₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur l'activité spécifique de l'α-amylase chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.....	50
<u>Tableau 16.</u> Effets de l'azadirachtine (DL ₂₅ , DL ₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur l'activité spécifique de chitinases chez les larves L3. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.....	52
<u>Tableau 17.</u> Effets de l'azadirachtine (DL ₂₅ , DL ₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur l'activité spécifique de chitinases chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.....	53
<u>Tableau 18.</u> Effets de l'azadirachtine (DL ₂₅ , DL ₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur l'activité spécifique de lipases chez les larves L3. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.....	55
<u>Tableau 19.</u> Effets de l'azadirachtine (DL ₂₅ , DL ₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur l'activité spécifique de lipases chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.....	56
<u>Tableau 20.</u> Effets de l'azadirachtine (DL ₂₅ , DL ₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur l'activité spécifique de protéases chez les larves L3. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.....	58
<u>Tableau 21.</u> Effets de l'azadirachtine (DL ₂₅ , DL ₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur l'activité spécifique des protéases chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Taxonomie de <i>Drosophila melanogaster</i>	10
Figure 2. Phylogénie de <i>Drosophila melanogaster</i> (O'Grady & Markow, 2009). Source : (http://hereditariedadgenetica.blogspot.com/2008/03/taxonomia.html).....	11
Figure 3. Dimorphisme sexuel chez <i>D. melanogaster</i> : vue latérale du corps mâle et femelle (A) vue des pattes (B), vue dorsale (C) et vue ventrale (D). (D'après Prokop <i>et al.</i> , 2013).....	12
Figure 4. Cycle de vie de <i>D. melanogaster</i> (D'après Weigmann <i>et al.</i> , 2003). Source : (http://zookeepers.livejournal.com/).....	14
Figure 5. Origine larvaire des appendices de la drosophile adulte: les disques imaginaux (D'après Prokop <i>et al.</i> 2013).....	14
Figure 6. Elevage de <i>D. melanogaster</i> au laboratoire.....	15
Figure 7. Structure chimique de l'azadirachtine (Mordue <i>et al.</i> , 2005).....	16
Figure 8. Procédure expérimentale pour l'évaluation de la survie des adultes de <i>D. melanogaster</i> d'après Linford <i>et al.</i> (2013).....	18
Figure 9. Procédure expérimentale pour l'évaluation de la préférence d'oviposition de <i>D. melanogaster</i> en condition de choix ou de non choix.....	20
Figure 10. Test d'estimation de la quantité de nourriture ingérée, mouche avec un abdomen coloré en bleu.....	22
Figure 11. Toxicité de l'azadirachtine ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> : Mortalité corrigée (%) des stades immatures ($m \pm \text{SEM}$, $n= 4$ répétitions de 15 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.....	29

Figure 12. Effets de l'azadirachtine, administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée chez les stades immatures en fonction du logarithme de la dose. $R^2= 97\%$	30
Figure 13. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur le pourcentage de pupaison (A) et d'émergence (B), ($m \pm SEM$, $n=5$ répétitions de 15 individus chacune). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).....	32
Figure 14. Aberrations morphologiques chez <i>D. melanogaster</i> après traitement des larves du début de stade L3 à l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}): (A) Larve normale, (B) Larve hyper pigmentée, (C) Puce normale, (D) Puce-adulte intermédiaire, (E) Adulte normale, (F) et (G) Adulte malformé.....	34
Figure 15. Pourcentage d'aberrations morphologiques chez <i>D. melanogaster</i> après traitement des larves du début de stade L3 à l'azadirachtine (LD_{25} , LD_{50}), ($m \pm SEM$, $n= 3$ répétitions de 15 individus). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).....	35
Figure 16. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur la durée de développement (h) des stades larvaire (A) et pupal (B), ($m \pm SEM$, $n= 30$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).....	37
Figure 17. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur la survie des adultes mâles (A) et femelles (B).....	38
Figure 18. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de <i>D. melanogaster</i> sur le nombre d'œufs pondus en condition de choix du milieu de ponte: A : Milieu témoin vs milieu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ d'azadirachtine, B : Milieu témoin vs milieu 0,25 $\mu\text{g/ml}$ d'azadirachtine. ($m \pm SEM$, $n= 10$ répétitions de trois couples chacune). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).....	40

Figure 19. Indice de préférence d'oviposition (IPO) des femelles de *D. melanogaster* en condition de choix du milieu de ponte. **A** : Milieu 0,1 µg/ml, **B** : 0,25 µg/ml. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités dans le même milieu.....41

Figure 20. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le nombre d'œufs pondus en condition de non choix du milieu de ponte. ($m \pm SEM$, $n= 10$ répétitions de trois couples chacune). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).....41

Figure 21. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel chez les larves (**A**), les pupes (**B**) et les adultes mâles et femelles (**C**). ($m \pm SEM$, $n= 30$ répétitions). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités de même âge ou de même sexe.....44

Figure 22. Quantité de nourriture ingérée : Courbe standard exprimant les absorbances à 629 nm en fonctions des concentrations de nourriture marquée à l'erioglaucine (mg/ml). $R^2 = 99\%$45

Figure 23. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la quantité de nourriture ingérée chez les larves (**A**) et les adultes mâles et femelles (**B**). ($m \pm SEM$, $n= 5$ répétitions de 5 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités.....47

Figure 24. Dosage d' α -amylase : Courbe standard exprimant les absorbances à 540 nm en fonctions des concentrations en maltose (μM). $R^2 = 98\%$48

Figure 25. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de l' α -amylase ($\mu M/min/mg$ de protéines) chez les larves (**A**) et les adultes mâles et femelles (**B**). ($m \pm SEM$, $n= 6$ répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités....50

Figure 26. Dosage de chitinase : Courbe standard exprimant les absorbances à 540 nm en fonctions des concentrations en N-acetylglucosamine (mg). $R^2 = 99\%$51

Figure 27. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activités spécifiques de chitinases ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves (**A**) et les adultes mâles et femelles (**B**). ($m \pm \text{SEM}$, $n= 6$ répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traitées.....53

Figure 28. Dosage de lipase : Courbe standard exprimant les absorbances à 405 nm en fonctions des concentrations en *p*-Nitrophenol (μM). $R^2 = 99\%$54

Figure 29. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activités spécifiques de lipases ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves (**A**) et les adultes mâles et femelles (**B**). ($m \pm \text{SEM}$, $n= 6$ répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traitées.....56

Figure 30. Dosage de protéase : Courbe standard exprimant les absorbances à 280 nm en fonctions des concentrations en tyrosine (mM). $R^2 = 99\%$57

Figure 31. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activités spécifiques des protéases ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves (**A**) et les adultes mâles et femelles (**B**). ($m \pm \text{SEM}$, $n= 6$ répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traitées.....59

Figure 32. Variation des taux de 20-hydroxyecdysone (20E) et d'hormone juvénile (JH) durant le développement de *D. melanogaster*. 20E: ligne pleine, JH: ligne en pointillés (D'après Dubrovsky, 2005).....63

Figure 33. (**A**) Schéma du cerveau de la drosophile: En vert, les lobes optiques ; en jaune, les ganglions sou-oesophagiens ; en rouge, les lobes antennaires ; en bleu, les corps pédonculés ; en orange, le complexe central ; en turquoise, le reste du neuropile entourant les corps pédonculés et le complexe central. (**B**) : Schéma des corps pédonculés et des lobes antennaires, en bleu les lobes gamma (Le Glou, 2012).....67

Figure 34. Schéma représentant le tube digestif de *D. melanogaster*. (D'après Buchon *et al.*, 2013).....71

INTRODUCTION



I. INTRODUCTION

L'industrialisation des cultures, qui a permis à de nombreux pays d'accéder à une autosuffisance alimentaire et qui a contribué au cours des dernières décennies à faire reculer les famines et la malnutrition dans le monde, s'est essentiellement basée sur une amélioration de la lutte contre les insectes ravageurs *via* l'utilisation de pesticides chimiques à large spectre d'action (Ramade, 2011). Selon Popp *et al.* (2013), les pertes de production, avant récolte, des cultures mondiales majeures dues aux ravageurs (insectes, micro-organismes) et aux adventices sont estimées à 35 %. Sans une protection efficace des cultures, ces pertes seraient de 70 % (Popp *et al.*, 2013). À en croire les tenants de l'industrie, la diminution de la production mondiale de denrées alimentaires causée par la non-utilisation des produits phytosanitaires pourrait être à l'origine de famines chez les populations déjà fragilisées (Deravel *et al.*, 2014).

De plus, parmi ces pesticides les insecticides ont également permis de lutter contre les insectes vecteurs de maladies humaines et vétérinaires (moustiques, blattes, punaises...) limitant voire éradiquant un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières (Saguez *et al.*, 2007). Cette lutte constitue donc un enjeu majeur de santé public et en l'absence de remplaçant efficace, l'utilisation des insecticides reste d'une importance capitale dans la lutte antivectorielle sachant que, par exemple, le paludisme a été responsable de la mort de 655 000 personnes dans le monde en 2010 (OMS, rapport 2011).

L'utilisation des pesticides a connu un développement important au cours du XIXe siècle. Différents éléments ont favorisé ce développement: l'accroissement démographique de la population humaine (obligation d'augmenter la productivité agricole), l'affaiblissement des terres agricoles (épidémies dans les cultures), l'apparition du machinisme agricole ainsi que les progrès considérables dans le domaine de la chimie organique de synthèse. Les traitements des cultures par les pesticides apparaissent alors avec l'utilisation des arsenicaux pour lutter contre les insectes ravageurs (ex: Eudémis de la vigne, doryphore de la pomme de terre) (Ramade, 2011).



Cependant, le véritable essor des pesticides de synthèse débute vraiment dans les années 1930 profitant du développement de la chimie organique de synthèse et de la recherche sur les armes chimiques durant la première guerre mondiale. En 1874, Zeidler synthétisait le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), un organochloré, dont les propriétés insecticides furent révélées par les travaux du suisse Müller en 1939 (prix Nobel de médecine en 1948 pour cette découverte) et utilisé pour la première fois afin d'enrayer une épidémie de typhus (Ramade, 2011). D'autres organochlorés furent utilisés comme le HCH (hexachlorocyclohexane), l'endosulfan, l'aldrine ou la dieldrine.

Néanmoins, ces produits sont très toxiques et leurs utilisations n'est pas sans conséquence sur les écosystèmes. La publication en 1962 du livre « Silent Springs » écrit par la biologiste Rachel Carson, a suscité une prise de conscience des problèmes liés à l'utilisation des pesticides sur l'environnement et entraîné l'interdiction du DDT aux Etats-Unis en 1972.

L'industrie chimique et l'essor de l'agriculture intensive ont permis le développement d'une deuxième génération d'insecticides, représentée par trois grandes familles: organophosphorés, carbamates et pyréthrinoïdes de synthèse. Ces insecticides à action neurotoxique agissent tous au niveau du système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates) soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (pyréthrinoïdes) (Haubruge & Amichot, 1998).

D'une façon générale, l'usage des pesticides représente au début de la présente décennie une consommation annuelle de plus de 3 millions de tonnes de matières actives pures, ce qui constitue une masse polluante colossale au plan écotoxicologique sachant que certaines substances possèdent une toxicité aigüe qui est celle de certaines armes chimiques (Ramade, 2011). De plus, certaines molécules (ex : chlordécone) ont une toxicité à long terme redoutable et une persistance extraordinaire avec une demi-vie ce chiffrant en millénaires (Cabidoche & Lesueur Jannoyer, 2011). Certains de ces produits proscrits dans les pays développés sont toujours en usage dans le reste du monde.



Aujourd'hui, en plus des effets pervers des pesticides sur l'environnement, sa biodiversité et la santé humaine, l'utilisation intensive et répétée de ces molécules a conduit à la multiplication des cas de résistance limitant ainsi leur efficacité (Nauen *et al.*, 2012 ; Harrop *et al.*, 2014, Sparck & Nauen, 2015).

Pour ces différentes raisons, une réduction de consommation des pesticides a été initiée à la fin des années 1980 dans les pays développés avec comme objectif une diminution de leurs usages de 50% avant 2020 (FAOSTAT). Si cette réduction de consommation dans les pays développés représente un réel progrès, il reste moins apparent si l'on prend en considération non pas les quantités de matières actives utilisées en valeurs absolues mais le potentiel toxicologique de ces dernières par unité de masse. En effet, la tendance générale a conduit au développement de nouvelles substances qui, tous en ayant une toxicité aiguë plus faible pour les animaux à sang chaud présentent un risque souvent plus important pour la santé des écosystèmes; c'est le cas des néonicotinoïdes et leurs impacts sur les pollinisateurs de cultures (Blacquière *et al.*, 2012 ; Rondeau *et al.*, 2014).

Face aux enjeux majeurs pour l'environnement et la santé des populations et afin de valoriser rationnellement l'exploitation des ressources naturelles, la lutte chimique largement empirique a fait place à une lutte chimique raisonnée introduisant les notions de seuil de tolérance, d'utilisation de pesticides à faible répercussion environnementale et la réduction des concentrations de matières actives (Ramade, 2011). Une gestion à long terme des populations de ravageurs mettant en œuvres des techniques appropriées et complémentaires d'une manière aussi compatible que possible avec le respect de l'environnement (lutte intégrée) permettra un fonctionnement équilibré et durable des agro-écosystèmes (Ramade, 2011).

Dans cette optique, des méthodes alternatives de lutte ont été mises au point telles que le développement par l'industrie phytosanitaire de molécules plus sélectives interférant avec des processus physiologiques et biochimiques spécifiques aux organismes visés tels que les IGDs (Insect growth disruptors) (Dhadialla *et al.*, 2005, 2010; Pener & Dhadialla, 2012). Ces molécules sont des produits de synthèse mimant l'action de l'hormone juvénile (HJ) ou de l'ecdysone, les deux hormones dont les rôles principaux sont de contrôler la croissance, le développement et la



reproduction chez les insectes (Dhadialla *et al.*, 2005, 2010 ; Pener & Dhadialla, 2012), ou encore des molécules inhibitrices de la synthèse de la chitine, composé majeur de la cuticule des insectes (Ishaaya, 1990). De plus, les recherches sur les produits naturels susceptibles d'avoir une activité phytosanitaire (biopesticides) retrouvent un regain d'intérêt (Mordue *et al.*, 2010 ; Deravel *et al.*, 2014).

Le concept de « biopesticide » n'est pas nouveau. Dès le 7^e siècle avant Jésus Christ, des fermiers chinois utilisaient des plantes comme *Illicium lanceolatum* pour protéger leurs cultures contre les insectes (Leng *et al.*, 2011). De même, au Moyen-Âge, des végétaux comme les aconits étaient utilisés contre les rongeurs et des récits indiens datant du 17^e siècle rapportent l'utilisation de racines de *Derris* et de *Lonchocarpus* pour leurs propriétés insecticides (Philogène *et al.*, 2002) . De nos jours, plusieurs biopesticides sont commercialisés. Même s'il n'existe aucune définition officielle, dans le domaine de l'agriculture, les biopesticides pourraient être définis de la manière suivante : «Organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de limiter ou de supprimer les ennemis des cultures» (Thakore, 2006; Deravel *et al.*, 2014). Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature: les biopesticides microbiens (ex: *Bacillus thuringiensis*), les biopesticides végétaux (ex: l'huile de neem) et les biopesticides animaux (ex: auxiliaires de culture) (Chandler *et al.*, 2011 ; Leng *et al.*, 2011).

Les biopesticides offrent de nombreux avantages. Ils sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des espèces contre lesquelles ils sont dirigés (Deravel *et al.*, 2014). Ces molécules sont moins rémanentes que leurs homologues chimiques et possèdent une toxicité plus faible vis-à-vis des espèces non ciblées, ce qui supporte une utilisation compatible dans les programmes de lutte intégrée (Deravel *et al.*, 2014).

De plus, les biopesticides sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs molécules bioactives emploient plusieurs modes d'action, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour limiter l'apparition de bio-agresseurs résistants (Deravel *et al.*, 2014). Ces produits sont progressivement employés en agriculture en raison de leurs faible impact écologique (Frost & Sullivan, 2009). Néanmoins, le



marché des biopesticides reste très en dessous de celui des produits phytosanitaires chimiques.

En effet, en 2000 le marché des biopesticides était à l'état embryonnaire; la proportion des biopesticides vendus *versus* les pesticides chimiques n'atteint que 0,25%. Des proportions de 2,5% ont été enregistrées en 2005 et restent en constante croissance (Deravel *et al.*, 2014). Aujourd'hui, les biopesticides représentent 5% du marché mondial des pesticides utilisés en protection des cultures avec un taux de croissance annuelle (CAGR: Compound Annual Growth Rate) de 8,64% (Olson, 2015). On estime que le marché mondial des biopesticides dépassera les 7% des ventes d'ici 2023 pour atteindre les 4,5 billion de dollars (Olson, 2015).

La popularité des biopesticides comme alternatives à faible impact environnementale et le retour vers des molécules d'origine végétale a permis aux scientifiques de redécouvrir une plante remarquable qui a retenu l'attention et a fait l'objet d'innombrables recherches et publications; le margousier de la famille des *Meliaceae* ou arbre de neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Son utilisation en Inde, d'où il est originaire, fait partie des pratiques traditionnelles depuis plus de quatre mille ans (Larson, 1989). De nombreux composés biologiquement actifs ont été extraits des différentes parties de l'arbre mais les graines de neem restent la source la plus importante des composés utilisés dans les formulations insecticides (Mulla & Su, 1999; Copping & Duke, 2007). Parmi ces molécules biologiquement actives, l'azadirachtine un tetranortriterpénoïde, serait le limonoïde le plus puissant et l'un des bio-insecticides les plus importants (Mordue *et al.*, 2010; Isman *et al.*, 2013). Les autres limonoïdes comme la salanine et la nimbine, sont responsables des effets anti-appétants (Morgan, 2009).

Actuellement, plusieurs formulations (Huile de Neem, Neem Azal, Neemex, Bioneem) à base d'azadirachtine (extraites du neem) sont commercialisées et utilisées avec succès dans des agro-écosystèmes variés (Schmutterer, 1990; Mordue & Blackwell, 1993; Isman, 2006; Akca *et al.*, 2009).

Outre son grand pouvoir insecticide, l'azadirachtine est très sélectif envers certaines classes d'insectes (Charleston *et al.*, 2006; Mordue *et al.*, 2010). Ce bioinsecticide est également sans danger pour les mammifères (Medina *et al.*, 2004;



Cordeiro *et al.*, 2010; Celestino *et al.*, 2014) et facilement biodégradable (Boeke *et al.*, 2004). De plus, à l'heure actuelle, aucune résistance n'est notée envers l'azadirachtine (Mordue *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2014). Ainsi, l'azadirachtine se place actuellement parmi les substances naturelles actives, extraites des familles de plantes, les plus étudiées et les plus prometteuses (Mordue *et al.*, 2010).

Toutefois, la littérature récente note des contradictions sur son innocuité vis-à-vis des organismes non cibles et la possibilité de risques futurs ne doivent pas être ignorées (Qi *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2003; Aggarwal & Brar, 2006; Cordeiro *et al.*, 2010; Scudeler & Santos, 2013; Gontijo *et al.*, 2015). En effet, des effets toxiques ont été rapportés chez certains insectes non cibles tels que chez *Ceraeochrysa claveri*, *Neoseiulus baraki*, *Amphiareus constrictus* et *Bombus terrestris* (Scudeler *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Gontijo *et al.*, 2015 ; Barbosa *et al.*, 2015). A l'opposé, chez les organismes aquatiques, l'azadirachtine est citée comme molécule, relativement inoffensive et serait un agent prometteur contre les parasites (Kumar *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2014).

Depuis la mise en évidence des propriétés de perturbateurs de croissance des insectes (IGDs) en 1972 (Schmutterer & Singh, 1995), l'azadirachtine, principal composé actif du neem, a fait l'objet de nombreux travaux et publications (Boeke *et al.*, 2004; Mordue *et al.*, 2005; Morgan, 2009; Tomé *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2014; Boulahbel *et al.*, 2015). Ainsi, l'azadirachtine provoquerait plus de 90% des effets de la plupart des insecticides conventionnels. Toutefois et malgré les différents effets connus de l'azadirachtine, son mécanisme d'action reste incertain et fait l'objet de nombreuses investigations (Mordue *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

En plus, d'un effet anti-appétant sur les insectes (Stark *et al.*, 1990; Schmutterer & Singh, 1995; Andreu *et al.*, 2000; Senthil-Nathan *et al.*, 2004, 2005, 2006), l'azadirachtine affecte également différentes enzymes impliquées dans les processus de digestion (Rharrabe *et al.*, 2008; Khosravi & Sendi, 2013). Cette molécule est particulièrement active sur les cellules en division par blocage de la polymérisation des microtubules (Mordue *et al.*, 2010). Cet insecticide naturel induit l'apoptose et possède une action antiproliférative en arrêtant le cycle cellulaire chez *Spodoptera litura* et *Spodoptera frugiperda* (Huang *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).



L'azadirachtine interfère avec le système nerveux central (SNC) chez la drosophile par inhibition de la transmission cholinergique excitatrice *via* les canaux calciques (Qiao *et al.*, 2014) et agit sur l'expression des gènes liés au développement chez *Plodia interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012) et *Drosophila melanogaster* (Lai *et al.*, 2014). Il affecte également les événements de la reproduction chez différentes espèces (Pineda *et al.*, 2009; Tine *et al.*, 2011; Boulahbel *et al.*, 2015a).

Les effets de l'azadirachtine ont été rapportés, notamment sur la fécondité, le développement ovarien, la structure des œufs et la fertilité (Lucantoni *et al.*, 2006; Suman *et al.*, 2010; Boulahbel *et al.*, 2015a). De plus, plusieurs études montrent que l'azadirachtine influence le comportement d'oviposition chez plusieurs insectes (Blaney *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 2000; Charleston *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2010; Hasan & Ansari, 2011; Tomé *et al.*, 2013).

En effet, chez les insectes tels que *D. melanogaster*, les femelles sont sélectives quant au choix du site de ponte et peuvent différer leur ponte si un site ne leur convient pas et ce afin d'assurer la survie de leur descendance (Montell, 2009). Aujourd'hui, *D. melanogaster* est utilisé comme modèle pour comprendre les processus impliqués dans les prises de décisions chez les insectes, ces phénomènes restent très mal connus (Yang *et al.*, 2008).

Le choix du site de ponte est une étape comportementale cruciale qui peut affecter la survie et la reproduction de l'insecte (Battesti *et al.*, 2014). Cette décision dépend de facteurs génétiques et environnementaux (Wertheim *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2009; Venu *et al.*, 2014) et est sans doute reliée aux capacités sensorielles de la drosophile, qui impliquent tout particulièrement le sens de l'odorat, et secondairement de la vue (Grossfield, 1978). De nombreuses études récentes ont démontré que ce type de décision peut être influencé par l'expérience sensorielle individuelle et modifiée en fonction d'une expérience larvaire ou adulte (Dukas, 2008; Sarin & Dukas, 2009; Abed-Vieillard *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2013; Abed-Vieillard & Cortot, 2016). En effet, l'apprentissage semble jouer un rôle important dans différentes prises de décision par les insectes et *D. melanogaster* représente aujourd'hui le système modèle le plus étudié en biologie de l'apprentissage (Dukas, 2008).



Si l'aversion à l'azadirachtine conduisant à un évitement de l'oviposition sur un milieu contenant cette molécule a été rapporté par de nombreux travaux (Brunherotto *et al.*, 2010; Tomé *et al.*, 2013), aucune étude n'a été menée sur la possibilité du conditionnement de cette aversion à l'azadirachtine chez l'insecte.

Les objectifs de cette étude sont:

1. Evaluer la toxicité d'une formulation commerciale d'azadirachtine, le Neem-Azal, testé par application topique, sur des larves du début du troisième stade larvaire (L3) de *D. melanogaster*. La détermination des doses létales (DL_{10} , DL_{25} , DL_{50} et DL_{90}) et leurs intervalles de confiance respectifs a été réalisée à partir de la mortalité cumulée chez les stades immatures.
2. Evaluer les effets sublétaux et létaux (DL_{25} , DL_{50}) de l'azadirachtine sur différents paramètres du développement de l'insecte (aberrations morphologiques, durée de développement, survie).
3. Examiner les effets sublétaux et létaux (DL_{25} et DL_{50}) sur le nombre d'œufs pondus par les femelles en condition de choix et de non choix du site de ponte.
4. Examiner les effets sublétaux et létaux (DL_{25} et DL_{50}) sur le poids corporel, la quantité de nourriture ingérée et sur les principales enzymes digestives de l'insecte (α -amylase, chitinase, lipase et protéase).

*MATÉRIEL ET
MÉTHODES*



II. Matériel et méthodes

II.1. La drosophile: organisme modèle

La drosophile plus connue sous le nom de « mouche du vinaigre » est un insecte diptère brachycère holométabole. *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) est l'organisme de prédilection pour la recherche biologique, utilisé comme organisme modèle depuis plus d'un siècle. A l'origine, cet organisme était principalement étudié en génétique pour comprendre les règles de l'hérédité des caractères. Après Thomas Hunt Morgan en 1933 pour ces travaux sur le rôle des chromosomes dans l'hérédité, ce sont trois drosophilistes (E.B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard et E. Wieschaus) qui furent récompensés en 1995 du prix Nobel de Médecine pour le contrôle génétique du développement embryonnaire précoce chez la drosophile. Récemment, un autre prix Nobel a été décerné à J.A Hoffman pour ces recherches en immunologie. Aujourd'hui, la drosophile est essentiellement utilisée en biologie du développement (Gilbert *et al.*, 2013), pour comprendre comment un organisme complexe se forme à partir d'un œuf fertilisé mais également en neurogénétique de l'apprentissage (Dukas, 2008). En plus de l'importance de la drosophile dans les différents domaines de la biologie, cette mouche possède de nombreux avantages, notamment un génome totalement séquencé depuis 2000 (Adams *et al.*, 2000) qui permet l'utilisation de nombreux outils moléculaires. De plus le maintien aisé des élevages en laboratoire associé à un cycle de vie court (10 jours à 25°C) et une progéniture abondante disponible à chaque génération, représente un avantage non négligeable.

II.2. Taxonomie

Les drosophiles sont des animaux faisant partie du phylum des arthropodes et plus précisément de la classe des insectes. Elles appartiennent à l'ordre des diptères (ou mouches vraies) caractérisés par la présence d'haltères sur le troisième segment thoracique indispensables à la stabilisation du vol. Cet ordre renferme les mouches, moucherons et moustiques. La famille des Drosophilidae, compte près de 3000 espèces (O'Grady & Markow, 2009) qui ont colonisé tous les types d'environnement (Fig. 1). La majorité des ses espèces appartiennent au deux sous-genre : *Drosophila* (1450 espèces) et *Sophophora* (450 espèces) (Fig. 2). Suite à des



études récentes, il semblerait que *D. melanogaster* soit plus proche phylogénétiquement du genre *Sophophora* que du genre *Drosophila* (O'Grady & Markow, 2009). L'intégration de *melanogaster* dans le genre *Sophophora* a été proposée à la commission internationale de nomenclature zoologique, ce qui a suscité un long débat et un mécontentement de beaucoup de drosophilistes qui considèrent *D. melangaster* comme un label étant l'espèce la plus célèbre après l'*Homo Sapiens* (Dalton, 2010).

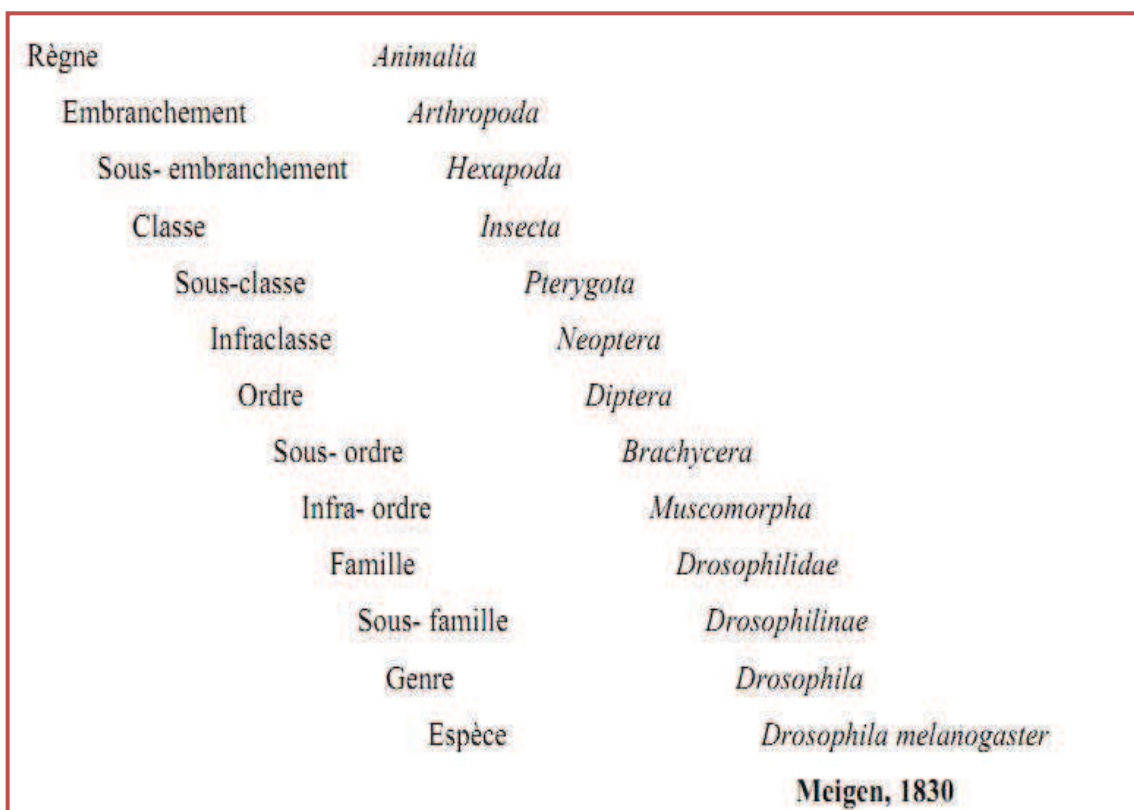


Figure 1. Taxonomie de *Drosophila melanogaster*.

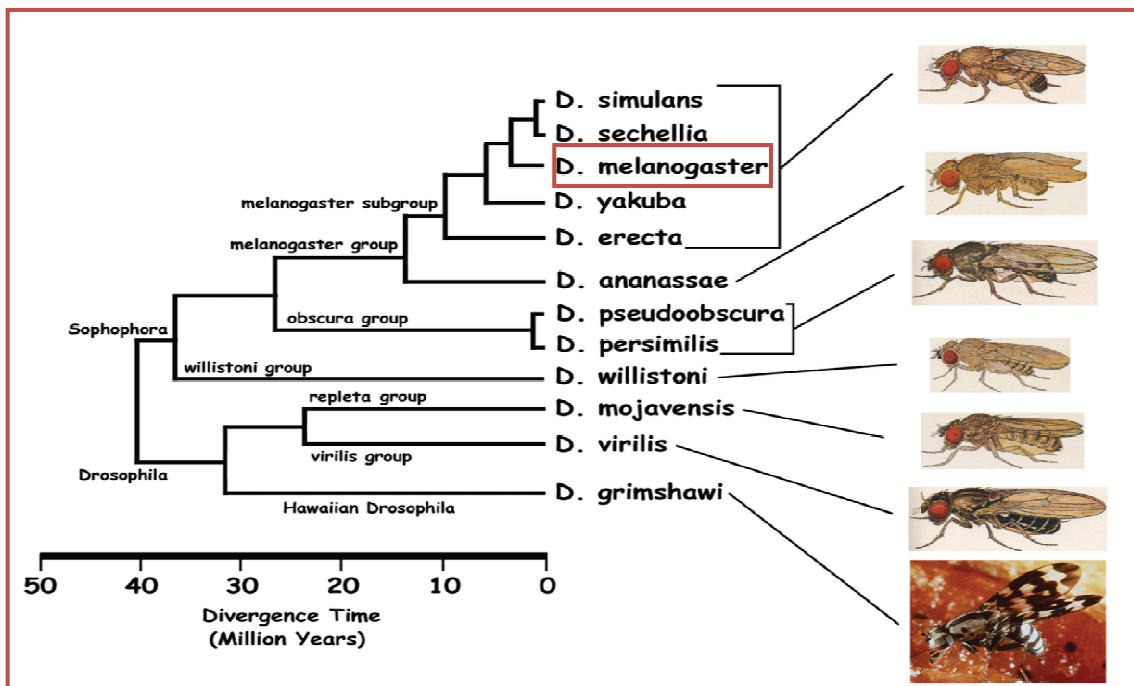


Figure 2. Phylogénie de *Drosophila melanogaster* (O'Grady & Markow, 2009).

Schéma : (<http://hereditariedadgenetica.blogspot.com/2008/03/taxonomia.html>).

II.3. Principales caractéristiques de *Drosophila melanogaster*

Comme tous les insectes, le corps de la drosophile se compose de trois parties distinctes : la tête (région céphalique), la région thoracique et la région abdominale. Les trois paires de pattes sont localisées sur la partie ventrale des différents segments thoraciques (Fig. 3A). La drosophile n'a qu'une seule paire d'ailes fonctionnelles, (les ailes antérieures) localisée sur la partie dorsale du second segment thoracique (notum); les ailes postérieures sont atrophiées sous la forme d'un balancier minuscule. Ces mouches sont de couleur brun jaunâtre, avec des anneaux transversaux noirs au travers de l'abdomen. Elles ont des yeux rouge vif et des antennes courtes à extrémité plumeuse (Fig. 3A).

Les drosophiles présentent un dimorphisme sexuel (Parvathi *et al.*, 2009): les femelles mesurent environ 3 à 4 millimètres de long; les mâles sont un peu plus



petits. Les mâles possèdent un peigne sexuel représenté par une petite touffe de soies noires située au niveau du premier article du tarse de la patte antérieure (Fig. 3 B). L'abdomen de la femelle est de forme pointue, avec des segments terminaux de couleur claire. L'abdomen du mâle est plus arrondi, avec des segments terminaux très foncé (Fig. 3 C). Chez le mâle le pénis très coloré est situé à l'extrémité de l'abdomen alors que la plaque vaginale située au même endroit chez la femelle n'est pas colorée (Fig. 3 D).

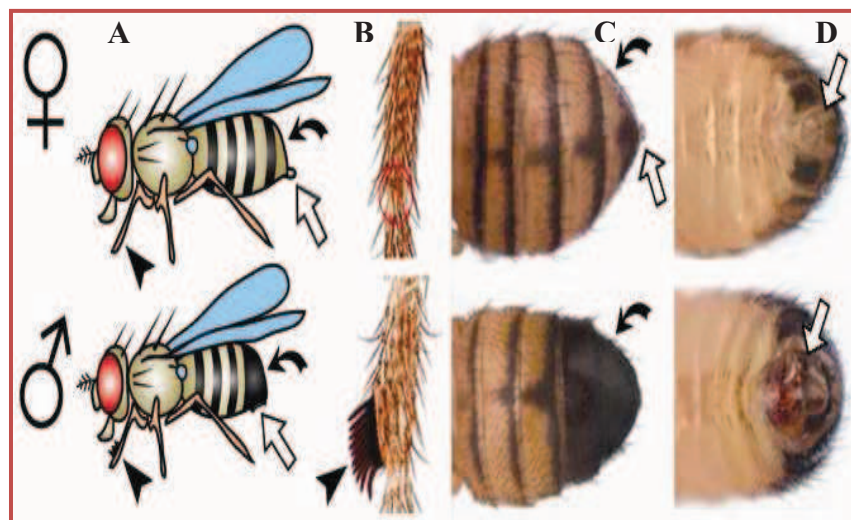


Figure 3. Dimorphisme sexuel chez *D. melanogaster*: vue latérale du corps mâle et femelle (A) vue des pattes (B), vue dorsale (C) et vue ventrale (D). (D'après Prokop *et al.*, 2013).

II.4. Cycle biologique

Chez *D. melanogaster*, la femelle pond directement ses œufs sur un milieu qui servira de substrat alimentaire aux larves qui en sortiront. La femelle peut pondre plusieurs centaines d'œufs au cours de sa vie et suivant la qualité du substrat alimentaire et surtout de la température ambiante, la durée du développement des individus nouvellement pondus sera plus ou moins importante: environ 10 jours à 25°C et près de 50 jours à 12°C (Ashburner & Thompson, 1978).



Le cycle de vie de *D. melanogaster* comprend un stade embryonnaire (œufs), 3 stades larvaires, un stade pupal ou nymphal et un stade adulte où l'insecte est capable de voler et de se reproduire (Fig. 4).

Stade embryonnaire: La femelle pond des centaines d'œufs sur des fruits en putréfaction ou d'autres matières humides ou en fermentation (Tavernier & Lizeaux, 2002). Les œufs en forme d'un ballon de rugby sont de couleur blanchâtre et mesurent environ 0,5 mm de long.

Stade larvaire: Environ vingt trois heures après la ponte, les œufs vont éclore pour donner naissance à une larve blanchâtre appelée « asticot ». Celle-ci se nourrit alors de la pulpe du fruit en creusant des galeries. Le stade larvaire dure 4 jours et comprend trois stades L1 (24 h), L2 (24 h) et L3 (48 h). A la fin de ce stade (110 h après la ponte), les larves de 3^{ème} stade cessent de s'alimenter, sortent du milieu nutritif et entament une phase d'errance. A son terme, les larves secrètent une glu et se fixent sur un support (Dubrovsky, 2007).

Stade pupal : L'éversion des spiracles antérieurs 120 h après la ponte, définit le début du stade prépupale qui durera 12 h. La dernière cuticule larvaire se tanne rapidement et devient le puparium, dans lequel la métamorphose va se dérouler. Cette dernière se poursuit pendant les 3 jours et demi que dure la période pupale et à son terme les tissus larvaires ont été histolysés et les structures adultes se sont formées à partir des disques imaginaux (Compbel, 2006; Quinn *et al.*, 2012) (Fig. 5).

Stade adulte : A la fin du stade pupale, la jeune drosophile adulte non encore pigmentée sort de la pupe et au bout de 8 heures la pigmentation est terminée et les ailes sont gonflées. Les adultes s'alimentent de fruits murs ou avariés. Les femelles sont matures sexuellement environ 12 heures après être sorties de leur pupe. Elles stockent le sperme des mâles auxquels elles se sont accouplées pour pouvoir l'utiliser ultérieurement et commencent à pondre un jour plus tard (Tavernier & Lizeaux, 2002).

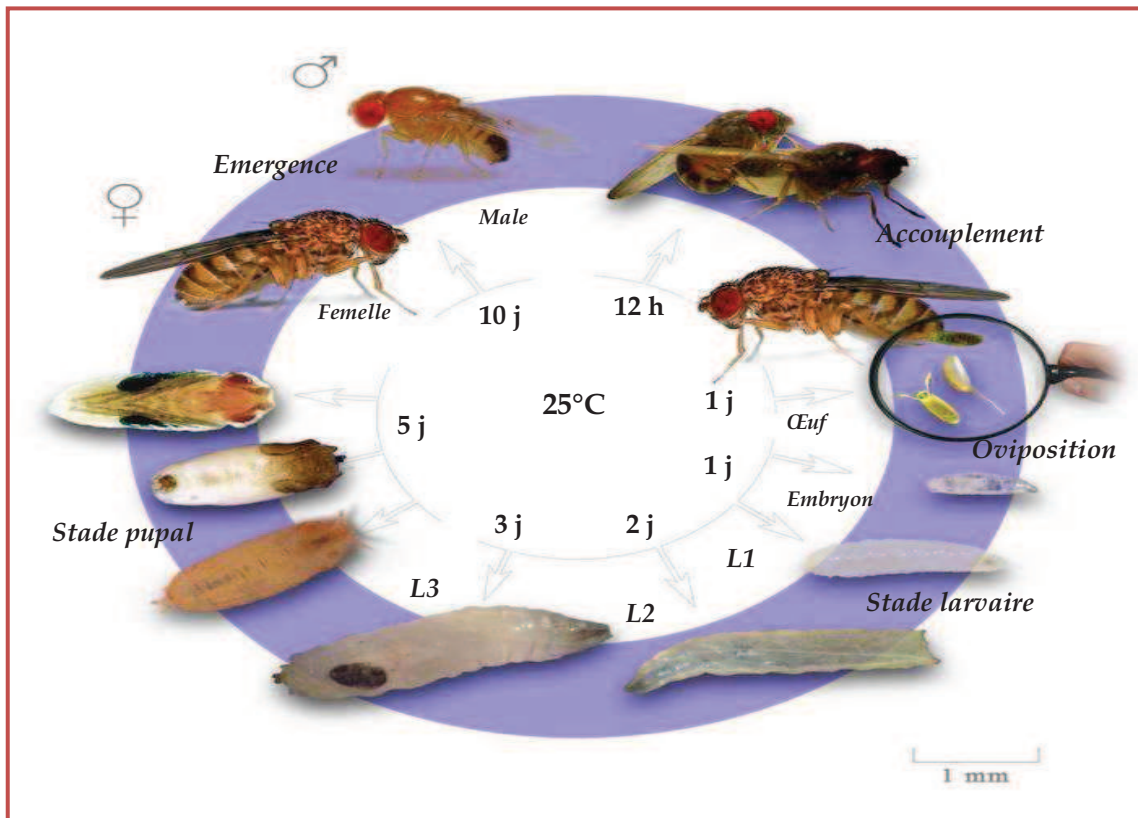


Figure 4. Cycle de vie de *D. melanogaster* (D'après Weigmann *et al.*, 2003).
Schéma : (<http://zookeepers.livejournal.com/>)

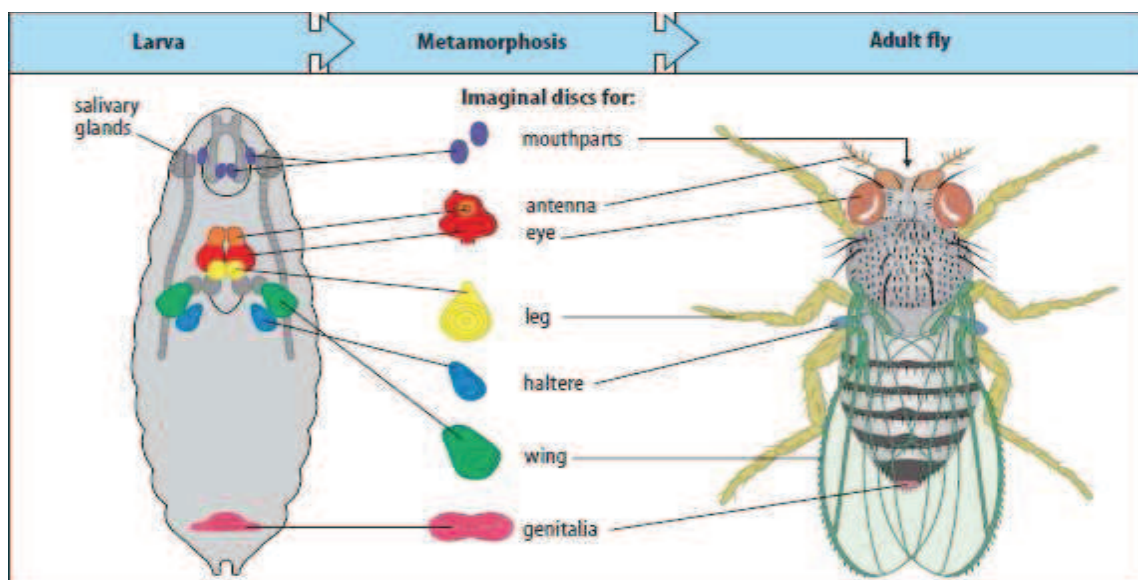


Figure 5. Origine larvaire des appendices de la drosophile adulte: les disques imaginaux (D'après Prokop *et al.* 2013).



II.5. Elevage au laboratoire

L'élevage de *D. melanogaster* (souche Canton-S: lignée sauvage de référence) en laboratoire est réalisé à une température de 25°C, une hygrométrie de 70% et une scotophase de 12 h, sur un milieu nutritif artificiel (33,3 g semoule de maïs, 33,3 g levure de bière, 4,8 g d'agar-agar, et 20 ml d'antifongique (méthyl-hydroxy-4-benzoate à 10% dans de l'éthanol à 95%)). Les drosophiles sont élevées dans des flacons de plastique bouchés par un tampon de mousse (Fig. 6). Les mouches sont transférées tous les 3-4 jours dans de nouveaux tubes afin d'éviter les problèmes de compétition larvaire et fournir une progéniture suffisante.



Figure 6. Elevage de *D. melanogaster* au laboratoire.

II.6. Présentation de l'insecticide

L'azadirachtine commercialisé sous le nom de Neem Azal-T/S est composé d'azadirachtine A (1% d'azadirachtine ; Emulsion Concentrée (EC); firme : Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany). La masse molaire de l'azadirachtine A est de 720,7 g mol⁻¹, et sa formule chimique: C₃₅H₄₄O₁₆. Cette formulation émulsifiable dans l'eau, correspond à un liquide brun avec une odeur caractéristique du Neem (Fig. 7).

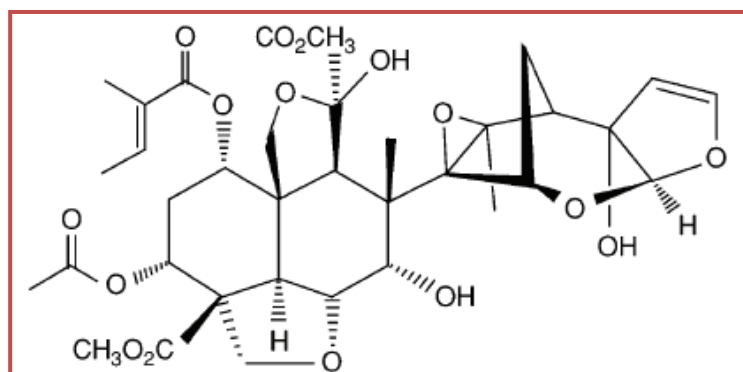


Figure 7. Structure chimique de l'azadirachtine (Mordue *et al.*, 2005).

II.7. Traitement des insectes

L'azadirachtine a été dissous dans l'acétone et administré par application topique (1 µl), sur des larves du début du troisième stade larvaire (L3) de *D. melanogaster*. Dans le but de synchroniser l'élevage et d'obtenir des larves de même âge, des adultes mâles et femelles, âgés de 4 à 5 jours, sont prélevés dans l'élevage de masse puis mis à pondre dans un tube contenant du milieu frais pendant 4 h. Les adultes sont alors retirés et les tubes sont maintenus dans les conditions standards (voir section élevage au laboratoire) pendant 4 jours (Fougeron, 2011). Les larves ainsi obtenues seront alors au début du dernier stade larvaire (L3).

II.8. Bioessai

Après un screening préalable, l'insecticide a été testé à différentes doses (0,1; 0,25; 0,5; 1; et 2 µg/larve). Quatre répétitions de 15 insectes chacune ont été réalisées pour chaque dose. Une série témoin est conduite en parallèle et les individus reçoivent 1 µl de solvant (acétone).

La mortalité a été enregistrée quotidiennement jusqu'à l'émergence des adultes et évaluée à partir de la mortalité cumulée des stades immatures (larves mortes, pupes mortes, mues bloquées et incomplètes). La mortalité observée des stades immatures a été corrigée selon la formule d'Abbott (1925) afin d'éliminer la mortalité naturelle. Les pourcentages de mortalités corrigées subissent une transformation angulaire selon les tables de Bliss (1938) *in* Fisher & Yates (1957). Les données ainsi normalisées font l'objet d'une analyse de la variance à un critère de



classification et un classement des doses par le test HSD de Tukey. Enfin, la régression non linéaire exprimant le pourcentage de la mortalité corrigée en fonction du logarithme de la dose a permis d'estimer les doses létales (DL_{10} , DL_{25} , DL_{50} et DL_{90}) ainsi que leurs intervalles de confiance (95 % IC).

II.9. Effets de l'azadirachtine sur le développement

II.9.1. Pourcentage de pupaison et d'émergence

Les effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début du dernier stade larvaire (L3), ont été évalués sur le pourcentage de pupaison et d'émergence des adultes par un comptage direct des pupes et des adultes obtenus. Cinq répétitions de 15 insectes chacune ont été utilisés pour chaque série.

II.9.2. Analyse morphologique

Dans le but de détecter d'éventuelles malformations des insectes après traitement à l'azadirachtine, une analyse morphologique a été menée 24 h après traitement des larves du début du troisième stade (L3) et ce jusqu'à l'émergence des adultes. Les différentes malformations ont été observées grâce à un microscope photonique Leica DM500 muni d'un appareil photographique Leica ICC50 HD. Les pourcentages de chaque phénotype ont été calculés et trois répétitions de 15 insectes chacune ont été utilisés pour chaque série.

II.9.3. Durée du développement

La durée de développement des stades larvaire et pupal a été évaluée sur des séries témoins et traitées (DL_{25} et DL_{50}). Les larves et les pupes ont été observées à intervalle de 4 h jusqu'à la pupaison ou l'émergence des adultes. 30 répétitions ont été utilisées pour chaque série.

II.9.4. Analyse de la survie

Les effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début du dernier stade larvaire (L3), ont été évalués sur la survie des adultes durant les 15 premiers jours de la vie imaginaire. L'analyse de la survie a été



réalisée selon le protocole décrit par Linford *et al.* (2013) (Fig. 8). Des groupes de 15 mâles et 15 femelles nouvellement émergés issus des séries témoins et traitées (DL₂₅, DL₅₀) ont été placés dans des tubes d'élevage contenant 3 ml de milieu standard. Les insectes sont transférés dans des tubes contenant de la nourriture fraîche toutes les 48 heures. Lors des repiquages, les mouches mortes sont dénombrées. 5 répétitions ont été utilisées pour chaque dose et chaque sexe.

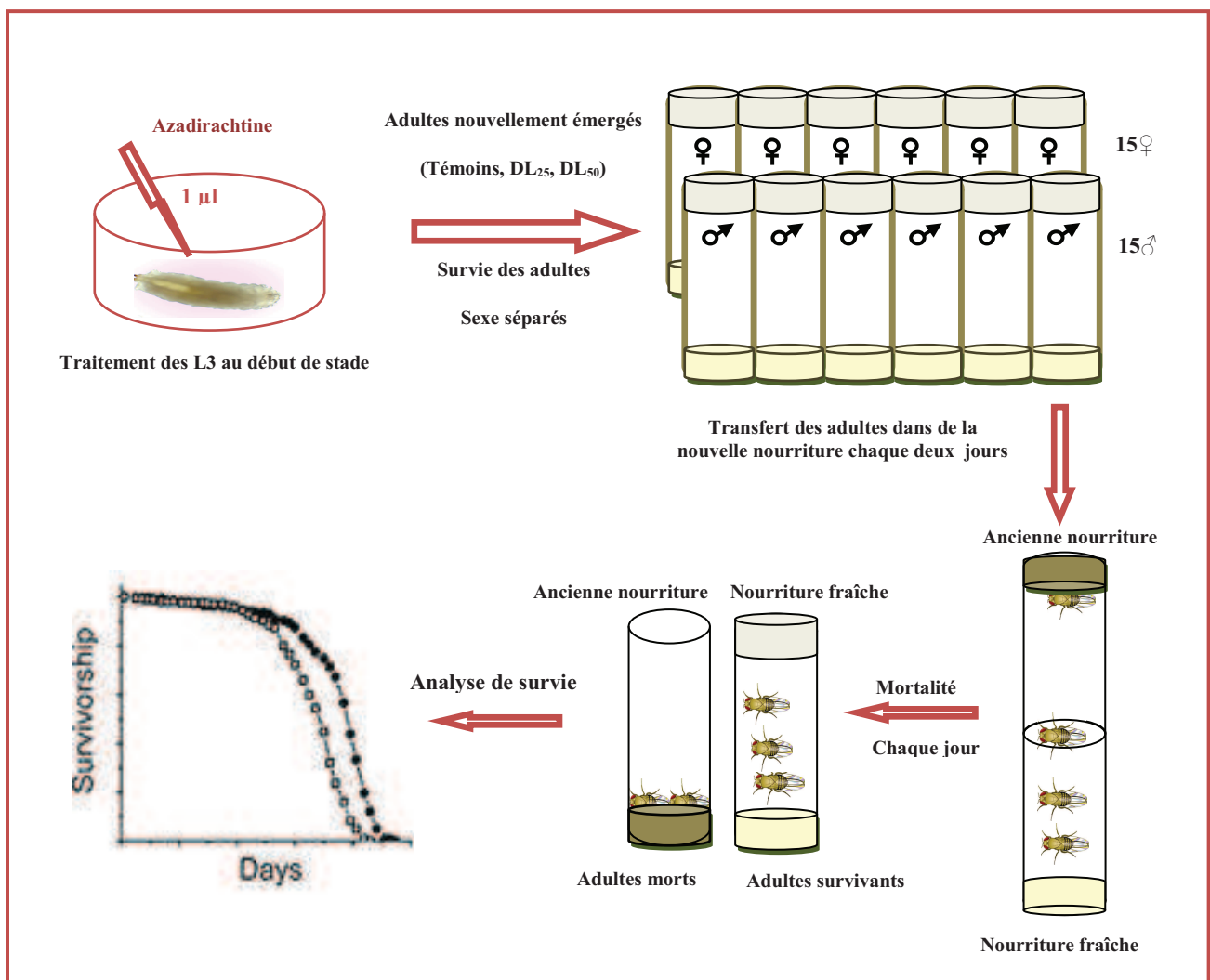


Figure 8. Procédure expérimentale pour l'évaluation de la survie des adultes de *D. melanogaster* d'après Linford *et al.* (2013).



II.10. Préférence d'oviposition en condition de choix ou de non choix

Des adultes mâles et femelles (3 mâles et 3 femelles) vierges âgées de 3 jours, ayant survécus au traitement préalable des larves (DL₂₅, DL₅₀), sont libérés dans un dispositif expérimentale en verre renfermant deux boites de Petri servant de "pondeurs" (diamètre = 35 mm, hauteur = 10 mm), l'une contenant 2 ml de milieu nutritif témoin et l'autre 2 ml de milieu nutritif traité (azadirachtine : 0,1 ou 0,25 µg/ml) (Fig. 9). Les doses d'azadirachtine utilisées dans les milieux nutritifs n'induisent aucune mortalité durant le temps d'exposition relativement court de notre expérience (24 h). Les adultes copulent librement pendant 24 heures (Harshman *et al.*, 1988), à l'issus desquelles les œufs déposés sur chaque pondeur sont dénombrés. Dix répétitions sont réalisées pour chaque test. Un Indice de Préférence d'Oviposition (**IPO**) est calculé selon Flaven-Pouchon *et al.* (2014) comme suit : $IPO = \frac{(\text{nombre d'œufs sur milieu traité}) - (\text{nombre d'œufs sur milieu témoin})}{(\text{nombre d'œufs sur milieu traité}) + (\text{nombre d'œufs sur milieu témoin})}$. Théoriquement l'indice de préférence d'azadirachtin varie entre -1 (grande aversion pour l'azadirachtine) et +1 (grande attraction pour l'azadirachtine).

Des expériences similaires ont été utilisées pour évaluer le comportement d'oviposition dans les conditions de non choix. Dans ce cas, les couples sont transférés dans des boites contenant soit du milieu nutritif standard, soit du milieu nutritif traité à l'azadirachtin (0,1 ou 0,25 µg/ml). Le nombre d'œufs pondus a été évalué de la même façon que pour les tests en conditions de choix. Les œufs pondus par les insectes témoins et traités (DL₂₅, DL₅₀) dans le milieu non traité (témoin) ont été utilisés pour évaluer l'effet de l'azadirachtine sur la fécondité des femelles. Dix répétitions ont été utilisées pour chaque milieu (Fig. 9).

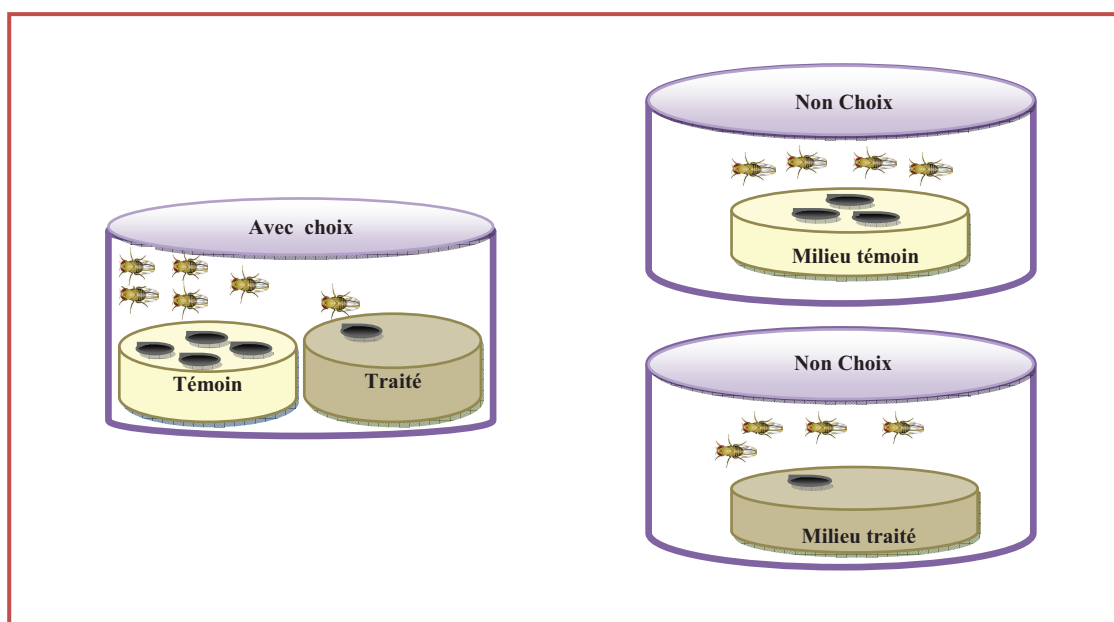


Figure 9. Procédure expérimentale pour l'évaluation de la préférence d'oviposition de *D. melanogaster* en condition de choix ou de non choix.

II.11. Effets de l'azadirachtine sur la digestion

II.11.1. Analyse pondérale

Le poids corporel de *D. melanogaster* a été estimé chez les insectes témoins et traités à l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀). Après traitement des larves du début du stade L3, les insectes sont transférés dans des tubes contenant de la nourriture fraîche et le poids larvaire est estimé 24 h après le traitement (balance de précision: Sartorius AG Gottinger, Germany). Une mesure du poids des pupes (0, 24, 48, 72 h après pupaison) ainsi que le poids des adultes mâles et femelles (24 h après l'émergence) survivant au traitement a également été effectuée. 30 insectes ont été utilisés pour chaque série d'expériences.



II.11.2. Quantité de nourriture ingérée

L'estimation de la quantité de nourriture ingérée chez les insectes des séries témoins et traitées (DL₂₅, DL₅₀) est réalisée selon le protocole de Wong *et al.* (2009) qui utilise le colorant bleu erioglaucine (bleu brillant FCF ou E 133), comme marqueur de la prise de nourriture, à une concentration de 2,5% (W/V). Ce composé n'interfère pas avec le test, n'est pas toxique pour les mouches à cette concentration et n'est pas affecté par le pH de l'intestin ou les enzymes digestives (Tanimura *et al.*, 1982). Le test est réalisé sur les larves L 3 des séries témoins et traitées (DL₂₅, DL₅₀; 24 h après traitement) ainsi que sur les corps décapités des adultes mâles ou femelles (24 h après l'émergence) ayant survécu au traitement préalable des larves. Pour chaque type d'expérience, cinq insectes (larves ou adultes de même sexe) sont placées dans des boîtes de Petri contenant de la nourriture coloré au bleu erioglaucine pendant 2 heures. Après cette période les insectes sont transférés dans des tubes eppendorf et placés au congélateur (- 20 °C) jusqu'au dosage. Seules les mouches ayant un abdomen coloré en bleu ont été sélectionnées (Fig. 10).

Les échantillons, ainsi obtenus, sont homogénéisés dans 0,2 ml d'eau distillée à l'aide d'un broyeur manuel (EPPI pistill); 0,8 ml d'eau distillée sont ensuite ajoutés. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (13 000 trs/min, pendant 15 min) pour éliminer les débris et le surnageant récupéré servira au dosage (Wong *et al.*, 2009). L'analyse spectrophotométrique s'effectue à température ambiante, à une longueur d'onde de 629 nm. L'absorbance du colorant permet de déterminer la quantité de nourriture ingérée contenue dans chaque échantillon par comparaison avec une courbe de référence réalisée à partir d'une série de dilutions (0 - 15 µg/ml) de nourriture marquée à l'erioglaucine (colorant) dans l'eau distillée. Des insectes de même âge exposés à une nourriture standard, sans colorant, sont utilisés comme ligne de base durant l'analyse spectrophotométrique.



Figure 10. Test d'estimation de la quantité de nourriture ingérée, mouche avec un abdomen coloré en bleu.

II.11.3. Dosage des enzymes digestives

1- Préparation des extraits enzymatiques

L'intestin moyen des larves de troisième stade (24 h après traitement) et des adultes mâles et femelles (72 h après l'émergence) des séries témoins et traitées (DL₂₅, DL₅₀) ont fait l'objet d'un dosage de l'activité de quatre enzymes digestives: α amylase, chitinase, protéase et lipase. L'intestin moyen est prélevé sur les larves et les adultes de *D. melanogaster* après dissection sous loupe binoculaire. Les intestins ainsi obtenus sont rincés dans un tampon salin froid (0,15 M NaCl) puis homogénéisés par pool de dix intestins dans 1 ml de tampon universel¹. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 13 000 trs/min pendant 15 min et le surnageant récupéré est conservé à -20°C jusqu'au dosage où il servira comme source d'enzyme. Six répétitions ont été effectuées pour chaque série d'expérience. Par ailleurs, la concentration en protéines totale des différents échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford (1976), qui utilise le bleu brillant de coomassie (G250) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf comme standard, et ce afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques.



L'activité spécifique des enzymes =

$$\left(\frac{\text{Quantité en } \mu\text{M} * \text{dilution}}{\text{Fraction aliquote en ml} * \text{le temps d'incubation}} \right) / \text{Quantité de protéine en mg}$$

1- Préparation du tampon universel pH 7 :

Acide citrique	6,008 g
Potassium dihydrogène phosphate	3,893 g
Acide borique	1,769 g
Thiobarbituric acid	5,266 g
H ₂ O	q.s.p 1 l

Ajuster le pH avec une solution 0,2 N sodium hydroxyde.

2- Dosage de l'activité amylase

Le dosage d' α - amylase est réalisé selon Bernfeld (1955) qui utilise le DNS² comme réactif et l'amidon (1%) comme standard. La méthode du DNS (acide 3,5 dinitrosalicylique) dite méthode de sucre réducteur est une méthode colorimétrique basée sur la réaction du DNS avec les groupes réducteurs libérés après hydrolyse de l'amidon sous l'action de l' α -amylase. Le protocole de dosage est réalisé comme suit : 20 μ l d'extrait enzymatique sont ajoutés à 100 μ l de tampon universel et 40 μ l d'amidon. Après une incubation de 30 minutes à 35°C, la réaction est stoppée par l'addition de 100 μ l de DNS et un chauffage de 10 minutes au bain marie (100°C). Après refroidissement à température ambiante 100 μ l d'eau distillée sont ajoutés.

L'absorbance est mesurée à 540 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions (20 μ l d'eau distillée remplaçant la source d'enzyme). Le calcul de l'activité enzymatique est effectué grâce à une courbe d'étalonnage de maltose (0 - 1 μ M/ml) réalisée à partir d'une solution mère de maltose (180 mg/ml). L'activité spécifique d' α -amylase est exprimée en μ M/min/mg de protéine.



2- Préparation de l'acide dinitrosalicyclique (DNS) :

Acide 3,5 dinitrosalicylique	1g
Eau distillée	50 ml
Sodium potassium tartrate tetrahydrate	30 g
NaOH (2N)	20 ml
H ₂ O	q.s.p 1 l

3- Dosage de l'activité chitinase

- Préparation de la chitine colloïdale

La chitine colloïdale a été préparée selon la méthode de Shen *et al.* (2010); pour cela, 4 g de chitine (Crab shells, Sigma) sont additionnés délicatement à 40 ml d'HCl. Après une agitation d'une heure à 4°C, 1 litre d'eau distillée froide (4°C) est ajouté. Le mélange est ensuite filtré sur papier Wattman et le substrat obtenu est lavé à l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne la valeur de 7. La chitine colloïdale, ainsi obtenue, est resuspendu (1% W/V) dans du tampon phosphate citrate (0,05 M, pH 6,6).

- Dosage enzymatique

Le dosage de l'activité chitinase est réalisé selon le protocole de Miller (1959) basé sur l'hydrolyse enzymatique de la chitine (polymère de chitobiose) en N-acetyl-D-glucosamine (monomère de sucre réducteur). Une fraction aliquote de 250 µl d'extrait enzymatique est additionnée à 250 µl de chitine colloïdale (1%); le mélange est ensuite incubé pendant 30 min à 50°C sous agitation (120 trs/ min) avant d'être transféré au bain marie (100°C pendant 5 min). Après refroidissement à température ambiante et centrifugation à 5000 trs/min pendant cinq minute, 150 µl de surnagent sont additionnés à 300 µl de tampon universel et 200 µl de DNS. Le mélange est incubé 10 minutes au bain marie à 100°C puis refroidi à 4°C. L'absorbance est mesurée à 540 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions (250 µl d'eau distillée remplaçant l'enzyme). L'activité enzymatique a été estimée grâce à une gamme étalon de N-acetylglucosamine (0 - 0,144 mg/ml) préparée à partir d'une solution mère de N-acetylglucosamine (0,5 mg/ml). L'activité spécifique est exprimée en mM/min/mg de protéine.



4- Dosage de l'activité lipase

Le dosage de lipase est réalisé selon la méthode de Tsujita *et al.* (1989) qui utilise le *p*NPB (*p*-nitrophenyl butyrate) comme substrat. Une fraction aliquotée de 10 μ l d'extrait enzymatique est additionnée à 18 μ l de *p*NPB (50 mM) et 172 μ l de tampon universel; le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37 °C. L'absorbance est mesurée à 405 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions (18 μ l d'eau distillée remplaçant le *p*NPB). Une unité de lipase libérera 1 μ M de *p*NP (*p*-nitrophenol) par minute à 37°C lorsque le *p*-nitrophenyl butyrate est utilisé comme substrat. Une gamme d'étalonnage de *p*-Nitrophenol (0 - 0,025 μ M/ml) est réalisée grâce à une solution mère de *p*-Nitrophenol (0,05 μ M/ml). L'activité spécifique de lipase est exprimée en μ M/min/mg de protéine.

5- Dosage de l'activité protéase

L'activité protéasique est dosée selon la méthode décrite par Garcia-Carreno & Haard (1993) utilisant la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est : 100 μ l d'extrait enzymatique, 100 μ l de tampon universel et 200 μ l de solution de caséine (1%) dans le tampon Phosphate salin (PBS) à pH 7,0. Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 h. La réaction est ensuite stoppée par addition de 800 μ l d'acide trichloroacétique (TCA) à 5%, permettant la précipitation des protéines. Le mélange est centrifugé à 8000 trs pendant 15 min et la lecture des absorbances est effectuée à 280 nm dans des cuves en quartz. L'activité enzymatique est déterminée grâce à une gamme étalon de tyrosine (0 - 2,5 mM/ml) préparée à partir d'une solution mère de tyrosine (10 mM). L'activité spécifique des protéases est exprimée en mM/min/mg de protéine.

II.12. Analyse statistique

Les moyennes \pm SEM sont calculées pour chaque groupe d'expérience. L'égalité des variances a été confirmée grâce aux tests de Bartlett et de Brown-Forsythe avant l'utilisation de l'analyse de la variance. Une régression non linéaire utilisant une courbe dose réponse sigmoïdale exprimant le pourcentage des mortalités enregistrées en fonction des logarithmes des doses a permis d'estimer les différentes doses létales (Sadeghi *et al.*, 2009).



L'analyse de la variance (un et deux critères de classification) suivie du test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey est utilisée pour traiter les résultats concernant, l'étude morphologique, la durée de développement, le poids corporel, la quantité de nourriture ingérée et l'activité enzymatique. Les données concernant le test d'oviposition sont analysées grâce au test de Kruskal-Wallis combiné avec le test de Dunn's. Le test de Mann-Whitney est utilisé pour comparer l'indice de préférence d'oviposition (**IPO**). Les tests log-rank Mantel-Cox et Kaplan-Meier sont utilisés pour traiter les données de la survie. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.1 pour Windows (GraphPad software, La Jolla California, USA, www.Graphpad.com).

RÉSULTATS



III. Résultats

III.1. Toxicité de l'azadirachtine chez les stades immatures

L'azadirachtine a été testé par application topique sur les larves L3 du début de stade à des doses variant de 0,1 à 2 μg /larve. Les mortalités enregistrées au cours des tests de toxicité varient de $14,83 \pm 0,32\%$ à la dose la plus faible (0,1 μg) à $85,30 \pm 2,80\%$ à la dose la plus forte (2 μg) (Tableau 1). La mortalité naturelle enregistrée chez les séries témoins est de $9,99 \pm 1,92\%$. Les résultats montrent une mortalité plus importante du stade pupale traduisant une plus grande sensibilité de ce stade à l'action de l'azadirachtine (Tableau 2).

L'analyse de la variance à un critère de classification effectuée après transformation angulaire des pourcentages de mortalité révèle une différence hautement significative ($p < 0,001$) (Tableau 3) entre les doses utilisées. Le classement des doses par le test HSD de Tukey révèle l'existence de 5 groupes (Fig. 11).

La courbe dose-réponse exprimant les pourcentages de mortalité en fonction du logarithme de la dose appliquée (Fig. 12) a permis l'estimation des valeurs des différentes doses létales (DL) ainsi que leurs intervalles de confiance et le Hill Slope (Tableau 4).

Tableau 1: Toxicité de l'azadirachtine (μg /insecte), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster*: Mortalité corrigée (%) des stades immatures ($m \pm \text{SEM}$, $n = 4$ répétitions de 15 individus chacune).

Dose (μg /insecte)	0,1	0,25	0,5	1	2
R1	14,29	23,07	38,45	57,14	92,30
R2	15,38	21,42	35,71	61,53	78,57
R3	14,29	23,07	38,45	61,53	85,17
R4	15,38	22,21	35,71	61,53	85,17
m \pm SEM	14,83\pm0,32	22,44\pm0,39	37,08\pm0,79	60,43\pm1,09	85,30\pm2,80



Tableau 2 : Effets de l'azadirachtine, administré par application topique à différentes doses (μg /insecte) sur les pourcentages de mortalité et les pourcentages d'émergence de *D. melanogaster*. (*) Le pourcentage d'adultes morts représente les mues bloquées et incomplètes.

Doses	% de mortalité		% Emergence	
	% de la mortalité totale	% de la mortalité/stade de développement*		
Témoins	6,66%	Larves	0%	93,33%
		pupes	6,66%	
		adultes	0%	
0,1 μg	20%	Larves	6,66%	80%
		pupes	13,33%	
		adultes	0%	
0,25 μg	26,66%	Larves	6,66%	73,33%
		pupes	13,33%	
		adultes	6,66%	
0,5 μg	40%	Larves	6,66%	60%
		pupes	26,66%	
		adultes	6,66%	
1 μg	66,66%	Larves	20%	33,33%
		pupes	40%	
		adultes	6,66%	
2 μg	86,66%	Larves	6,66%	13,33%
		pupes	73,33%	
		adultes	6,66%	



Tableau 3. Toxicité de l'azadirachtine ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* : Mortalité corrigée (%) des stades immatures ($m \pm \text{SEM}$, $n= 4$ répétitions de 15 individus chacune) : Analyse de la variance à un critère de classification après transformation angulaire des mortalités enregistrées (%).

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	13357	4	3339	419,6	0,001***
Erreur résiduelle	119,4	15	7,95		
Total	13476	19			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

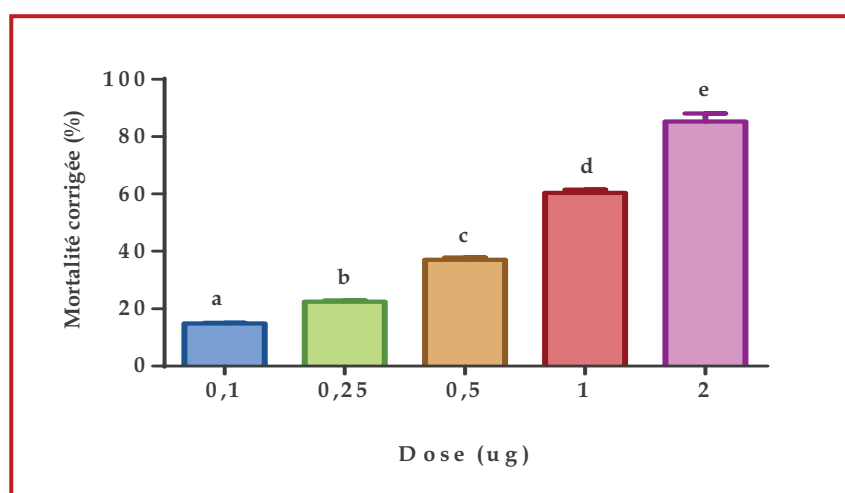


Figure 11. Toxicité de l'azadirachtine ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* : Mortalité corrigée (%) des stades immatures ($m \pm \text{SEM}$, $n= 4$ répétitions de 15 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.

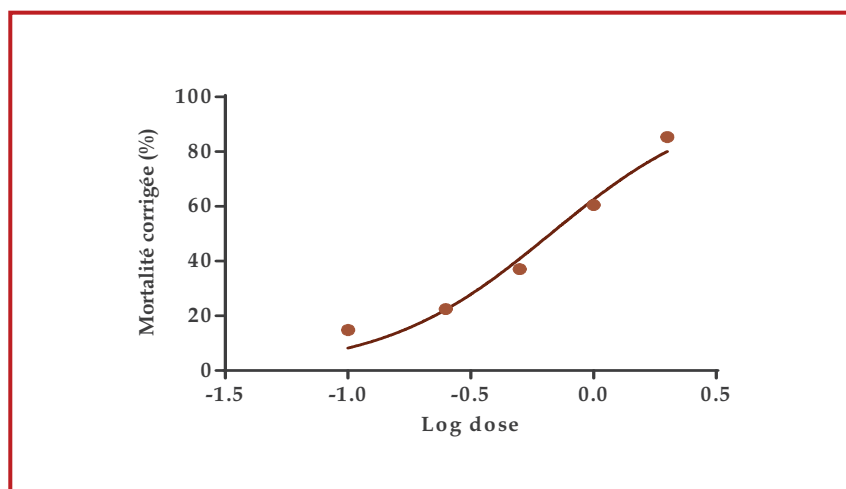


Figure 12. Effets de l'azadirachtine, administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée chez les stades immatures en fonction du logarithme de la dose. $R^2= 97\%$.

Tableau 4. Toxicité de l'azadirachtine ($\mu\text{g}/\text{insecte}$), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster*: Détermination des doses létales chez les stades immatures et leurs intervalles de confiance (95%).

	Valeur (μg)	Intervalle de confiance	Erreur standard
DL ₁₀	0,11	[0,05 - 0,27]	
DL ₂₅	0,28	[0,17 - 0,46]	
DL ₅₀	0,67	[0,48 - 0,93]	
DL ₉₀	3,77	[1,60 - 8,90]	
Hill slope	1,27	[0,70 - 1,84]	0,17



III.2. Effets de l'azadirachtine sur le développement

III.2.1. Effets de l'azadirachtine sur le pourcentage de pupaison et d'émergence

L'effet de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) administré par application topique chez les larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* réduit significativement le pourcentage de pupaison et d'émergence (Fig. 13). Une diminution dans le pourcentage de pupaison est également enregistrée au deux doses testées ($p < 0,001$) et ce sans effet dose ($p > 0,05$) (Tableau 5). Les valeurs moyennes enregistrées sont de $93,33 \pm 2,10\%$ pour les témoins, $81,33 \pm 2,49\%$ pour la DL₂₅, et $76 \pm 2,66\%$ pour la DL₅₀ (Fig. 13 A).

L'azadirachtine (DL₂₅ et DL₅₀) réduit également le pourcentage d'émergence des adultes de *D. melanogaster* comparativement aux témoins ($p < 0,001$) et ce avec un effet dose-réponse ($p < 0,001$) (Tableau 6). Les valeurs moyennes sont de $93,33 \pm 2,10\%$ pour les témoins, $72 \pm 2,49\%$ pour la DL₂₅, et $46,66 \pm 4,71\%$ pour la DL₅₀ (Fig. 13 B).

Tableau 5. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le pourcentage de pupaison, ($m \pm SEM$, $n = 5$ répétitions de 15 individus chacune). Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	788	2	394	13,29	0,001***
Erreur résiduelle	355,5	12	29,64		
Total	1144	14			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 6. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le pourcentage d'émergence, ($m \pm SEM$, $n = 5$ répétitions de 15 individus chacune). Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	5458	2	2729	49,76	0,001***
Erreur résiduelle	658	12	5484		
Total	6116	14			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

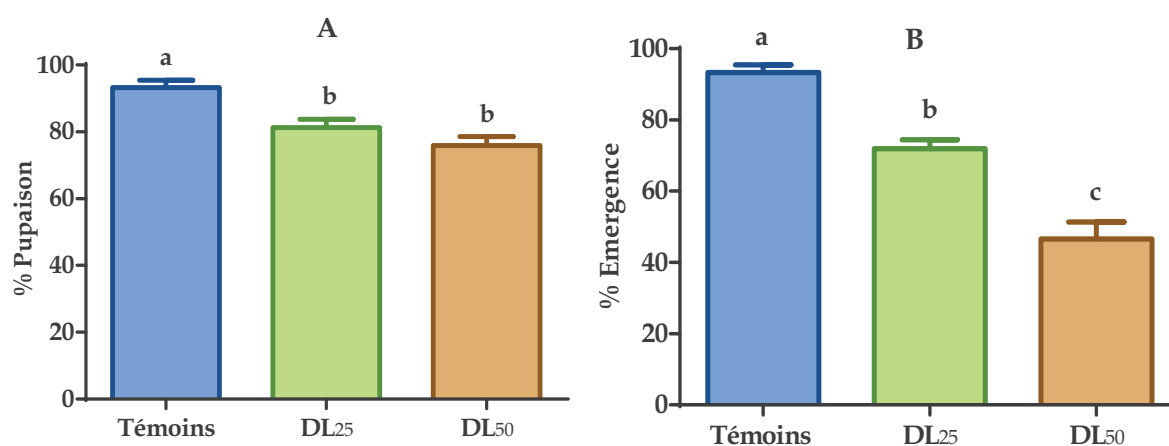


Figure 13. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le pourcentage de pupaison (A) et d'émergence (B), ($m \pm SEM$, $n = 5$ répétitions de 15 individus chacune). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).



III.2.2. Effets de l'azadirachtine sur la morphologie

Différentes malformations (Fig. 14) ont été enregistrées chez *D. melanogaster* après traitement des larves du début du stade L3 à l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}). Les aberrations morphologiques observées chez les larves sont représentées par une hyperpigmentation, une déformation du corps ainsi que l'apparition d'intermédiaire larve-pupe. En ce qui concerne les pupes et les adultes, des pupes déformées et bloquées, des intermédiaires pupe-adulte, des mues incomplètes, des adultes malformés (absence d'ailes ou ailes déformés) ainsi qu'une inhibition totale de l'émergence ont été notés (Fig. 14).

La comparaison entre les séries témoins et traitées (Fig. 15) indique que l'azadirachtine induit une différence hautement significative ($p < 0,001$) de la plupart des malformations observées uniquement pour la plus forte dose (DL_{50}). Cependant, les taux d'adultes malformés ainsi que de l'émergence complète des adultes diffèrent significativement en comparaison aux témoins avec une relation dose-réponse.

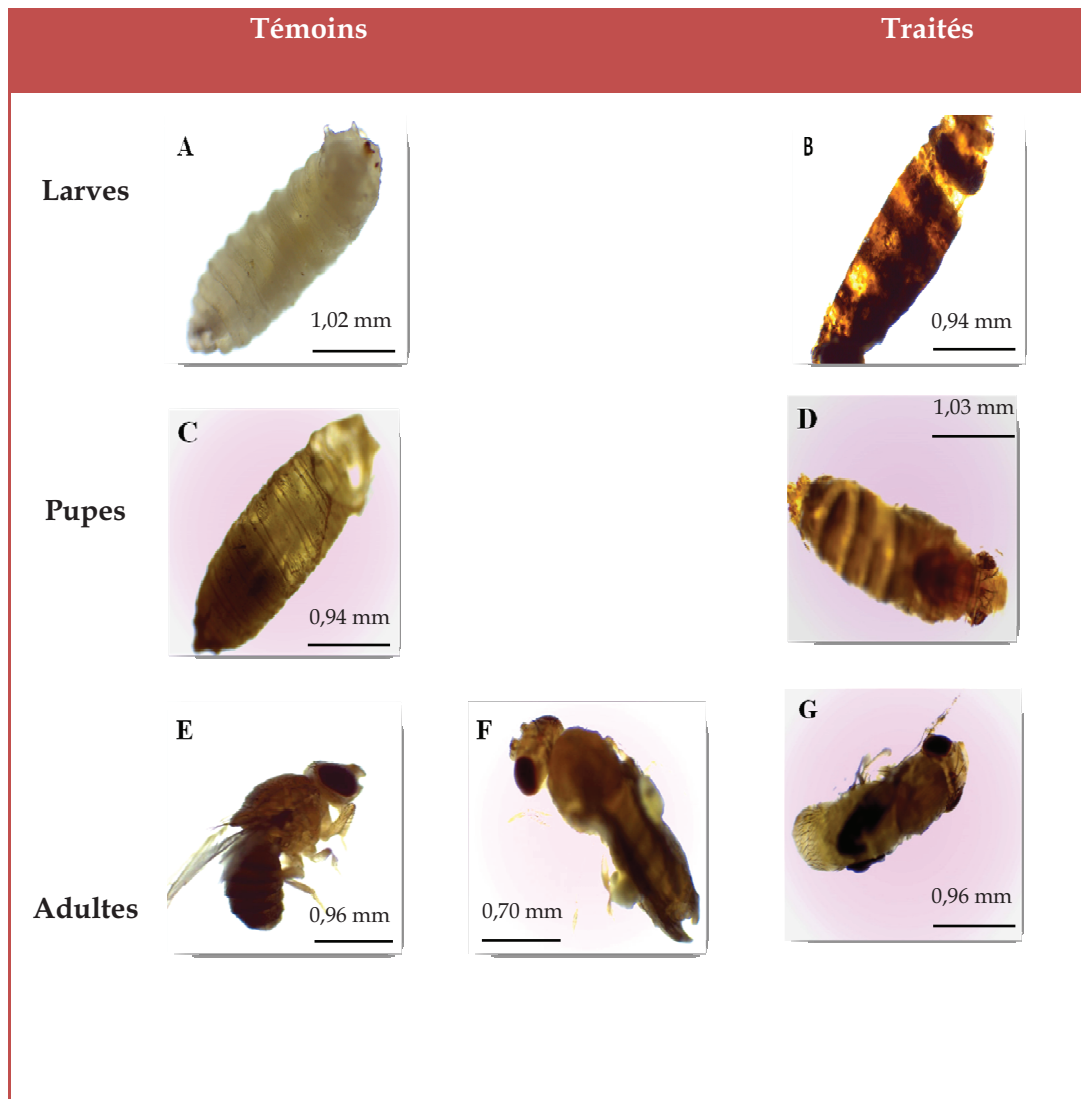


Figure 14. Aberrations morphologiques chez *D. melanogaster* après traitement des larves du début de stade L3 à l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}): (A) Larve normale, (B) Larve hyper pigmentée, (C) Pupa normale, (D) Pupa-adulte intermédiaire, (E) Adulte normale, (F) et (G) Adulte malformé.

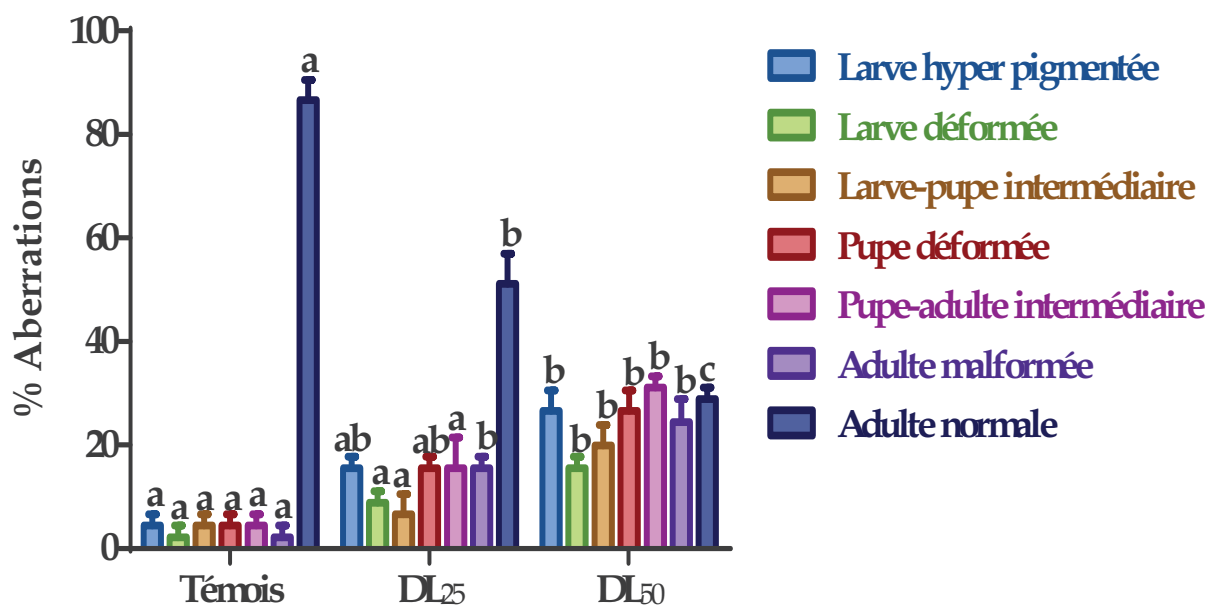


Figure 15. Pourcentage d'aberrations morphologiques chez *D. melanogaster* après traitement des larves du début de stade L3 à l'azadirachtine (LD₂₅, LD₅₀), ($m \pm \text{SEM}$, $n = 3$ répétitions de 15 individus). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

III.2.3. Effets de l'azadirachtine sur la durée de développement

L'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) administré par application topique chez les larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* augmente significativement la durée de développement des stades larvaire et pupal (Fig. 16). En effet la durée de développement du stade L3 varie avec une relation dose-réponse ($p < 0,001$) (Tableau 7), les valeurs moyennes enregistrées sont de $53,13 \pm 1,09$ h pour la DL₂₅ et $60,13 \pm 1,54$ h pour la DL₅₀ contre des valeurs témoins de $42,27 \pm 0,90$ h. L'azadirachtine induit donc un prolongement du stade larvaire d'environ 11 h pour la DL₂₅ et 18 h pour la DL₅₀ (Fig. 16 A).



Une augmentation de la durée du stade pupal est également enregistrée au deux doses testées ($p < 0,001$) et ce avec un effet dose-réponse ($p = 0,01$) (Tableau 8). Les valeurs moyennes sont de $150,7 \pm 0,69$ h pour les témoins, $158,5 \pm 1,2$ h pour la DL₂₅, et $165,7 \pm 1,45$ h pour la DL₅₀ (Fig. 16 B).

Tableau 7. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la durée de développement (h) des stades larvaire, ($m \pm$ SEM, $n = 30$). Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	4863	2	2432	55,28	0,001***
Erreur résiduelle	3827	87	43,99		
Total	8690	89			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

Tableau 8. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la durée de développement (h) des stades pupal, ($m \pm$ SEM, $n = 30$). Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	3406	2	1703	42,12	0,001***
Erreur résiduelle	3518	87	40,44		
Total	6924	89			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

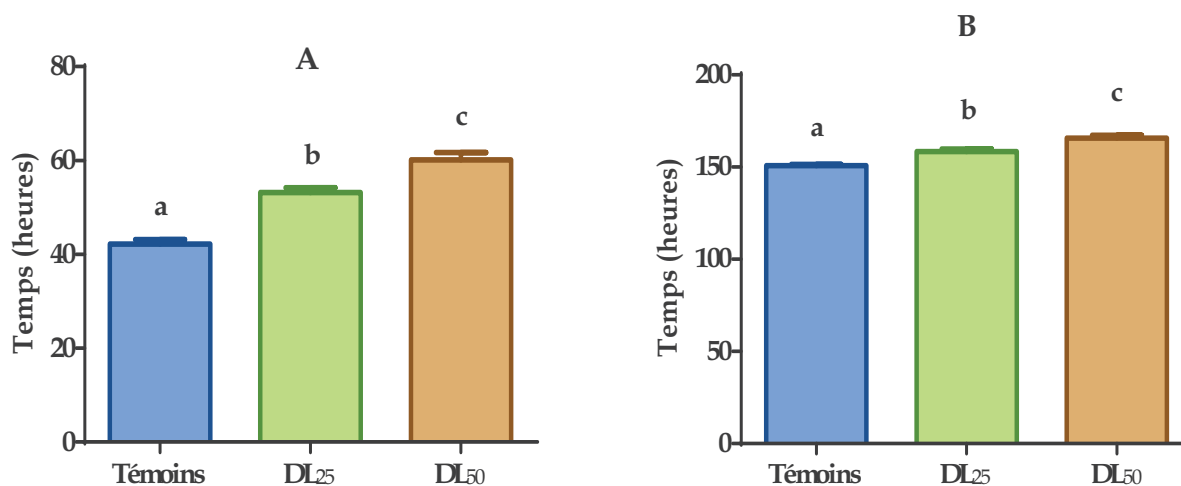


Figure 16. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la durée de développement (h) des stades larvaire (A) et pupal (B), ($m \pm \text{SEM}$, $n = 30$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

III. 2.4. Effets de l'azadirachtine sur la survie des adultes

Le traitement des larves au début du stade L3 à l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) induit une réduction significative de la survie des adultes mâles et femelles de *D. melanogaster* (Fig. 17) et ce durant les 15 premiers jours de la vie imaginale (Mâle: Log-rank test, $\chi^2 = 21,79$; $df = 2$; $p < 0,001$; Femelle: Log-rank test, $\chi^2 = 19,68$; $df = 2$; $p < 0,001$).

La mortalité enregistrée est dépendante de la dose administrée et les femelles semblent plus sensibles au traitement. De manière générale, la survie des mouches traitées est importante durant les premiers jours de l'expérimentation puis décline de manière exponentielle. Chez les série témoins, une survie de 100% des insectes testés est enregistrée contre 48% pour les mâles et 37% pour les femelles et ce à la plus



faible dose (DL₂₅). Pour la DL₅₀ les taux de survie sont de 26% pour les mâles et seulement 16% pour les femelles (Fig. 17 A & B).

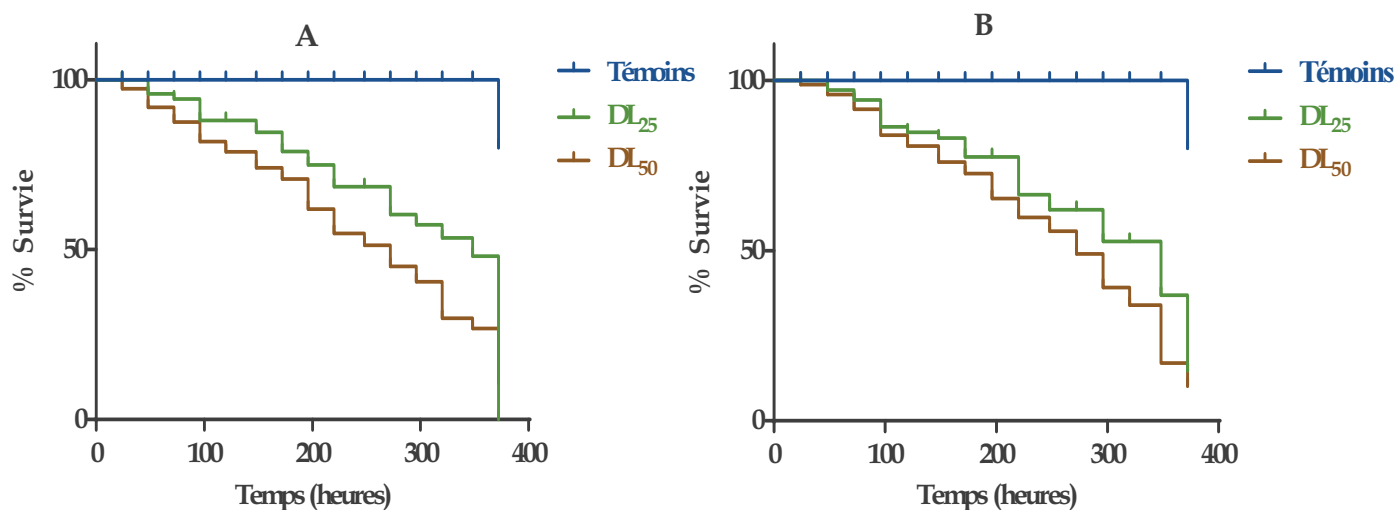


Figure 17. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la survie des adultes mâles (A) et femelles (B).

III.3. Effets de l'azadirachtine sur la fécondité et la préférence du site d'oviposition

L'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique chez les L3 du début de stade, affecte la fécondité des femelles en réduisant de manière hautement significative le nombre d'œufs pondus et ce comparativement aux témoins ($p < 0,001$). Les résultats obtenus en condition de choix montrent une préférence claire d'oviposition sur un milieu témoin que sur un milieu traité et ce pour les deux doses testées (0,1 et 0,25 $\mu\text{g/ml}$). L'analyse statistique des résultats révèle un effet hautement significative aussi bien pour le milieu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (KW= 19,49; $p < 0,001$) (Fig. 18A) que pour le milieu 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (KW= 25,20; $p < 0,001$) (Fig. 18 B).

De manière générale, le pourcentage d'œufs pondus diminue d'environ 30 à 40% sur milieu traité en comparaison au milieu non traité. De plus, les femelles ayant



été préalablement exposées (début du stade L3) à l'azadirachtine montrent une aversion plus importante à cette molécule en comparaison aux femelles naïves et pondent donc moins d'œufs ($p < 0,001$).

Les résultats concernant l'indice de préférence d'oviposition (IPO) des femelles de *D. melanogaster* témoins ou traitées à l'azadirachtine (début de stade L3) sont représentés sur la figure 19. Les valeurs de l'IPO obtenues sont toujours négatives et sont de - 0,293, - 0,419, - 0,370 pour le milieu 0,1 µg/ml - 0,296, - 0,391, - 0,398 pour le milieu 0,25 µg/ml et ce respectivement pour les femelles témoins, traitées à la DL₂₅ et traitées à la DL₅₀.

L'analyse statistique des données révèle des différences significatives entre l'IPO des femelles traitées et des femelles témoins. En effet, Pour le milieu 0,1 µg/ml, le test de Mann-Whitney révèle un effet significatif entre les femelles témoins et traitée à la DL₂₅ ($U = 8,00$; $p = 0,02$) et à la DL₅₀ ($U = 4,00$; $p = 0,0037$). Cependant, aucune différence significative n'est enregistrée entre les deux doses testées ($U = 24,00$; $p > 0,05$) (Fig. 19 A). Des résultats similaires sont observés pour le milieu 0,25 µg/ml avec des différences significatives entre les femelles témoins et traitée à la DL₂₅ ($U = 12,00$; $p = 0,02$) et entre les femelles témoins et traitée à la DL₅₀ ($U = 13,00$; $p = 0,027$). Aucun effet dose n'est enregistré ($U = 40,00$; $p > 0,05$) (Fig. 19 B).

En ce qui concerne les tests d'oviposition en condition de non choix, les résultats obtenus montrent une nette préférence d'oviposition sur milieu non traité et ce pour tous les insectes testés (témoins, DL₂₅ et DL₅₀). Les femelles pondent moins d'œufs sur milieu traité comparativement au milieu non traité (Fig. 20) et une relation doses-réponse est enregistrée pour le milieu 0,1 µg/ml ($p < 0,001$). Le test de Kruskal-Wallis révèle des différences significatives entre les différents insectes testés (témoins, DL₂₅ et DL₅₀) et ce pour le milieu témoin ($KW = 25,81$; $p < 0,001$), le milieu 0,1 µg/ml ($KW = 25,43$; $p < 0,001$) et pour le milieu 0,25 µg/ml ($KW = 20,79$; $p < 0,001$) (Fig. 20).

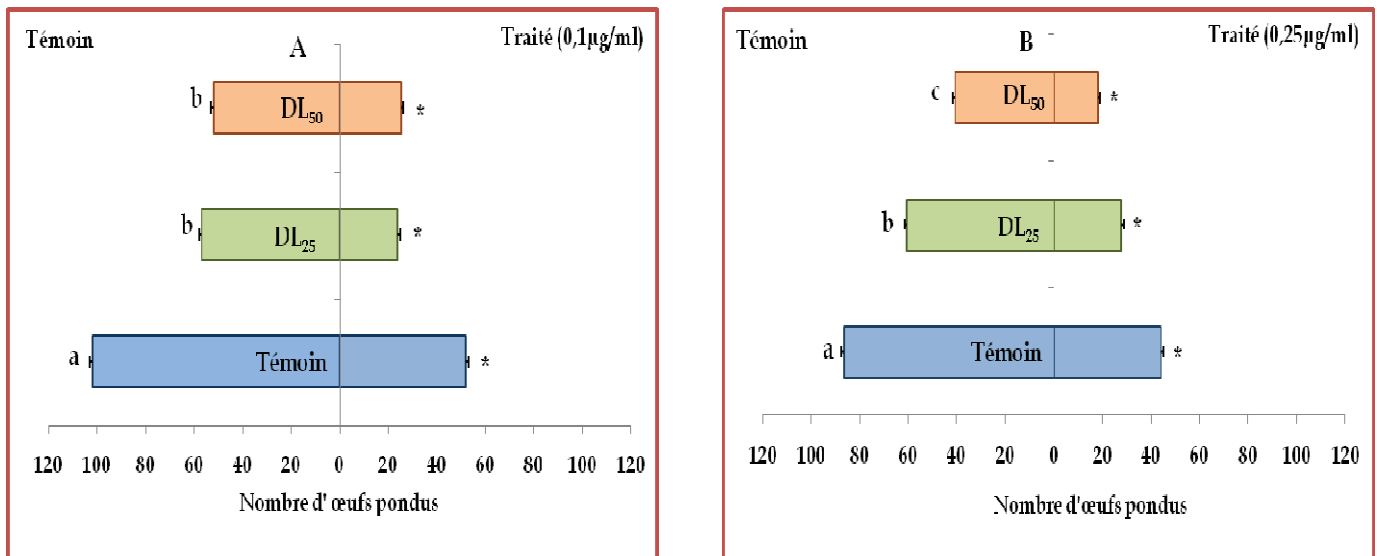


Figure 18. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le nombre d'œufs pondus en condition de choix du milieu de ponte: **A** : Milieu témoin *vs* milieu 0,1 µg/ml d'azadirachtine, **B** : Milieu témoin *vs* milieu 0,25 µg/ml d'azadirachtine. ($m \pm SEM$, $n = 10$ répétitions de trois couples chacune). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités dans le même milieu. Les étoiles indiquent une différence significative entre les individus de la même série dans des milieux différents.

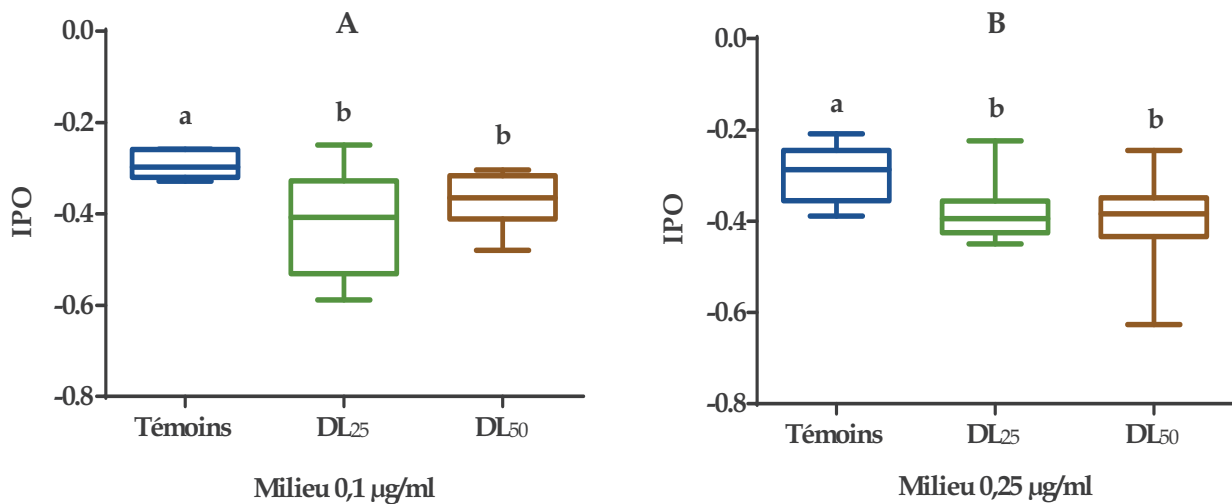


Figure 19. Indice de préférence d’oviposition (IPO) des femelles de *D. melanogaster* en condition de choix du milieu de ponte. **A** : Milieu 0,1 µg/ml, **B** : 0,25 µg/ml. Les moyennes suivies d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités dans le même milieu.

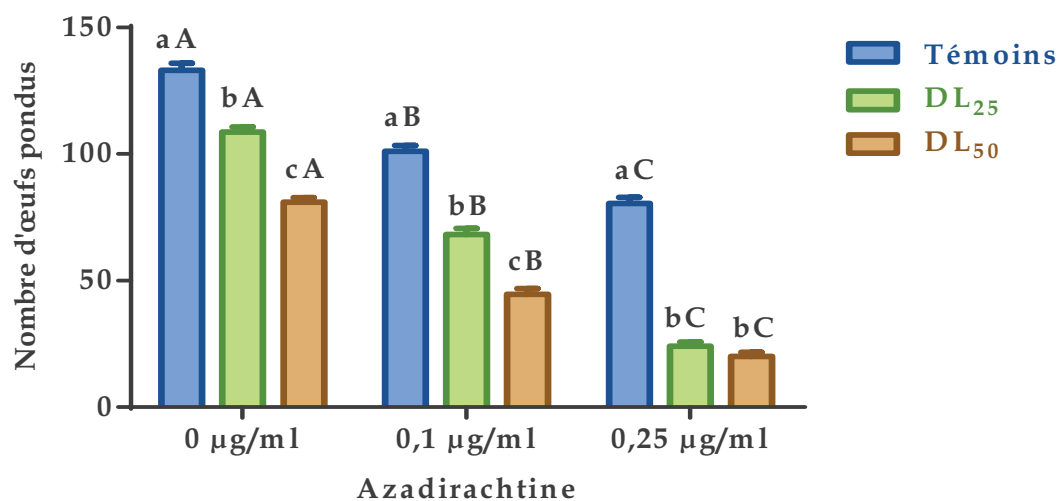


Figure 20. Effets de l’azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le nombre d’œufs pondus en condition de non choix du milieu de ponte. ($m \pm SEM$, $n = 10$ répétitions de trois couples chacune). Les moyennes suivies d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités dans le même milieu. Les lettres en majuscules indiquent une différence significative entre les individus de la même série dans des milieux différents.



III.4. Effets de l'azadirachtine sur la digestion

III.4.1. Effets de l'azadirachtine sur le poids corporel

Les effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) sur le poids corporel des larves, pupes et adultes de *D. melanogaster* sont représentés sur la figure 21. Le poids des larves L3 au moment du traitement est $2,01 \pm 0,03$ mg. Chez les séries témoins (24 h après traitement) le poids moyen des larves L3 est de $1,96 \pm 0,03$ mg, l'azadirachtine réduit de manière significative ($p < 0,001$) (Tableau 9) le poids larvaire et les valeurs moyennes enregistrées sont de $1,77 \pm 0,03$ mg pour la DL₂₅ et $1,52 \pm 0,04$ mg pour la DL₅₀. L'azadirachtine réduit donc le poids larvaire d'environ 9,69% pour la DL₂₅ et 22,44% pour la DL₅₀ (Fig. 21 A).

Les résultats concernant le poids des pupes de *D. melanogaster* témoins et traitées aux deux doses testées (DL₂₅ et DL₅₀) et âgées de 0, 24, 48, et 72 h sont représentés sur la figure 21 B. L'azadirachtine (DL₂₅ et DL₅₀) réduit de manière significative le poids des pupes au cours du développement pupal.

L'analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur le poids des pupes révèle un effet hautement significatif du traitement ($p < 0,001$), de l'âge ($p < 0,001$) et un effet non significatif de l'interaction traitement-âge ($p > 0,05$) (Tableau 10). Toutefois, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est enregistrée entre les deux doses testées (Fig. 21 B).

L'azadirachtine (DL₂₅ et DL₅₀) réduit également le poids des adultes mâles et femelles de *D. melanogaster* comparativement aux témoins et ce sans effet dose (Fig. 21 C). L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle un effet hautement significatif du traitement ($p < 0,001$), du sexe ($p < 0,001$) mais pas d'effet interaction traitement-sexe ($p = 0,56$) (Tableau 11).



Tableau 9. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel des larves L3, (m ± SEM, n= 30). Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	2,98	2	1,49	38,97	0,001***
Erreur résiduelle	3,32	87	0,038		
Total	6,31	89			

Tableau 10. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel des pupes. (m ± SEM, n= 30) : Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	5,10	2	2,55	28,77	0,001***
Age	2,11	3	0,703	7,93	0,001***
Interaction	0,21	6	0,036	0,406	0,874
Erreur résiduelle	30,88	348	0,088		

Tableau 11. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel des adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 30) : Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	1,77	2	0,885	21,54	0,001***
Sexe	10,13	1	10,13	246,4	0,001***
Interaction	0,046	2	0,023	0,568	0,567
Erreur résiduelle	7,15	174	0,041		

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

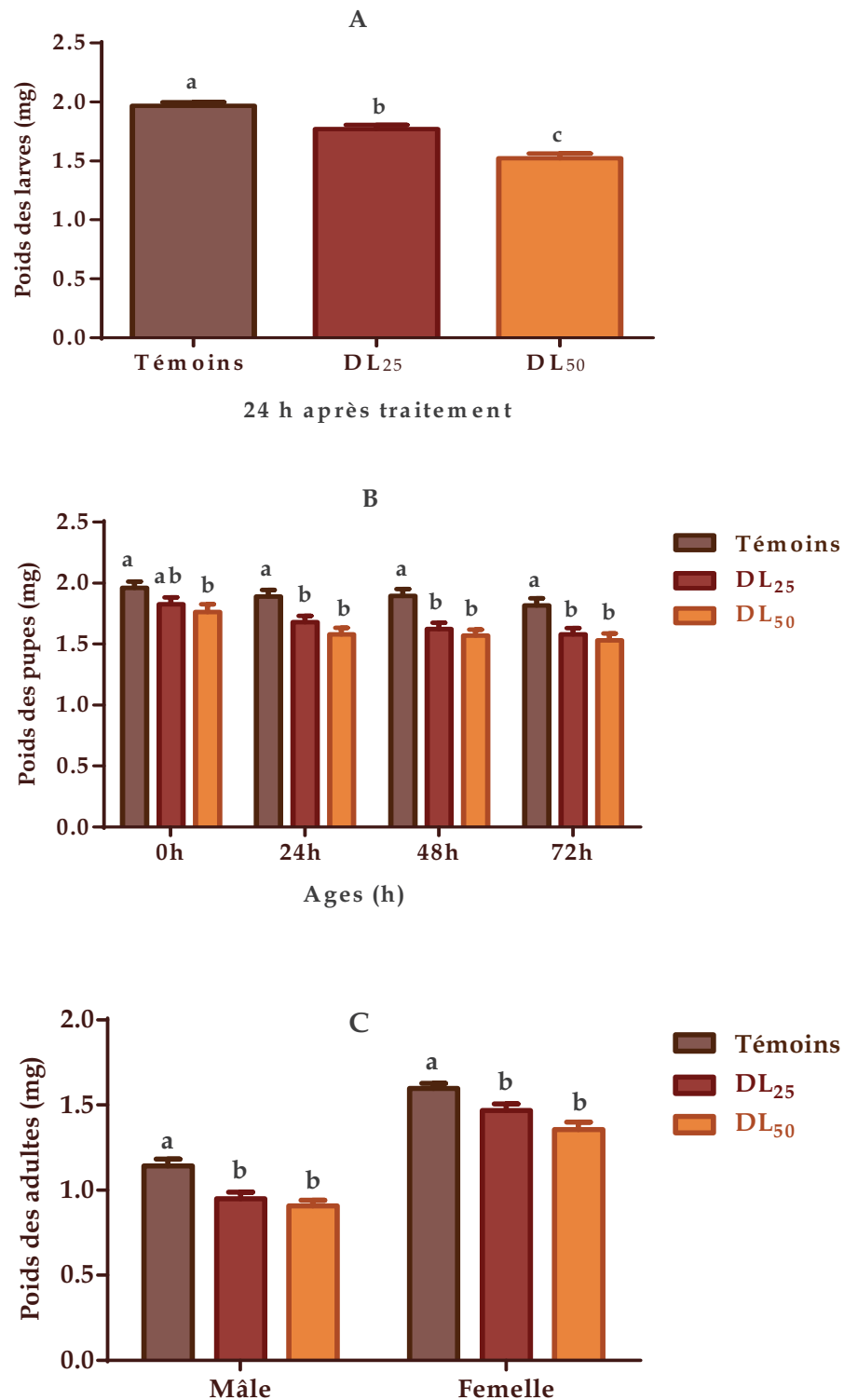


Figure 21. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur le poids corporel chez les larves (A), les pupes (B) et les adultes mâles et femelles (C). ($m \pm SEM$, $n = 30$ répétitions). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités de même âge ou de même sexe.



III.4.2. Effets de l'azadirachtine sur la quantité de nourriture ingérée

La quantité de nourriture ingérée a été déterminée à partir d'une courbe standard utilisant différentes concentrations de nourriture marquée à l'erioglaucine (Fig. 22).

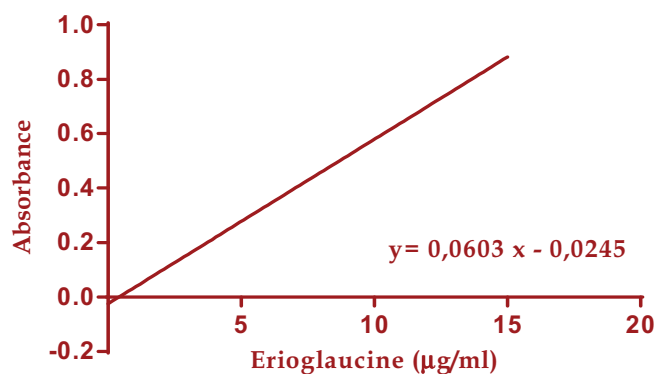


Figure 22. Quantité de nourriture ingérée : Courbe standard exprimant les absorbances à 629 nm en fonction des concentrations de nourriture marquée à l'erioglaucine (µg/ml). $R^2 = 99\%$.

L'azadirachtine (DL_{25} et DL_{50}) administré par application topique chez les larves du début de stade L3 affecte la quantité de nourriture ingérée chez *D. melanogaster* (Fig. 23). Les valeurs moyennes enregistrées chez les larves, 24 h après traitement, sont de $1,96 \pm 0,13$ µg/larve pour la DL_{25} et $1,36 \pm 0,11$ µg/insecte pour la DL_{50} , contre des valeurs témoins de $2,40 \pm 0,03$ µg/ insecte (Fig. 23 A).

L'analyse statistique des données (Tableau 12) révèle un effet hautement significatif du traitement ($p < 0,001$); en effet les larves traitées à l'azadirachtine consomment environ 30% à 45%, respectivement pour la DL_{25} et DL_{50} , de nourriture en moins en comparaison aux larves témoins (Fig. 23 A).

Les résultats concernant la prise de nourriture des adultes mâles et femelles survivant au traitement des larves L3 du début de stade, révèlent une réduction significative de la quantité de nourriture ingérée chez les série traitées



comparativement aux témoins et ce avec un effet dose-dépendent (Fig. 23 B). Les valeurs moyennes enregistrées pour les mâles sont de $1,91 \pm 0,10$ $\mu\text{g}/\text{insecte}$ pour les témoins, $1,32 \pm 0,029$ $\mu\text{g}/\text{insecte}$ pour la DL_{25} et $1,08 \pm 0,083$ $\mu\text{g}/\text{insecte}$ pour la DL_{50} . Pour les femelles, les valeurs moyennes sont de $3,10 \pm 0,095$ $\mu\text{g}/\text{insecte}$ pour les témoins et $2,63 \pm 0,15$ et $2,36 \pm 0,17$ $\mu\text{g}/\text{insecte}$ respectivement pour la DL_{25} et la DL_{50} .

L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle un effet hautement significatif du traitement ($p < 0,001$), du sexe ($p < 0,001$) et un effet non significatif de l'interaction traitement-sexe ($p > 0,05$) (Tableau 13).

Tableau 12. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la quantité de nourriture ingérée chez les larves L3, ($m \pm \text{SEM}$, $n=30$). Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	2,74	2	1,37	25,80	0,001***
Erreur résiduelle	0,63	12	0,053		
Total	3,38	14			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 13. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la quantité de nourriture ingérée chez les adultes mâles et femelles. ($m \pm SEM$, $n= 5$): Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	3,23	2	1,61	23,99	0,001***
Sexe	11,84	1	11,84	175,5	0,001***
Interaction	0,020	2	0,010	0,15	0,86
Erreur résiduelle	1,62	24	0,067		

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

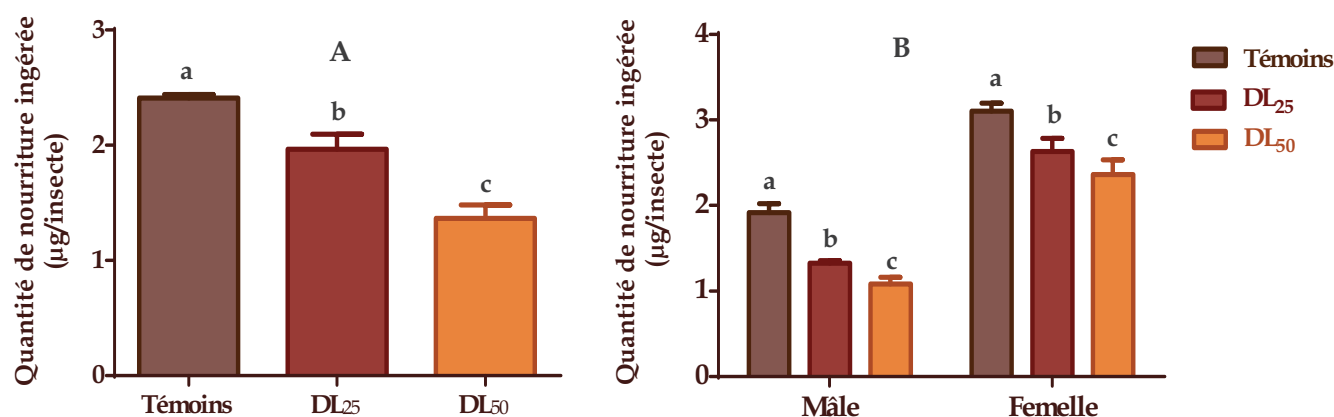


Figure 23. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur la quantité de nourriture ingérée chez les larves (A) et les adultes mâles et femelles (B). ($m \pm SEM$, $n= 5$ répétitions de 5 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités.



III.4.3. Effet de l'azadirachtine sur les enzymes digestives

L'azadirachtine a été utilisée par application topique (1 μ l/insecte) à deux doses (DL₂₅ et DL₅₀) sur des larves du début de stade L3 de *D. melanogaster*. Les effets de l'insecticide ont été évalués sur l'activité spécifique de quatre enzymes digestives: α -amylase, chitinase, lipase et protéase. Les différentes activités spécifiques ont été quantifiées en utilisant les intestins moyen des larves L3 (24 h après traitement) et les adultes mâles et femelles (3 jours) de *D. melanogaster*.

1- Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique de l' α -amylase

L'activité α -amylase a été déterminée à partir d'une courbe standard utilisant différentes concentrations de maltose (Fig. 24).

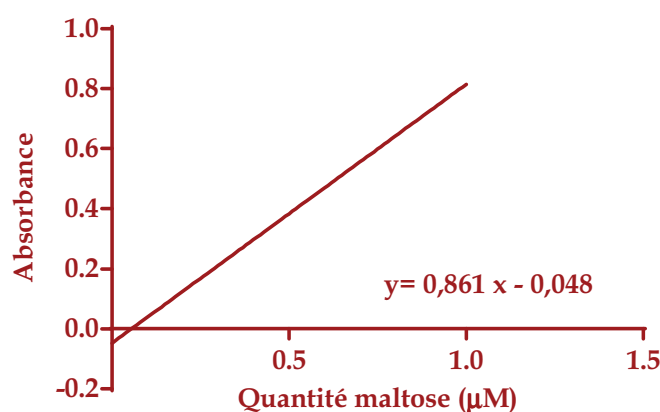


Figure 24. Dosage d' α -amylase : Courbe standard exprimant les absorbances à 540 nm en fonctions des concentrations en maltose (μ M). $R^2 = 98\%$.

Les activités spécifiques de l' α -amylase (μ M/min/mg de protéines) chez les larves L3 (24 h après traitement) et les adultes (72 h après l'émergence) de *D. melanogaster*, témoins et traités par application topique à l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) sont représentées sur la figure 25.

Chez les larves l'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet significatif ($p = 0,002$) du traitement (Tableau 14). Chez les larves témoins, l'activité spécifique de l' α -amylase est de $4,86 \pm 0,15$ μ M/min/mg de protéine. Chez les séries traitées les valeurs enregistrées sont de $3,44 \pm 0,13$ et $3,14 \pm 0,11$ μ M/min/mg de protéine respectivement pour la DL₂₅ et la DL₅₀. Par ailleurs, aucune



différence significative ($p > 0,05$) n'est observée entre les deux doses testées (Fig. 25 A).

L'analyse de la variance à deux critères de classification réalisée sur l'activité spécifique de l' α -amylase chez les adultes mâles et femelles des séries témoins et traitées à l'azadirachtine (DL_{25} et DL_{50}), révèle un effet traitement hautement significatif ($p < 0,001$), un effet sexe non significatif ($p > 0,05$), et une interaction traitement/sexe hautement significative ($p < 0,001$) (Tableau 15).

Les valeurs de l'activité spécifique de l' α -amylase chez les mâles et les femelles des séries témoins sont respectivement de $5,47 \pm 0,16 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine et $4,74 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine. Chez les séries traitées à la DL_{25} les valeurs obtenues sont de $3,43 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine pour les mâles et $3,51 \pm 0,09 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine pour les femelles. Pour la dose la plus élevée (DL_{50}), les valeurs sont de $2,26 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine chez les mâles et de $2,44 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine chez les femelles.

La comparaison entre les séries témoins et traitées (DL_{25} , DL_{50}) révèle que l'azadirachtine réduit d'une manière significative l'activité spécifique de l' α -amylase chez les adultes mâles et femelles avec un effet dose dépendant (Fig. 25 B).

Tableau 14. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de l' α -amylase chez les larves L3. ($m \pm \text{SEM}$, $n=6$ répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	10,14	2	5,06	45,01	0,001***
Erreur résiduelle	1,68	15	0,11		
Total	11,83	17			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 15. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de l' α -amylase chez les adultes mâles et femelles. ($m \pm SEM$, $n= 6$ répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	46,07	2	23,04	396,2	0,001***
Sexe	0,21	1	0,21	3,77	0,06
Interaction	1,47	2	0,73	12,69	0,001***
Erreur résiduelle	1,74	30	0,058		

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

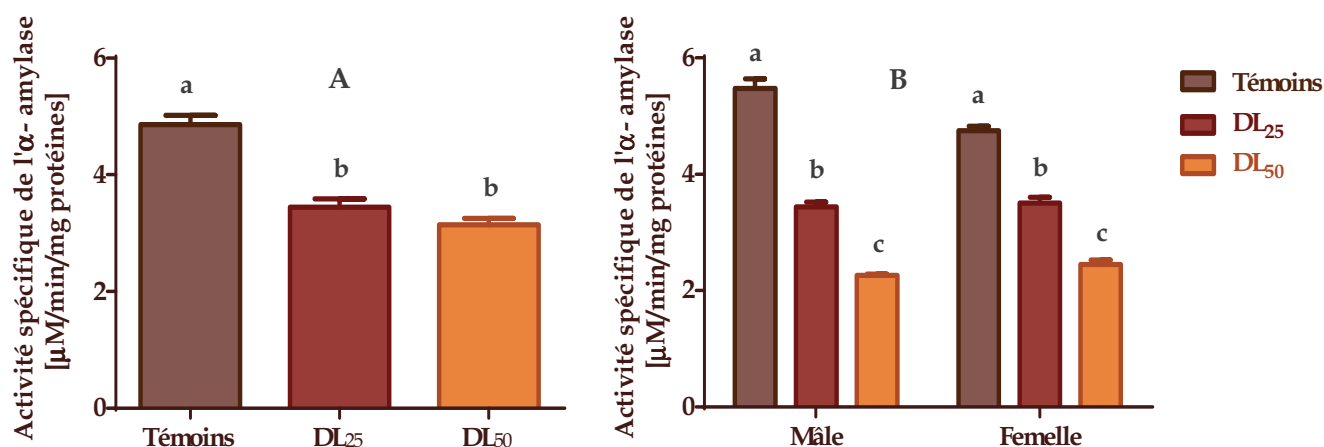


Figure 25. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de l' α -amylase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves (A) et les adultes mâles et femelles (B). ($m \pm SEM$, $n= 6$ répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités.



2- Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique de chitinase

L'activité chitinase a été déterminée à partir d'une courbe standard utilisant différentes concentrations de N-acetylglucosamine (Fig. 26).

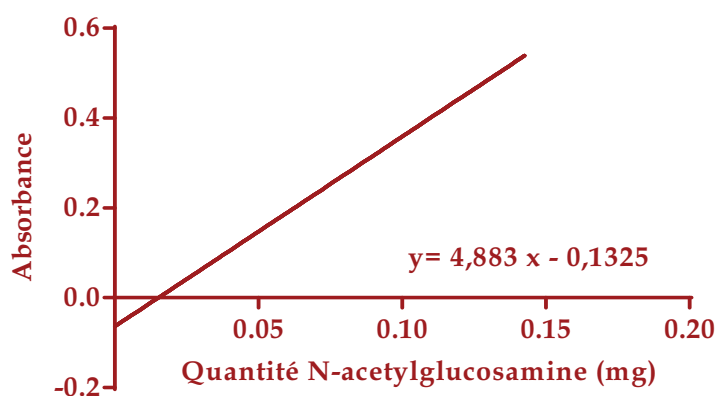


Figure 26. Dosage de chitinase : Courbe standard exprimant les absorbances à 540 nm en fonctions des concentrations en N-acetylglucosamine (mg). $R^2 = 99\%$.

Les activités spécifiques de chitinase (mM/min/mg de protéines) chez les larves L3 (24 h après traitement) et les adultes (72 h après l'émergence) de *D. melanogaster*, témoins et traités par application topique à l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) sont représentées sur la figures 27.

Chez les larves l'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet hautement significatif ($p < 0,001$) du traitement (Tableau 16). Chez les larves témoins, l'activité spécifique de chitinase est de $0,64 \pm 0,009$ mM/min/mg de protéine. Chez les séries traitées les valeurs enregistrées sont de $0,51 \pm 0,005$ et $0,44 \pm 0,006$ mM/min/mg de protéine respectivement pour la DL₂₅ et la DL₅₀ avec un effet dose dépendant ($p < 0,05$) (Fig. 27 A).

L'analyse de la variance à deux critères de classification réalisée sur l'activité spécifique de chitinase chez les adultes mâles et femelles des séries témoins et traitées à l'azadirachtine (DL₂₅ et DL₅₀), révèle un effet traitement hautement significatif ($p < 0,001$), un effet sexe hautement significative ($p < 0,001$), et une interaction traitement/sexe très significative ($p < 0,005$) (Tableau 17).



Les valeurs de l'activité spécifique de chitinase chez les mâles et les femelles des séries témoins sont respectivement de $0,44 \pm 0,01$ mM/min/mg de protéine et $0,54 \pm 0,012$ mM/min/mg de protéine. Chez les séries traitées à la DL₂₅ les valeurs obtenues sont de $0,42 \pm 0,009$ mM/min/mg de protéine pour les mâles et $0,43 \pm 0,012$ mM/min/mg de protéine pour les femelles. Pour la dose la plus élevée (DL₅₀), les valeurs sont de $0,37 \pm 0,005$ mM/min/mg de protéine chez les mâles et de $0,42 \pm 0,010$ mM/min/mg de protéine chez les femelles.

La comparaison entre les séries témoins et traitées (DL₂₅, DL₅₀) révèle que l'azadirachtine réduit d'une manière significative l'activité spécifique de chitinase chez les adultes mâles et femelles sans effet dose dépendant (Fig. 27 B).

Tableau 16. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de chitinases chez les larves L3. ($m \pm SEM$, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,128	2	0,064	202,4	0,001***
Erreur résiduelle	0,004	15	0,0003		
Total	0,133	17			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 17. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de chitinases chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,058	2	0,029	48,81	0,001***
Sexe	0,026	1	0,026	44,94	0,001***
Interaction	0,010	2	0,0051	8,678	0,0011**
Erreur résiduelle	0,017	30	0,00059		

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

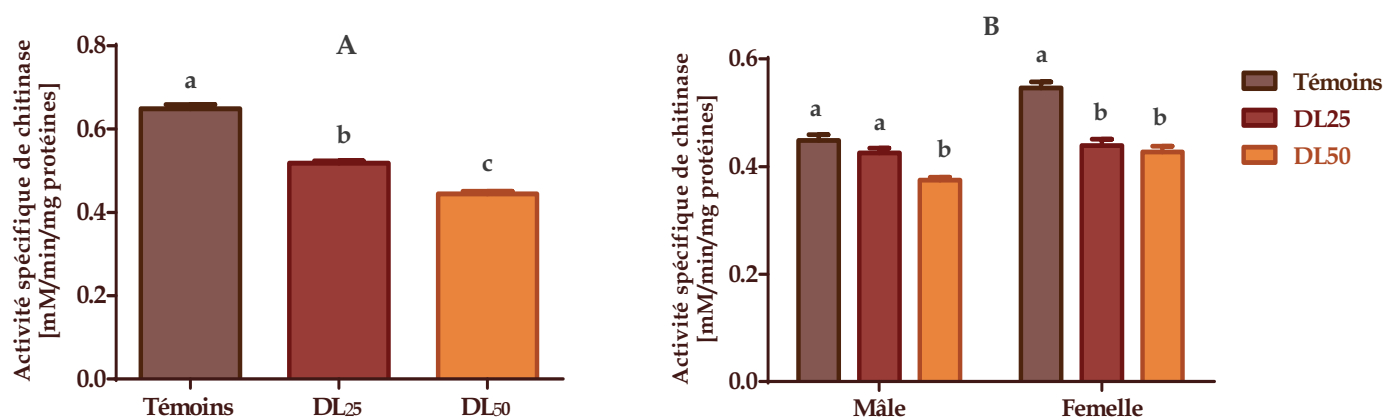


Figure 27. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activités spécifiques de chitinases ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves (A) et les adultes mâles et femelles (B). (m ± SEM, n= 6 répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités.



3- Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique de lipase

L'activité lipase a été déterminée à partir d'une courbe standard utilisant différentes concentrations de *p*-Nitrophenol (Fig. 28).

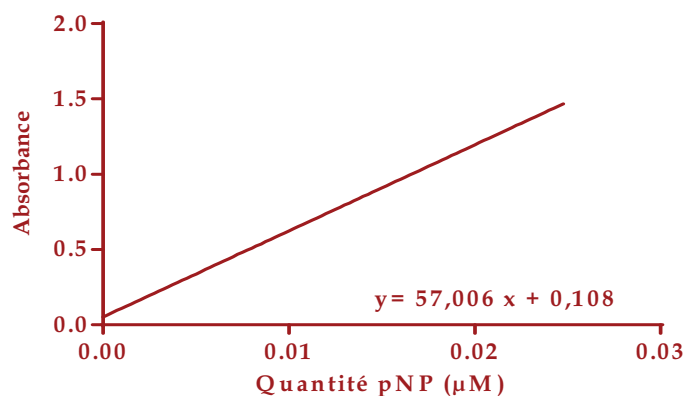


Figure 28. Dosage de lipase : Courbe standard exprimant les absorbances à 405 nm en fonctions des concentrations en *p*-Nitrophenol (µM). $R^2 = 99\%$.

Les activités spécifiques de lipase (µM/min/mg de protéines) chez les larves L3 (24 h après traitement) et les adultes (72 h après l'émergence) de *D. melanogaster*, témoins et traités par application topique à l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) sont représentées sur la figure 29.

Chez les larves l'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet hautement significatif ($p < 0,001$) du traitement (Tableau 18). Chez les larves témoins, l'activité spécifique de lipase est de $0,18 \pm 0,002$ µM/min/mg de protéine. Chez les séries traitées les valeurs enregistrées sont de $0,25 \pm 0,007$ et $0,27 \pm 0,004$ µM/min/mg de protéine respectivement pour la DL₂₅ et la DL₅₀. Par ailleurs, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est observée entre les deux doses testés (Fig. 29 A).

L'analyse de la variance à deux critères de classification réalisée sur l'activité spécifique de lipase chez les adultes mâles et femelles des séries témoins et traitées à l'azadirachtine (DL₂₅ et DL₅₀), révèle un effet traitement hautement significatif



($p < 0,001$), un effet sexe hautement significative ($p < 0,001$), et une interaction traitement/sexe significative ($p < 0,05$) (Tableau 19).

Les valeurs de l'activité spécifique de lipase chez les mâles et les femelles des séries témoins sont respectivement de $0,054 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine et $0,063 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine. Chez les séries traitées à la DL_{25} les valeurs obtenues sont de $0,060 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine pour les mâles et $0,077 \pm 0,004 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine pour les femelles. Pour la dose la plus élevée (DL_{50}), les valeurs sont de $0,071 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine chez les mâles et de $0,101 \pm 0,005 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine chez les femelles.

La comparaison entre les séries témoins et traitées (DL_{25} , DL_{50}) révèle que l'azadirachtine augmente d'une manière significative l'activité spécifique de lipase chez les adultes mâles et femelles avec un effet dose dépendant chez les femelles (Fig. 29 B).

Tableau 18. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de lipases chez les larves L3. ($m \pm \text{SEM}$, $n= 6$ répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,028	2	0,014	80,90	0,001***
Erreur résiduelle	0,002	15	0,0001		
Total	0,031	17			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 19. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de lipases chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	Ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,0046	2	0,0023	34,09	0,001***
Sexe	0,0036	1	0,0030	44,27	0,001***
Interaction	0,00064	2	0,00032	4,72	0,0165*
Erreur résiduelle	0,0020	30	6,812e-005		

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

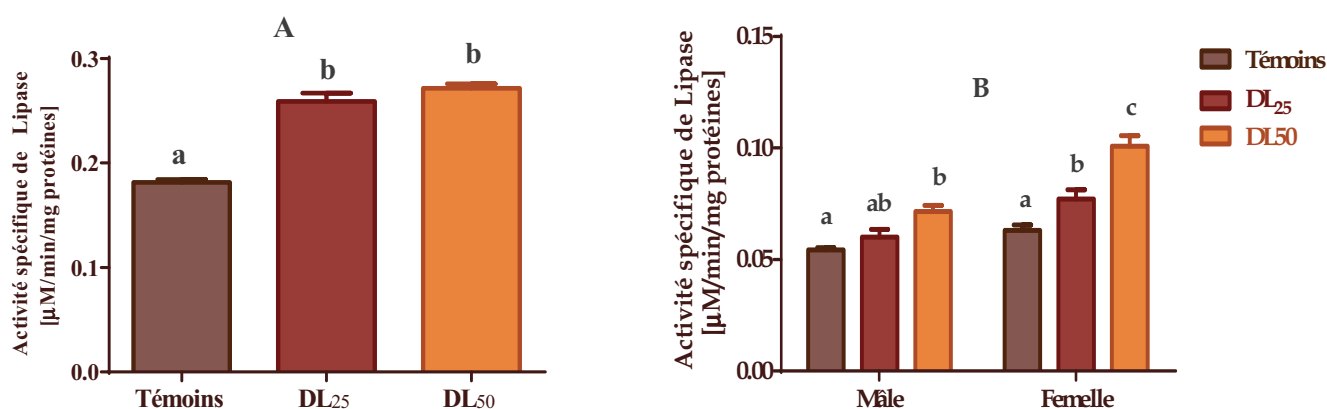


Figure 29. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activités spécifiques de lipases (µM/ min/ mg de protéines) chez les larves (A) et les adultes mâles et femelles (B). (m ± SEM, n= 6 répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traitées.



4- Effets de l'azadirachtine sur l'activité spécifique des protéases

L'activité protéase a été déterminée à partir d'une courbe standard utilisant différentes concentrations de tyrosine (Fig. 30).

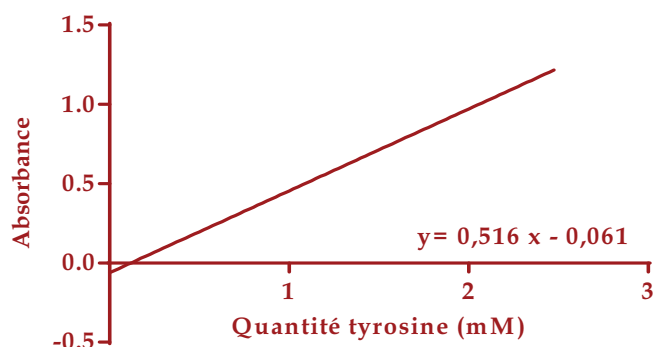


Figure 30. Dosage de protéase : Courbe standard exprimant les absorbances à 280 nm en fonction des concentrations en tyrosine (mM). $R^2 = 99\%$.

Les activités spécifiques de protéases (mM/min/mg de protéines) chez les larves L3 (24 h après traitement) et les adultes (72 h après l'émergence) de *D. melanogaster*, témoins et traités par application topique à l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}) sont représentées sur la figure 31.

Chez les larves l'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet très significatif ($p = 0,0017$) du traitement (Tableau 20). Chez les larves témoins, l'activité spécifique des protéases est de $0,80 \pm 0,034$ mM/min/mg de protéine. Chez les séries traitées les valeurs enregistrées sont de $0,59 \pm 0,044$ et $0,57 \pm 0,038$ mM/min/mg de protéine respectivement pour la DL_{25} et la DL_{50} avec un effet dose dépendant ($p < 0,05$) (Fig. 31 A).

L'analyse de la variance à deux critères de classification réalisée sur l'activité spécifique des protéases chez les adultes mâles et femelles des séries témoins et traitées à l'azadirachtine (DL_{25} et DL_{50}), révèle un effet traitement hautement significatif ($p < 0,001$), un effet sexe non significatif ($p > 0,05$), et une interaction traitement/sexe non significative ($p > 0,05$) (Tableau 21).

Les valeurs de l'activité spécifique des protéases chez les mâles et les femelles des séries témoins sont respectivement de $0,78 \pm 0,014$ mM/min/mg de protéine et $0,75 \pm 0,012$ μ M/min/mg de protéine. Chez les séries traitées à la DL_{25} les valeurs



obtenues sont de $0,56 \pm 0,022$ mM/min/mg de protéine pour les mâles et $0,56 \pm 0,011$ mM/min/mg de protéine pour les femelles. Pour la dose la plus élevée (DL_{50}), les valeurs sont de $0,41 \pm 0,021$ mM/min/mg de protéine chez les mâles et de $0,45 \pm 0,017$ mM/min/mg de protéine chez les femelles.

La comparaison entre les séries témoins et traitées (DL_{25} , DL_{50}) révèle que l'azadirachtine réduit d'une manière significative l'activité spécifique des protéases chez les adultes mâles et femelles avec un effet dose dépendant ($p < 0,05$) (Fig. 31 B).

Tableau 20. Effets de l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique de protéases chez les larves L3. ($m \pm SEM$, $n=6$ répétitions) : Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,18	2	0,093	10,08	0,0017**
Erreur résiduelle	0,13	15	0,009		
Total	0,32	17			

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.



Tableau 21. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activité spécifique des protéases chez les adultes mâles et femelles. (m ± SEM, n= 6 répétitions) : Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,700	2	0,35	212,7	0,001***
Sexe	2,778e-006	1	2,778e-006	0,0016	0,96
Interaction	0,0077	2	0,0038	2,34	0,11
Erreur résiduelle	3,05	30	0,0016		

*** différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts; ddl: degré de liberté ; CM: carré moyen; Fobs: F observé; p: niveau de signification.

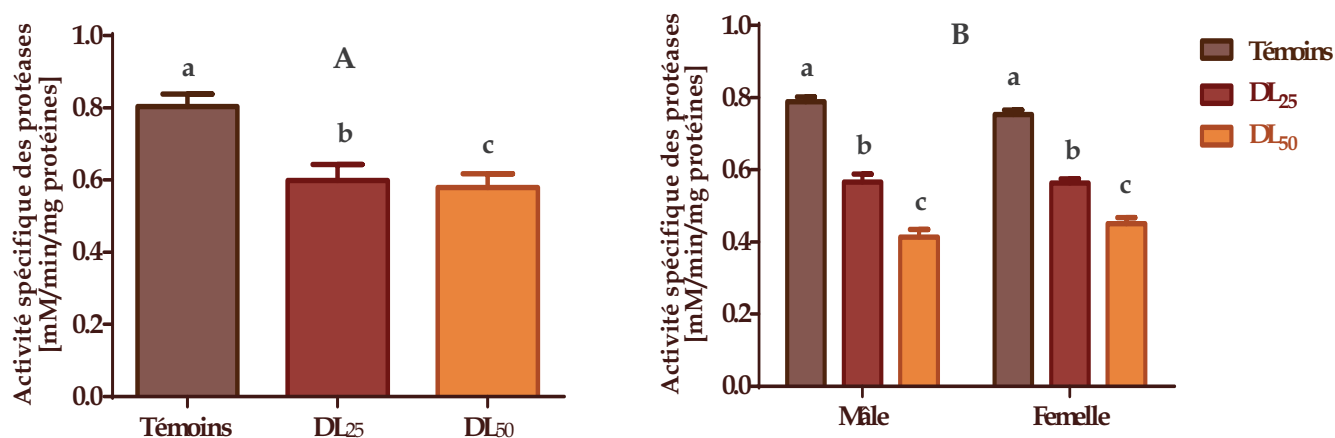


Figure 31. Effets de l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀), administré par application topique aux larves du début de stade L3 de *D. melanogaster* sur l'activités spécifiques des protéases ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves (A) et les adultes mâles et femelles (B). (m ± SEM, n= 6 répétitions de 10 individus chacune). Les lettres en minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et traités.

DISCUSSION



IV. DISCUSSION

IV.1. Toxicité de l'azadirachtine à l'égard de *D. melanogaster* et effets sur le développement

La toxicité de l'azadirachtine, largement rapportée dans la bibliographie, varie en fonction de l'ordre de l'insecte, du stade de développement, du mode d'application (Ingestion, Topique) mais aussi, de la concentration utilisée (Tomé *et al.*, 2013; Abedi *et al.*, 2014; Koodalingam *et al.*, 2014). Dans la présente étude, une formulation commerciale d'azadirachtine, le Neem Azal, a été testée par application topique sur les larves L3 du début de stade de *D. melanogaster*. Les résultats montrent une augmentation des pourcentages de mortalité des stades immatures avec une relation dose-réponse. La transition larve-pupe est affectée par le traitement et le stade pupal semble être le stade le plus sensible conduisant à une inhibition de la mue adulte.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'Anjum *et al.* (2010), qui révèlent une sensibilité plus importante, à l'azadirachtine, du stade pupal de *D. melanogaster* par rapport au stade larvaire. Des résultats similaires ont été rapportés par Gunasekaran *et al.* (2009) chez les moustiques *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi*, traités au Neem-Azal, avec des taux de mortalité plus élevés chez les pupes comparativement aux larves du quatrième stade. Récemment, Boulahbel *et al.* (2015a) ont démontré que le Neem-Azal administré par application topique chez des pupes nouvellement exuviées de *D. melanogaster* induit une inhibition de la mue adulte.

En effet, la réduction des pourcentages de pupaison et d'émergence sous l'effet de l'azadirachtine a été rapportée chez différents insectes tels que *Aphis glycines* (Kraiss *et al.*, 2008), *P. interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012; Rharrabe *et al.*, 2008), *A. aegypti* (Koodalingam *et al.*, 2014), *Helicoverpa armigera* (Ahmad *et al.*, 2015) affectant ainsi leur cycle vie.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'azadirachtine induit des altérations morphogénétiques de l'insecte conduisant à une inhibition de l'émergence des adultes. En effet, chez les insectes holométaboles, le stade pupal



subit un remodelage drastique des tissus et des organes et représente donc une phase critique pour la formation des adultes (Ureña *et al.*, 2014).

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

Chez les insectes, la biosynthèse et la sécrétion des ecdystéroïdes sont assurées par les glandes prothoraciques, au cours des stades post-embryonnaires, sous l'effet d'une neurohormone prothoracicotrope (PPTH) (Gäde & Hoffmann, 2005). L'ecdysone, libéré dans l'hémolymphe, est rapidement converti en 20-hydroxyecdysone (20E) dans les différents organes périphériques (Marchal *et al.*, 2010). La 20E contrôle l'embryogénèse mais aussi le développement post-embryonnaire en initiant les différentes mues, et ce en agissant sur l'expression de gènes spécifiques *via* sa liaison aux récepteurs nucléaires des ecdystéroïdes (EcR) (Kozlova & Thummel, 2003). Chez la *Drosophila*, des pics de sécrétion de la 20E sont observés après 12 h du début de l'embryogénèse, avant chaque mue larvaire, avant le passage au stade pupal et durant la phase terminale de la différenciation des structures adultes (Fig. 32). La PPTH est exprimée au cours du troisième stade larvaire de manière cyclique toutes les 8 h; avec un pic important environ 12 h avant la fin du 3^{ème} stade larvaire qui déclenche la formation du puparium et le début de la phase prépupal. Douze heures plus tard, un pic d'hormone plus modeste met fin au stade prépupal et déclenche la pupaison. Le stade pupal se caractérise par le pic d'hormone le plus important, corrélé au développement des structures adultes (Quinn *et al.*, 2012).

Les corps allates (*corpora allatum*) sont à l'origine de la biosynthèse de l'hormone juvénile (HJ) dont la sécrétion est régulée par des neuropeptides activateurs, allatotropines ou inhibiteurs, allatostatines (Bellés & Maestro, 2005). L'HJ libérée dans l'hémolymphe est transportée vers les tissus cibles grâce à des protéines vectrices (JH-binding proteins) qui la protègent contre les actions des hydrolases



(Cassier *et al.*, 1997). L'hormone juvénile joue un rôle important dans le développement où elle maintient les caractères larvaires et inhibe la métamorphose (Cassier *et al.*, 1997). Chez la drosophile, les taux d'HJ sont élevés au cours des premiers stades de développement, décroissent au dernier stade larvaire pour atteindre des quantités infimes lors du stade pupal; les taux d'HJ enregistrent un pic à l'émergence adulte nécessaire au démarrage de la vitellogenèse (Koslova & Thummel, 2000; Dubrovsky, 2005) (Fig. 32).

Selon le dogme classique de l'endocrinologie des insectes, l'équilibre entre ces deux hormones définit la transition de chaque phase du développement (Dubrovsky, 2005). En effet, les différentes mues sont initiées par la 20E ; tandis que la nature de la mue est déterminée par les taux d'HJ: des taux élevés d'HJ sont nécessaires au cours des mues larvaires; la métamorphose a lieu aux taux bas d'HJ observés en fin de dernier stade larvaire (Dubrovsky, 2005). Il est donc admis que toute interférence dans l'homéostasie de ces deux hormones, avec des sources exogènes d'hormones ou avec des agonistes ou antagonistes, peut conduire à une perturbation du développement de l'insecte (Dhadialla *et al.*, 2005; 2010; Smaghe *et al.*, 2012).

Nos résultats révèlent que l'azadirachtine (DL_{25} et DL_{50}), induit également diverses aberrations morphologiques tels que l'hyperpigmentation des larves, la formation d'intermédiaires larve-pupe et pupa-adulte ainsi qu'une malformation des adultes (ailes malformées ou absentes). Des effets similaires ont été rapportés chez *S. litura*, *Spodoptera mauritia*, *Ephestia kuehniella* Zell, *Manduca sexta* et *Pericallia ricini* (Gujar & Mehrotra, 1983; Jagannadh & Nair, 1992; Martinez *et al.*, 2001; Gnanamani & Dhanasekaran, 2013) et *Papilio demoleus* (Pandey *et al.*, 2011) après traitement des larves du dernier stade avec différentes formulations commerciales d'azadirachtine.

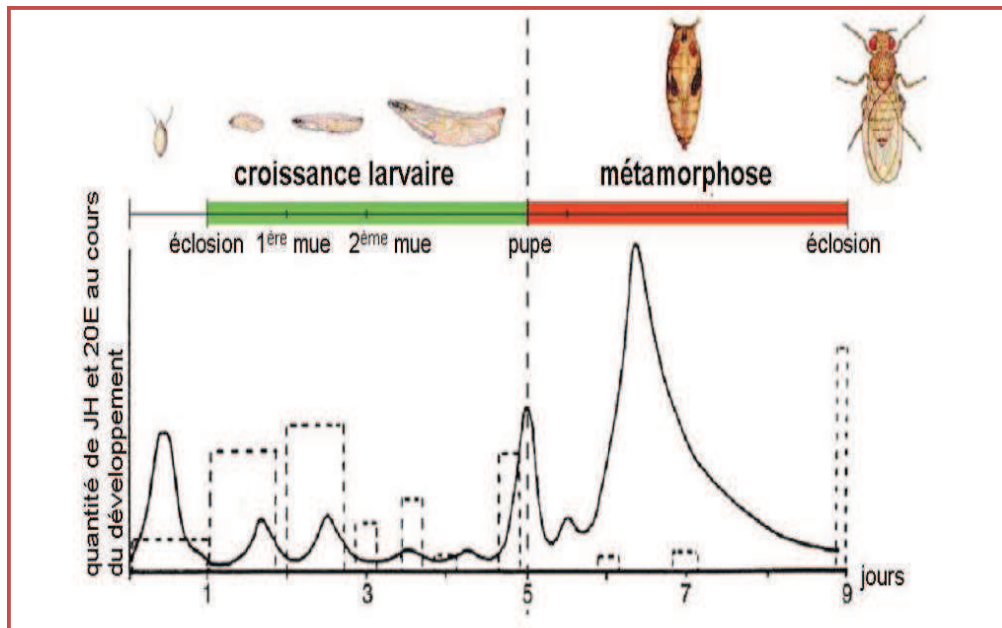


Figure 32. Variation des taux de 20-hydroxyecdysone (20E) et d'hormone juvénile (HJ) durant le développement de *D. melanogaster*. 20E: ligne pleine, JH: ligne en pointillé (D'après Dubrovsky, 2005).

Les différents effets observés après traitement des larves L3 de *D. melanogaster* à l'azadirachtine peuvent être attribués à son effet perturbateur de croissance des insectes (IGDs) *via* une perturbation de l'équilibre hormonal (20E, HJ) (Mordue *et al.*, 2010). En effet, ce composé est connu pour induire une dégénérescence des noyaux cellulaires dans les différentes glandes endocrines (glandes prothoraciques, *copora allatum* et *copora cardiacum*), responsables du contrôle des processus de mues et de métamorphoses chez les insectes, ce qui pourrait contribuer à une généralisation de la perturbation des fonctions neuroendocrines (Mordue *et al.*, 2010). De plus, différentes études ont rapporté une inhibition de la synthèse des ecdystéroïdes sous l'effet de l'azadirachtine (Min-Li & Shin-Foon, 1987; Feder *et al.*, 1988). Cette inhibition de la synthèse et de la libération des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques peut être le résultat d'une action spécifique de l'azadirachtine sur la libération de l'hormone prothoracicotrope (PTTH) (Mordue *et al.*, 2005).



L'azadirachtine peut également affecter directement la production de l'enzyme responsable de la conversion de l'ecdysone (E) en 20E au niveau du corps gras et de l'intestin moyen (Mordue *et al.*, 2005).

En effet, ce sont les modifications des taux d'ecdystéroïdes hémolymphatiques sous l'effet de l'azadirachtine qui contribuent en large partie à son effet IGDs. La réduction des taux d'HJ, probablement liée à une altération de la sécrétion des neuropeptides (allatostatine et allatotropine) responsables de la synthèse et de la libération de l'HJ, a également été rapportée (Mordue *et al.*, 2010). De plus, la synthèse de pigment est également influencée par l'HJ, les ecdystéroïdes et différentes neurohormones (Raabe, 1989). L'action antimétabolique de l'azadirachtine peut également affecter la formation de nouveaux organes adultes au cours de la métamorphose de *D. melanogaster* (Anuradha *et al.*, 2007). Ceci, pourrait expliquer certaines aberrations morphologiques notées au cours de nos résultats tels que la malformation des ailes.

Les résultats obtenus au cours de notre étude, révèlent que l'azadirachtine (DL₂₅, DL₅₀) appliqué aux larves du début du stade L3 réduit de manière significative la survie des adultes de *D. melanogaster*. Des études similaires ont rapporté l'action négative de l'azadirachtine sur le développement et la survie de différentes espèces d'insectes (Hossain & Poehling, 2006; Das *et al.*, 2006; Hasan & Ansari, 2011; Ahmad *et al.*, 2012; Tomé *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2015). L'insecticide prolonge également la durée de développement des stades larvaire (L3) et pupal, comparativement aux témoins, provoquant ainsi un retard considérable dans les transitions larve-pupe et pupa-adulte. Le prolongement de la durée des stades larvaire et pupal a été également rapporté chez *Culex pipiens* traité à l'azadirachtine (Alouani *et al.*, 2009). Un retard dans la formation du puparium a été rapporté par Lai *et al.* (2014) après traitement des larves du troisième stade de *D. melanogaster* à l'azadirachtine. Ce retard serait corrélé à une modification de l'expression des gènes contrôlant la régulation hormonale (Lai *et al.*, 2014) ce qui pourrait expliquer les différentes perturbations du développement observées au cours de nos expérimentations. De plus, Qiao *et al.* (2014) ont également rapporté, chez *D. melanogaster*, une action neurotoxique de l'azadirachtine qui pourrait éventuellement interférer avec divers processus endocrinologiques et physiologiques de l'insecte.



IV.2. Effets de l'azadirachtine sur le choix du site d'oviposition et la fécondité de *D. melanogaster*

Le choix d'un site d'oviposition favorable représente une décision clé pour la ponte des insectes. En effet, la survie de la future génération dépend directement de cette décision; principalement chez les espèces qui se nourrissent sur ce site d'oviposition comme c'est le cas pour *D. melanogaster*. Chez cette espèce, la préférence d'oviposition des femelles peut être influencée par différents facteurs tels que la température, la texture ou encore la couleur du substrat (Fogleman, 1979; Takamura & Fuyama, 1980; Battesti *et al.*, 2014) impliquant donc les différents systèmes sensoriels : visuel, olfactif et gustatif (Renwick & Chew, 1994). De plus, si le choix du site de ponte par une femelle peut influencer le comportement et la "fitness" de sa progéniture, ce choix peut être, à son tour, influencé par l'expérience individuelle de cette femelle (Abed-Vieillard *et al.*, 2014; Flaven-Pouchon *et al.*, 2014; Abed-Vieillard & Cortot, 2016).

La capacité de l'insecte à détecter et à fuir un site défavorable semble être sous l'effet de la sélection naturelle et a fait l'objet de nombreux travaux notamment dans les études du choix du site d'oviposition (Thomson & Pellmyr, 1991; Bernays & Chapman, 1994). Cependant, l'impact de l'expérience pré-imaginale sur le comportement et la prise de décision chez les adultes, traduisant une conservation des informations et un transfert de la mémoire d'un stade à l'autre, a également été rapporté (Jaenike, 1983; Duckas, 2008).

Cette possibilité de conditionnement pré-imaginal évoquée pour la première fois par Hopkins (1917) pour ces travaux sur le principe de la sélection d'hôte n'a cessé de gagner en popularité. Cependant, vu l'importante réorganisation du système nerveux, chez les insectes holométaboles au cours de la métamorphose, il était difficilement concevable que des informations mémorisées à l'état larvaire puissent persister à l'état adulte. Chez *D. melanogaster*, tous les organes sensoriels utilisés par la larve au cours de son développement sont complètement histolysés pendant la métamorphose. Les futurs organes sensoriels de l'adulte sont formés *de novo* (Carlson, 1991). De plus, à l'intérieur du cerveau de la drosophile, les corps pédonculés (principaux organes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire) sont quasi-entièrement transformés entre la phase larvaire et la phase adulte (Technau &



Heisenberg, 1982). Ce n'est qu'en 1994 que Tully *et al.* (1994) ont pu prouver cette capacité de conservation des informations entre les deux stades grâce à leurs expériences de conditionnement de type pavlovien associant un choc électrique à l'odeur de l'acétate chez *D. melanogaster*.

Nos résultats révèlent que l'exposition des larves L3 du début de stade de *D. melanogaster* à l'azadirachtine (DL_{25} , DL_{50}) influence le choix du site d'oviposition des femelles survivantes au traitement. Une préférence claire d'oviposition sur un milieu non traité par rapport à un milieu traité a été notée au cours de nos différentes expériences. L'impact de l'azadirachtine sur l'oviposition a été rapporté par Riba *et al.* (2003) chez *Nezara viridula* traitée à l'azadirachtine pur. De plus, l'évitement de l'azadirachtine grâce à sa détection sur une surface traitée, a également été rapporté chez de nombreuses espèces d'insectes (Blaney *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 2000; Charleston *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2010 ; Hasan & Ansari, 2011; Tomé *et al.*, 2013).

Nos résultats révèlent également que l'aversion à l'azadirachtine semble être plus importante chez les insectes ayant été préalablement exposés à l'insecticide (stade L3), en comparaison aux femelles naïves, suggérant une mémorabilité de l'aversion à cette molécule. Ceci pourrait être utilisé dans les programmes de lutte pour renforcer l'activité insecticide de l'azadirachtine.

Différentes études récentes, appuient nos résultats et rapportent l'impact de l'expérience pré-imaginale sur le comportement et la prise de décision chez les adultes traduisant cette capacité de conservation de la mémoire de l'apprentissage à travers les stades de développement (Duckas, 2008; Blackiston *et al.*, 2008; Gerber *et al.*, 2009; Flaven-Pouchon *et al.*, 2014; Abed-Vieillard & Cortot, 2016).

De plus, selon Krause Pharm & Ray (2015) l'aversion olfactive semble être conservée chez les différentes espèces de drosophiles, ce qui permettra de généraliser l'action de l'azadirachtine à d'autres espèces nuisibles de drosophiles telles que *Drosophila suzukii*.

Aujourd'hui encore la compréhension de la biologie de la mémoire reste l'une des grandes quêtes des neurosciences et nécessite de plus ample investigations. Toutefois, chez *D. melanogaster* et malgré un remaniement drastique du système chimiosensoriel périphérique et central lors de la métamorphose, certaines structures



centrales, comme le lobe gamma des corps pédonculés (Fig. 33), sont relativement conservées de la larve à l'adulte (Armstrong *et al.*, 1998). Les corps pédonculés étant impliqués dans les processus de mémorisation et d'apprentissage chez la drosophile (Heisenberg, 2003; Campbell *et al.*, 2010), il est donc possible que leur conservation partielle lors de la métamorphose permet la persistance des apprentissages larvaires chez l'adulte.

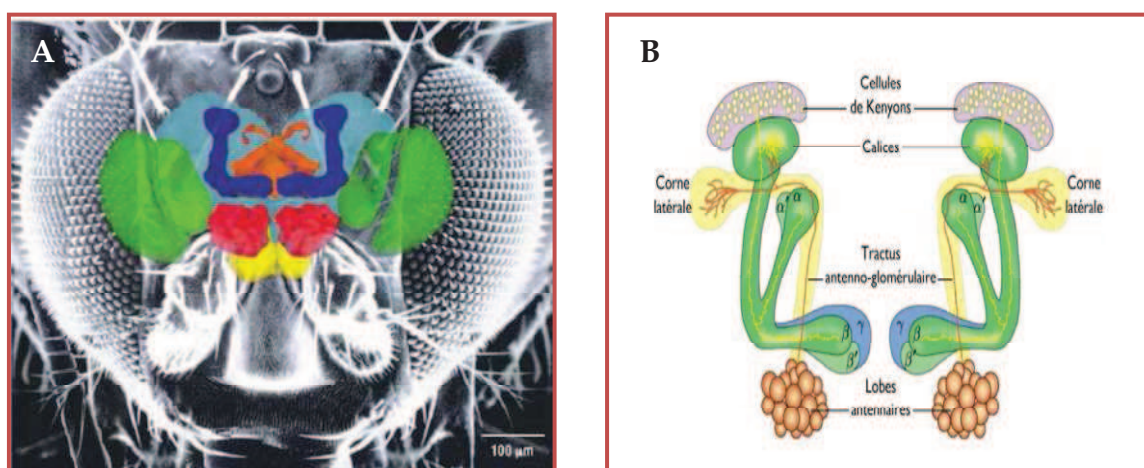


Figure 33. (A) : Schéma du cerveau de la drosophile: En vert, les lobes optiques ; en jaune, les ganglions sou-oesophagiens ; en rouge, les lobes antennaires ; en bleu, les corps pédonculés ; en orange, le complexe central ; en turquoise, le reste du neuropile entourant les corps pédonculés et le complexe central. (B) : Schéma des corps pédonculés et des lobes antennaires, en bleu les lobes gamma. (Le Glou, 2012).

Les effets de l'azadirachtine sur les différents paramètres reproducteurs ont été rapportés chez plusieurs espèces d'insectes (Riba *et al.*, 2003; Pineda *et al.*, 2009; Tomé *et al.*, 2013; Bhardwaj & Ansari, 2015). Nos résultats montrent que l'azadirachtine affecte la fécondité des femelles, survivantes au traitement préalable des larves L3 en réduisant de manière significative le nombre d'œufs pondus, et ce comparativement aux témoins. Ces effets peuvent être liés à l'interférence de l'azadirachtine avec la synthèse et/ou l'incorporation des vitellogénines affectant ainsi le développement de l'ovocyte. En effet, une diminution dans le contenu en protéines ovariennes suggérant une inhibition dans la synthèse des vitellogénines et/ou de leurs captation par l'ovocyte a été rapportée chez *Spodoptera exempta* (Tanzubil & McCaffery, 1990) et *D. melanogaster* (Boulahbel *et al.*, 2015a).



Chez *D. melanogaster*, la vitellogenèse est sous le contrôle principal de la 20E mais aussi de l'HJ, (Wang *et al.*, 2004; Bellés & Maestro, 2005; Swevers *et al.*, 2005); en outre, l'interaction entre ces deux hormones est essentielle dans la reproduction de cette espèce (Gäde *et al.*, 1997; Gruntenko & Rauschenbach, 2009). L'effet perturbateur de l'azadirachtine sur la vitellogenèse peut être expliqué par la perturbation des taux d'HJ et des ecdystéroïdes ovariens (Mordue *et al.*, 2010). En effet, l'azadirachtine est connu pour son effet antagoniste de ces deux hormones (Stark *et al.*, 1990; Stark *et al.*, 1992; Mordue *et al.*, 2005).

L'azadirachtine altère également le cytosquelette en prévenant la formation de nouveaux filaments d'actine conduisant à une perturbation de la division cellulaire et à un blocage des processus de transport. Ce phénomène pourrait interférer avec le passage des nutriments des cellules nourricières vers l'ovocyte (Mordue *et al.*, 2010). Selon Anuradha *et al.* (2007), l'azadirachtine induit chez *D. melanogaster*, une dépolymérisation de l'actine conduisant à l'arrêt de l'activité cellulaire et à l'apoptose.

IV.3. Effets de l'azadirachtine sur la digestion

L'azadirachtine administré par application topique sur les larves L3 du début de stade, a été évalué sur plusieurs paramètres: la croissance pondérale, la quantité de nourriture ingérée et l'activité de quatre enzymes digestives (α -amylase, chitinase, lipase, protéase).

Nos résultats révèlent que l'azadirachtine réduit d'une manière significative le poids corporel chez les larves, les pupes et les adultes de *D. melanogaster*. L'effet anti-appétant de l'azadirachtine (Koul & Wahab, 2004) pourrait être à l'origine de cette perte de poids. En effet, une réduction de la quantité de nourriture ingérée chez les larves et les adultes (ayant survécu au traitement préalable des larves) traités à l'azadirachtine a été enregistrée au cours de nos expérimentations et ce comparativement aux témoins. Les insectes traités mangent donc moins de nourriture que les témoins, ce qui pourrait expliquer la diminution de leurs poids.

La croissance et la prise alimentaire sont deux processus intimement liés dans le développement de l'insecte. En effet, la croissance et le poids corporel sont directement affectés par la prise de nourriture et régulés par la voie de signalisation



de l'insuline *via* l'insuline-like growth factor (Tennesen & Thummel, 2011). Selon Lai *et al.* (2014) l'inhibition de la croissance et du développement chez *D. melanogaster* sous l'effet de l'azadirachtine semble être conforme à celle causé par la perturbation des voies de signalisation insuline/insuline -like growth factor.

Des résultats similaires ont été rapportés chez *H. armigera* (Abedi *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2015) et *Periplaneta americana* (Paranagama *et al.*, 2001) traitées avec différentes formulations commerciales d'azadirachtine. Récemment, Boulehbel *et al.* (2015b) ont rapporté une diminution dans le poids des pupes de *D. melanogaster* après application topique de l'azadirachtine au début du stade pupal (stade qui ne s'alimente pas). Ces résultats appuient les travaux de TaiJun *et al.* (2009) qui stipulent que l'inhibition de la croissance chez *D. melanogaster* peut également être liée à une induction de l'apoptose causée par l'azadirachtine.

La croissance des insectes dépend non seulement d'une prise d'une quantité adéquate de nutriments mais aussi d'une bonne assimilation et de conversion de ces aliments en énergie et en biomasse (Reese, 1978). De nombreux travaux ont rapporté une réduction de la quantité de nourriture ingérée chez de nombreuses espèces d'insectes traitées à l'azadirachtine (Mordue & Blackwell, 1993; Guerrini, 2000; Shannag *et al.*, 2015). Cet effet anti-appétant considéré comme un effet primaire de l'azadirachtine est probablement lié à une action directe du bioinsecticide sur les centres contrôlant l'alimentation et le métabolisme chez l'insecte (Barnby & Klocke, 1987). L'azadirachtine stimule les cellules chémoréceptrices, responsables du comportement d'aversion, au niveau des pièces buccales de l'insecte et bloque les sites des récepteurs glucidiques responsables de la stimulation de l'alimentation (Mordue *et al.*, 1999; Zapata *et al.*, 2009) conduisant ainsi à une inhibition de l'alimentation (Koul & Wahab, 2004).

Un effet anti-appétant secondaire lié à l'action de l'azadirachtine sur la physiologie de la digestion (par exemple : mouvement de la nourriture dans l'intestin, inhibition de l'activité des enzymes digestives, effet sur le système nerveux stomatogastrique) a également été rapporté et inclut un effet à plus long terme sur la réduction de la consommation de la nourriture (Koul & Isman, 1991 ; Timmins & Reynolds, 1992 ; Trumm & Dorn, 2000). En effet, une ingestion d'azadirachtine pendant 2h au cours du deuxième stade larvaire de *Spodoptera eridania* réduirait la



quantité de nourriture ingérée au cours de l'ensemble du développement larvaire de cette espèce (Shannag *et al.*, 2015). Cette réduction de consommation de la nourriture, à plus long terme, après une courte période d'exposition à l'azadirachtine a également été rapportée chez différentes espèces d'insectes (Hussein, 2000; Mordue, 2004; Khosravi *et al.*, 2010; Khosravi & Sendi, 2013).

L'intestin des insectes est différencié en trois régions incluant l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur (Fig. 34). Parmi ces trois régions, l'intestin moyen a été le plus étudié puisqu'il est le siège de la synthèse et de la sécrétion des enzymes digestives, mais aussi, un site de digestion et d'absorption des nutriments (Shanbhage & Tripathi, 2009; Lemaitre & Miguel-Aliaga, 2013). L'intestin moyen est également affecté par différents types de substances toxiques conduisant à une perturbation de la croissance et du développement des insectes par le biais de changements des événements physiologiques associés à la prise de nourriture, l'absorption et la transformation des nutriments (Mordue & Blackwell, 1993). Une membrane péritrophique, essentiellement composée de chitine, est positionnée entre la lumière intestinale et l'épithélium intestinal, pour protéger l'épithélium contre les différents dommages mécaniques ou toxiques (Lemaitre & Miguel-Aliaga, 2013) (Fig. 34).

Dans l'intestin, les enzymes digestives hydrolysent les macromolécules alimentaires en des molécules plus petites facilitant ainsi leur absorption. Les protéines, l'amidon et les triglycérides constituent la majorité des macromolécules alimentaires et sont hydrolysés respectivement par les protéases, les amylases et les lipases. La synthèse et la sécrétion des enzymes digestives sont contrôlées durant le processus de digestion par différents mécanismes : nerveux, hormonal, paracrine et prandial (Lehane *et al.*, 1995). La digestion est également influencée par les conditions physico-chimiques de l'intestin principalement le pH (Douglas, 2013).

L'application de l'azadirachtine chez les larves L3 du début de stade de *D. melanogaster* perturbe l'activité des enzymes digestives chez les larves et les adultes et ce comparativement aux témoins.

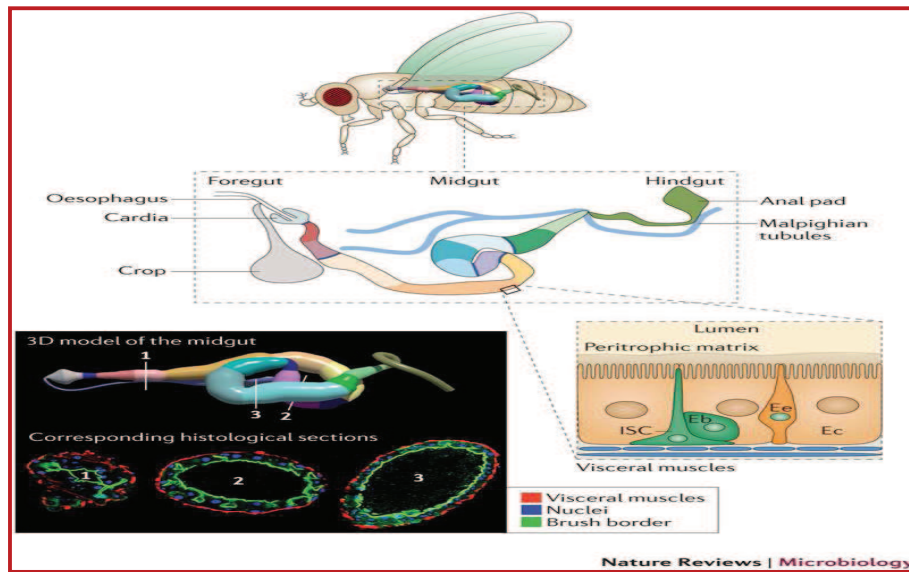


Figure 34: Schéma représentant le tube digestif de *D. melanogaster*. (D'après Buchon *et al.*, 2013).

L'azadirachtine réduit d'une manière significative l'activité α -amylase et chitinase chez les larves et les adultes mâles et femelles de *D. melanogaster*. L' α -amylase hydrolyse les liaisons α -(1-4)-D-glycosidiques des polysaccharides glucidiques tels que l'amidon et le glycogène (Terra & Ferreira, 2005). Les chitinases hydrolysent les liaisons glycosidiques des molécules de chitine, plus précisément, elles hydrolysent les liaisons β -(1-4) des résidus de N-acétyl- β -D-glucosamine (Merzendorfer & Zimoch, 2003) et interviennent dans la formation et la dégradation de la membrane périthrophique qui protège l'épithélium intestinal (Shen & Jacobs-Lorena, 1997). La réduction de l'activité amylase sous l'effet de l'azadirachtine a été rapportée chez *P. americana* (Paranagama *et al.*, 2001), *P. interpunctella* (Rharrabe *et al.*, 2008), *Glyphodes pyloalis* (Khosravi & Sendi, 2013) et *Tribolium castaneum* (Sami, 2014). Selon Lai *et al.* (2014), l'azadirachtine réprimerait l'expression des gènes codant pour l' α -amylase au niveau de l'intestin moyen de *D. melanogaster*. De plus, chez les insectes l'expression des gènes codant pour les chitinases est sous le contrôle de la 20E (Riddiford *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2013) ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus au cours de nos expérimentations, sachant que l'azadirachtine est un antagoniste de la 20E.



Les lipases jouent un rôle très important dans le stockage et la mobilisation des lipides. Ces enzymes interviennent également dans plusieurs processus physiologiques comme la reproduction, la croissance et la défense contre les agents pathogènes (Lemaitre & Miguel-Aliaga, 2013). Nos résultats montrent que l'azadirachtine augmente l'activité lipasique chez les larves et les adultes de *D. melanogaster* avec des effets plus marqués chez les femelles et ce comparativement aux témoins. Les effets de l'azadirachtine sur l'activité des lipases varient en fonction de la dose appliquée; plusieurs travaux montrent que le neem ou l'un de ces dérivés diminuent l'activité des lipases intestinales chez différentes espèces d'insectes (Senthil-Nathan *et al.*, 2006; Zibae & Bandani, 2009; Khorsravi & Sendi, 2013). L'augmentation des lipases enregistrée au cours de notre étude peut être attribuée à leur activité estérase nécessaire au processus de détoxication (Nasr *et al.*, 2015). De plus, les effets plus marqués observés chez les femelles peuvent être liés à l'augmentation des besoins en énergie nécessaires à la reproduction (Arrese & Soulages, 2010).

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Pascual-Ruiz *et al.*, 2009). Nos résultats montrent que l'azadirachtine entraîne une diminution significative dans l'activité des protéases chez les larves et les adultes de *D. melanogaster* et ce avec un effet dose-dépendant. Des résultats similaires ont été rapportés chez *P. americana* (Paranagama *et al.*, 2001) et *G. pyloalis* (Khosravi & Sendi, 2013) traitées à l'azadirachtine. Plusieurs travaux montrent également une réduction de l'activité de la trypsine chez *S. litura* (Timmins & Reynolds, 1992) et *M. sexta* (Koul *et al.*, 1996) sous l'effet de l'azadirachtine.

Bien que différents travaux ont rapporté l'interférence de l'azadirachtine sur l'activité de différentes enzymes digestives (Anuradha & Annadurai, 2008 ; Zibae & Bandani, 2009; Zibae, 2011; Roya & Sendi, 2013; Senthil-Nathan, 2013), les effets précis de cette molécule sur la digestion restent peu connus. Néanmoins, Jbilou *et al.* (2008) et Almeida *et al.* (2014) montrent que l'azadirachtine affecte les cellules épithéliales de l'intestin entraînant une perturbation de la sécrétion des enzymes digestives et de l'absorption des nutriments. De plus, l'effet anti-appétant de l'azadirachtine qui affecte la quantité et la qualité de la nourriture ingérée peut



également agir sur la régulation de l'activité des enzymes digestives (Woodring *et al.*, 2009; Clissold *et al.*, 2010). En effet, toute perturbation dans l'activité des enzymes digestives réduit l'accès aux éléments nutritifs indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. De plus, cette réduction dans la capacité d'utilisation des nutriments peut être liée à une conversion de l'énergie nécessaire à la production de la biomasse dans l'induction de l'activité d'enzymes nécessaire à la détoxification de l'azadirachtine (Tanzubil & McCaffery, 1990; Senthil-Nathan & Kalaivani, 2005).

La réduction dans la prise de nourriture et l'habilité à convertir les nutriments en biomasse peuvent expliquer en partie les effets observés au cours de notre étude sur le développement de l'insecte principalement l'augmentation enregistrée dans la durée de développement. En effet, les mécanismes hormonaux contrôlant le développement sont partiellement régulés par la prise de nourriture (Bernard & Lagadic, 1993).

*CONCLUSION ET
PERSPECTIVES*



V. Conclusion et perspectives

Nos expérimentations ont été menées par application topique chez les larves du début du troisième stade larvaire (L3) de *D. melanogaster* en vue d'évaluer les effets d'une formulation commerciale d'azadirachtine, le Neem-Azal sur la toxicité, le développement, l'oviposition et la digestion chez l'insecte.

Après détermination des différentes doses létales à partir d'une courbe dose-réponse, deux doses ont été utilisées pour le reste des expérimentations, une dose sub létale (DL25 : 0,28 µg) et une dose létale (DL50 = 0,67 µg).

L'azadirachtine réduit de manière significative les pourcentages de pupaisons et d'émergence des adultes et affecte la morphologie de l'insecte en induisant la formation de plusieurs aberrations phénotypiques, probablement dues à ses effets IGDs. L'insecticide prolonge également la durée de développement des stades larvaire et pupal, et réduit la survie des adultes (mâles et femelles) ayant survécu au traitement préalable des larves (L3).

L'azadirachtine affecte la fécondité des femelles en réduisant significativement le nombre d'œufs pondus. De plus, les résultats obtenus indiquent une préférence claire d'oviposition sur un milieu témoin traduisant un évitement de l'azadirachtine. Cette aversion à l'azadirachtine est plus marquée chez les femelles ayant déjà été exposées à cette molécule au stade larvaire (L3) en comparaison aux femelles "naïves". Ceci suggère une persistance mnésique de l'effet de cette exposition pré-imaginale lors de la métamorphose.

De plus, l'azadirachtine affecte également d'une manière significative la croissance pondérale des différents stades de développement de *D. melanogaster* (larves, pupes et adultes) et réduit la quantité de nourriture ingérée avec une relation dose-réponse probablement grâce à son effet anti-appétant.

Enfin, les activités spécifiques des enzymes digestives sont également perturbées sous l'effet de l'azadirachtine. Les résultats révèlent une diminution significative de l'activité de l' α -amylase, chitinase et protéase chez les larves et les adultes de *D. melanogaster*. Néanmoins, une augmentation de l'activité lipasique est enregistrée suggérant une induction des processus de détoxification.



L'exposition pré-imaginale (L3) à l'azadirachtine interfère donc avec le développement, la fécondité, la digestion ainsi que la préférence d'oviposition chez *D. melanogaster*. En plus de ces effets IGDs et anti-appétant, la capacité de l'insecte à mémoriser cette exposition précoce pourrait renforcer l'activité insecticide de l'azadirachtine et être utilisée comme une nouvelle stratégie de contrôle des insectes ravageurs dans le cadre des programmes de lutte intégrée.

A l'avenir il serait intéressant de compléter le présent travail par:

- Une évaluation des effets de l'azadirachtine sur les différentes générations successives.
- Un test de préférence alimentaire.
- Une évaluation des effets sur l'expression des gènes des différentes enzymes digestives.
- Une meilleure compréhension des processus liés à l'apprentissage *via* une exploration de l'expression des gènes et des voies de signalisations impliqués dans la mémoire.

RÉSUMÉS



Résumé

Les effets d'une formulation commerciale d'azadirachtine, le Neem-Azal, ont été évalués sur la toxicité, le développement, l'oviposition, et la digestion d'un insecte modèle, *D. melanogaster*. Différentes doses variant entre 0,1 et 2 μg ont été utilisées par application topique sur des larves du début du dernier stade larvaire (L3) et la mortalité cumulée des stades immatures a été utilisée pour la détermination des différentes doses létales. Les DL_{25} (0,28 μg) et DL_{50} (0,67 μg) obtenus à partir d'une courbe dose-réponse ont été utilisés pour le reste des expérimentations.

Les résultats révèlent que l'azadirachtine induit une réduction significative des pourcentages de pupaison et d'émergence des adultes de *D. melanogaster* et entraîne l'apparition de plusieurs aberrations morphologiques (larves déformées et hyper pigmentée, intermédiaires larve-pupe et pupe-adulte, adultes malformés). L'insecticide induit également une augmentation de la durée de développement des stades larvaire et pupal, avec un effet dose dépendent, ainsi qu'une réduction de la survie des adultes (mâles et femelles) et ce comparativement aux témoins.

De plus, l'azadirachtine affecte la fécondité des femelles en réduisant de manière significative le nombre d'œufs pondus. Les résultats révèlent également, une préférence d'oviposition des femelles sur un milieu sans azadirachtine traduisant une aversion à cette molécule. L'exposition pré-imaginale à l'azadirachtine renforce cette aversion suggérant une mémorabilité de l'aversion à cette molécule.

L'insecticide, réduit d'une manière significative le poids corporel chez les larves, les pupes et les adultes de *D. melanogaster* et entraîne une diminution dans la quantité de nourriture ingérée avec un effet dose-dépendant. Enfin, l'azadirachtine perturbe l'activité des enzymes digestives chez les larves et les adultes et ce comparativement aux témoins. En effet, le traitement réduit l'activité spécifique de l' α -amylase, des chitinases et des protéases chez les larves et les adultes mâles et femelles. Néanmoins, une augmentation dans l'activité lipasique est observée pour les deux doses testées.

Mots clés : Azadirachtine, *D. melanogaster*, Toxicité, Développement, oviposition, Digestion.



Abstract

The effects of a commercial formulation of azadirachtin, the Neem-Azal, were evaluated on the toxicity, development, oviposition and digestion of *Drosophila melanogaster* as biological model. Various doses ranging from 0.1 to 2 μg were applied topically on early third instar larvae and the cumulative mortality of immature stage was used in order to determine the various lethal doses. The LD₂₅ (0.28 μg) and LD₅₀ (0.67 μg) determined by a dose-response curve were used for following experiments.

Data showed that azadirachtin reduced, significantly pupation and adult's eclosion rates of *D. melanogaster* and exhibited various morphological abnormalities on larvae, pupae and adult stages (heavy pigmentation of larvae, pupa-adult intermediate, malformed adults). Results also showed that azadirachtin increased significantly the duration of larval and pupal development with a dose-response relationship. Moreover, azadirachtin treatment reduced significantly adult's survival of both sex as compared to control.

In addition, azadirachtin affected fecundity of flies by a significant reduction of the number of eggs laid. Results showed that females present clear preference for oviposition in control medium. Pre-imaginal exposure (L3) to azadirachtin increased aversion to this substance suggesting a memorability of the learned avoidance.

The insecticide reduced, the body weight of all developmental stages of *D. melanogaster* (larvae, pupae and adults), and resulted in decreased amount of food intake in the larvae and adults with a dose-response relationship. Finally, the specific activity of digestive enzymes was also affected. Indeed, azadirachtin reduced the activity of α -amylase, chitinase, and protease and increased lipasic activity in larvae and adults treated with the two tested doses.

Keywords: Azadirachtin, *D. melanogaster*, Toxicity, Development, Oviposition, Digestion.



المخلص :

تأثير الصيغة التجارية *azadirachtine*، Neem-Azal قيمت على النمو، الإباضة و الهضم عند ذبابة الفواكه *D. melanogaster*. جرعات مختلفة تتراوح بين (0,1 و 2 μg) طبقت بواسطة التطبيق الموضوعي على يرقات في بداية الطور الثالث، و الوفاة المجموعة للأطوار الثلاثة استعملت من أجل تحديد الجرعات دون المميتة. الجرعة ($DL_{25} = 0,28 \mu\text{g}$) و الجرعة ($DL_{50} = 0,67 \mu\text{g}$) حددت من خلال منحى تركيز- استجابة و استعملت في كل التجارب.

أبدت النتائج أن المبيد الحشري تسبب في انخفاض نسبة التشرنق والانسلاخ لبالغين *D. melanogaster*، و تسبب أيضا في ظهور تشوهات عديدة منها (يرقات مشوهة ومحرقة، يرقة- عذراء متوسط، عذراء- حشرة متوسط، حشرة مشوهة). المبيد أدى أيضا إلى تأخير مدة نمو طور اليرقات و طور العذراء بالنسبة للجرعتين المجربتين مع وجود علاقة بين الجرعة و الاستجابة، *azadirachtine* يقلل من مدة بقاء الحشرات على قيد الحياة بالنسبة للجنسين بالمقارنة مع الحشرات الشاهدة.

بالإضافة إلى ذلك المبيد اثر سلبيا على خصوبة أنثى الحشرة بتخفيضه عدد البويضات بالنسبة للجرعتين المجربتين. النتائج أظهرت أن أنثى *D. melanogaster* تفضل الإباضة في وسط بدون *azadirachtine* مع تجنب هذه المادة. تعرض اليرقات مبكرا إلى *azadirachtine* يقوي التجنب و يشير إلى بروز النفور من هذه المادة.

نشاط *azadirachtine* المجرب بالجرعتين DL_{25} و DL_{50} تسبب في انخفاض بشكل كبير وزن اليرقات، العذراء والحشرات الذكر منها و الأنثى، و تسبب أيضا في انخفاض كبير في كمية الأكل الداخلة بالنسبة للجرعتين المجربتين مع وجود علاقة بين الجرعة و الاستجابة. في النهاية نشاط الإنزيمات الهضمية تأثر أيضا بالمقارنة مع الحشرات الشاهدة. في الحقيقة العلاج قلل من نشاط الاميلاز، الكيتيناز و البروتياز عند اليرقات، والحشرات الذكر منها و الأنثى، و مع ذلك زيادة في نشاط الليباز لوحظ عند اليرقات و الحشرات ذكر و أنثى بالنسبة للجرعتين المجربتين.

الكلمات المفتاحية : *Azadirachtine*، *D. melanogaster*، السمية، النمو، الإباضة، الهضم.

*RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*



REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Abed-Vieillard, D., Cortot, J., Everaerts, C., Ferveur, J.F. 2014.** Choice alters *Drosophila* oviposition site preference on menthol. *Biol. Open.* **3**: 22-28. doi: 10.1242/bio.20136973
- Abed-Vieillard, D. & Cortot, J. 2016.** When Choice Makes Sense: Menthol Influence on Mating, Oviposition and Fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Front. Integr. Neurosci.* **10**: 5. doi: 10.3389/fnint.2016.00005
- Abedi, Z., Saber, M., Gharekhani, G., Mehrvar, A., Kamita, S.G. 2014.** Lethal and sublethal effects of azadirachtin and cypermethrin on *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Econ Entomol.* **107**(2): 638- 645.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F. 2000.** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* **287**: 2185–2195.
- Aggarwal, N. & Brar, D.S. 2006.** Effects of different neem preparations in comparison to synthetic insecticides on the whitefly parasitoid *Encarsia sophia* (Hymenoptera: Aphelinidae) and the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) on cotton under laboratory conditions. *Pest Sci.* **79**(4): 201-207.
- Ahmad, N., Ansari, M.S., Nazrussalam. 2012.** Effect of neemarin on life table indices of *Plutella xylostella* (L.). *Crop Prot.* **38**: 7-14.
- Ahmad, S., Ansari, M.S., Muslim, M. 2015.** Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Corp prot.* **68**: 72-78.
- Akca, I., Tuncer, C., Guler, A., Saruhan, I. 2009.** Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Anim Vet Adv.* **8**(3): 436-440.



- Almeida, G.D., Zanuncio, J.C., Senthil-Nathan, S., Pratissoli, D., Polanczyk, R.A., Azevedo, D.O., Serrão, J.E. 2014.** Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Invertebr. Surv.* **11**: 79–86.
- Alouani, A., Rehim, N., Soltani, N. 2009.** Larvicidal activity of a neem tree extract (azadirachtin) against mosquito larvae in the republic of Algeria, Jordan. *Biol. Sci.* **2**: 15-22.
- Anderson, P., Sadek, M.M., Larsson, M., Hansson, B.S., 2013.** Thöming G Larval host plant experience modulates both mate finding and oviposition choice in a moth. *Anim Behav.* **85**: 1169-1175.
- Andreu, J., Albert, S., Magi, R. 2000.** Antifeedant activity of *Melia azadirachta* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Phytoparasitica.* **28**(4): 311-319.
- Anjum, S.I., Yousf, M.J., Ayaz, S., Siddiqui, B.S. 2010.** Toxicological evaluation of chlorpyrifos and neem extract (biosal b) against 3rd instars larvae of *Drosophila melanogaster*. *Anim Pl Sci.* **20**(1): 9-12.
- Anuradha, A., Annadurai, R.S., Shashidhara, L.S. 2007.** Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **37**(6): 627–634.
- Anuradha, A., Annadurai, R.S. 2008.** Biochemical and molecular evidence of azadirachtin binding to insect actins. *Curr. Sci.* **95**: 1588–1593.
- Armstrong, J. D., Steven de Belle, J., Wang, Z., Kaiser, K. 1998.** Metamorphosis of the mushroom bodies; large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. *Learn. Memory.* **5**(1): 102-114.
- Arrese, E.L. & Soulages, J.L. 2010.** Insect fat body: Energy, metabolism and regulation. *Annu Rev Entomol.* **55**: 207-225.



- Ashburner, M. & Thompson, J.N. J.R. 1978. The laboratory culture of *Drosophila*. In The genetics and biology of *Drosophila* (Eds. M. Ashburner and T.R.F. Wright), 2a: 1-109. Academic Press, London and New-York.
- Banerjee, A., Manna, S., Saha, S.K. 2014. Effect of aqueous extract of azadirachta indica A. Juss (neem) leaf on oocyte maturation, oviposition, reproductive potentials and embryonic development of a freshwater fish ectoparasite *Argulus bengalensis* Ramakrishna, 1951 (Crustacea: Branchiura). *Parasitol. Res.* **113**(12): 4641-4650.
- Barbosa, W.F., De Meyer, L., Guedes, R.N., Smagghe, G. 2015. Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology.* **24**(1): 130-142.
- Barnby, M.A. & Klocke, J.A. 1987. Effects of azadirachtin on the nutrition and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr.) (Noctuidae). *Insect. Physiol.* **33**: 69-75.
- Battesti, M., Moreno, C., Joly, D., Mery, F. 2014. Biased social transmission in *Drosophila* oviposition choice. *Behav Ecol Sociobiol.* DOI 10.1007/s00265-014-1820-x.
- Bellés, X. & Maestro, J.L. 2005. Endocrine peptides and insect reproduction. *Invertebr. Repr. Dev.* **47**(1): 23-37.
- Bernard, L. & Lagadic, L. 1993. Sublethal effects of dietary cyfluthrin on nutritional performance and gut hydrolase activity in larvae of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **46**: 171-180.
- Bernays, E.A. & Chapman, R.F. 1994. *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. Chapman and Hall, New York.
- Bernfeld, P. 1955. α -amylases. *Method. Enzymol.* **1**: 149-151.
- Bhardwaj, A.K. & Ansari, B.A. 2015. Effect of Nimbecidine and Neemazal on the developmental programming of cotton pest, *Earias vittella*. *Entomol. Zool. Stud.* **3**: 38-42.



- Blackiston, D. J., Silva Casey, E, Weiss, M.R. 2008.** Retention of memory through metamorphosis: can a moth remember what it learned as a caterpillar. *PLoS One* **3**(3): e1736. doi:10.1371/journal.pone.0001736
- Blacquiere, T., Smaghe, G., Van Gestel, C.A., Mommaerts, V. 2012.** Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*. **21**: 973-992.
- Blaney, W.M., Sommonds, M.S.J., Ley, W.V., Anderson, J.C., Toogood, P.L. 1990.** Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.* **55**: 149-160.
- Boeke, S.J., Boersma, M.G., Alink, G.M., van Loona, J.J.A., van Huis, A., Dicke, M., 2004.** Rietjens IMCM Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *J Ethnopharmacol.* **94**: 25-41.
- Boulahbel, B., Aribi, N., Kilani-Morakchi, S., Soltani, N. 2015a.** Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone. *Afr. Entomol.* **23**: 224-233.
- Boulahbel, B., Aribi, N., Kilani-Morakchi, S., Soltani, N. 2015b.** Activity of neem oil in *Drosophila melanogaster*: toxicity and delayed effect on the progeny. *Entomol. Zool. Stud.* **3**(6): 306-310.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities on protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**(1-2): 248-254.
- Brunherotto, R., Vendramim, J.D., Oriani, M.A., de, G., 2010.** Efeito de genótipos de tomateiro e de extratos aquosos de folhas de *Melia azedarach* e de sementes de *Azadirachta indica* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Entomol.* **39**: 784-791.
- Buchon, N., Osman, D., David, F.P.A., Yu Fang, H., Boquete, J.P., Deplancke, B., Lemaitre, B. 2013.** Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell. Rep.* **3**: 1725-38.



- Cabidoche, Y.-M. & Lesueur-Jannoyer, M. 2011.** Pollution durable des sols par la chlordécone aux Antilles : comment la gérer ? *Innovations Agronomiques*. **16**: 117-133.
- Campbell, G. 2006.** Regulation of gene expression in the distal region of the *Drosophila* leg by the Hox11 homolog, C15. *Dev. Biol.* **278** : 607-618.
- Campbell, R. A. & Turner, G.C. 2010.** The mushroom body. *Current Biology*. **20**(1): R11-R12.
- Carlson, J. 1991.** Olfaction in *Drosophila*: genetic and molecular analysis. *Trends Neurosci.* **14**: 520-524.
- Carson, R. 1962.** Silent spring. Boston, Massachusetts, USA.
- Cassier, P., Lafont, R., Descamps, M., Porchet, M., Soyez, D., 1997.** Reproduction des invertébrés: Stratégies, modalités et régulation. *Edition Masson*. p.354.
- Celestino, D., Braoios, G.I., Ramos, R.S., Gontijo, L.M., Guedes, R.N.C., 2014.** Azadirachtin mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallescens*. *Biocontrol*. doi 10.1007/s10526-014-9601-z.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W. P. 2011.** The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* **366**(1573): 1987-1998.
- Charleston, D.S., Kafir, R., Dicke, M., Vet, L.E.M., 2006.** Impact of botanical extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella xylostella* and its natural enemies: a field test of laboratory findings. *Biol. Control*. **39**: 105-114.
- Clissold, F.J., Tedder, B.J., Conigrave, A.D., Simpson, S.J. 2010.** The gastrointestinal tract as a nutrient-balancing organ. *Proc. R. Soc. B.* **277**: 1751-59.
- Copping, L.G. & Duke, S.O. 2007.** Natural products that have been used commercially as crop protection agents – a review. *Pest. Manag. Sc.* **63**(6): 524-554, ISSN 1526-498X



- Cordeiro, E.M.G., Corrêa, A.S., Venzon, M., Guedes, R.N.C. 2010.** Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. *Chemosphere*. **81**: 1352–1357.
- Dalton, J.E., Kacheria, T.S., Knott, S.R., Lebo, M.S., Nishitani, A., Sanders, L.E. 2010.** Dynamic, mating-induced gene expression changes in female head and brain tissues of *Drosophila melanogaster*. *Bmc Genomics*. **11**: 541.
- Das, D.R., Parween, S., Faruki, S.I. 2006.** Efficacy of commercial neem-based insecticide, Nimbicidine (R) against eggs of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Univ J Zool Rajshahi Univ*. **25**: 51-55.
- Deravel, J., Krier, F., Jacques, Ph. 2014.** Les biopesticides, alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. **18**(2) : 220-232.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol* . **43**: 545–569.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A., Smagghe, G. 2005.** Insect growth- and development disturbing insecticides. In: Comprehensive Insect Molecular Science (Gilbert, L.I., Kostas, I. & Gill, S., eds.). *Pergamon. Press*. **6**: 55-116. (ISBN 0-44-451526-7).
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A., Smagghe, G. 2010.** Insect growth-and developmental- disturbing insecticides. In: L.I. Gilbert, and S.S Gill (eds.). *Insect Control. Elsevier*. New York. 121-184.
- Douglas, A.E. 2013.** The alimentary canal. In *The Insects: Structure and Function*, ed. RF Chapman, SJ Simpson, AE Douglas, pp. 46–80. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
- Dubrovsky, E.B. 2005.** Hormonal cross talk in insect development. *Trends. Endocrinol. Metab*. **16**(1): 6-11.
- Dukas, R. 2008.** Evolutionary biology of insect learning. *Annu. Rev. Entomol*. **53**:145-160.



- FAOSTAT.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT; 2012. [www.faostat.fao.org].
- Feder, D., Valle, D., Rembold, H., García, S.E. 1988.** Azadirachtin-induced sterilization in mature females of *Rhodnius prolixus*. *Z Naturforschung C.* **43**: 908-903.
- Flaven-Pouchon, J., Garcia, T., Abed-Vieillard, D., Farine, J.P., Ferveur, J.F. 2014.** Transient and permanent experience with fatty acids changes *Drosophila melanogaster* preference and fitness. *PLoS ONE.* **9**: e92352doi: 10.1371/journal.pone.0092352.
- Fogleman, J.C. 1979.** Oviposition site preference for substrate temperature in *Drosophila melanogaster*. *Behav.Genet.* **9**: 407-412.doi:10.1007/BF010 66978
- Fougeron, A.S., Farine, J.P., Flaven-Pouchon, J., Everaerts, C., Ferveur, J.F. 2011.** Fatty-acid preference changes during development in *Drosophila melanogaster*, *PLoS ONE.* **6**: e26899.
- Frost & Sullivan. 2009.** North American and Western European biopesticides market. M472-39.
- Gäde, G., Hoffmann, K. H., Spring, J.H. 1997.** Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future direction. *Physiol. rev.* **77**(4): 963-1032.
- Gäde, G. & Hoffmann, K.H. 2005.** Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol. Entomol.* **30**: 103-121.
- García-Carreño F.L. & Haard, N. 1993.** Characterization of protease classes in Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Food. Biochem.* **17**: 97-113.
- Gerber, B., Stocker, R.F., Tanimura, T., Thum, A.S. 2009.** Smelling, tasting, learning: *Drosophila* as a study case. *Results and Problems in Cell Differentiation.* **47**: 139- 185.



- Gilbert Haase E, Kwak SJ, Chen R, Mardon G. 2013.** *Drosophila* signal peptidase complex member Spase12 is required for development and cell differentiation. *PLoS One.* 8(4):e60908. doi: 10.1371.
- Gnanamani, R. & Dhanasekaran, S. 2013.** Growth inhibitory effects of azadirachtin Against *Pericalliaricini* (Lepidoptera: Arctiidae). *World J Zool.* 8 (2): 185-191.
- Gontijo, L.M., Celestino, D., Queiroz, O.S., Guedes, R.N.C., Picanço, M.C. 2015.** Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of *pirate bug* predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Fla. Entomol.* 98(1): 59-64.
- Grossfield, J. 1978.** Non-sexual behavior of *Drosophila*. In M. Ashburner & T. R. F. Wright (Eds.). *The genetics and biology of Drosophila*, Vol. 2b : 2-126.
- Gruntenko, N. & Rauschenbach, I. 2009.** 20-hydroxyecdysone, juvenile hormone and biogenic amines: Mechanisms of interaction in control of *Drosophila* reproduction under normal and stressful conditions. In: Smagghe, G. (Ed). *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 317-332.
- Guerrini, V. H. 2000.** Effect of azadirachtin on *Damalina ovis* in sheep. *J. Vet. Res.* 4: 133-138.
- Gujar, G.T. & Mehrotra, K.N. 1983.** Juvenilizing effect of azadirachtin on a noctuid moth *Spodoptera litura* Fabr. *Indian J Exp Biol.* 21: 292-293.
- Gunasekaran, K., Vijayakumar, T., Kalyanasundaram, M. 2009.** Larvicidal & emergence inhibitory activities of NeemAzal T/S 1.2 per cent EC against vectors of malaria, filariasis & dengue. *Indian J Med Res.* 130(2): 138-145.
- Harrop, T.W.R., Sztal, T., Lumb, C., Good, R.T., Daborn, P.J., Batterham, P., Chung, H. 2014.** Evolutionary changes in gene expression, coding sequence and copy-number at the *cyp6g1* Locus contribute to resistance to multiple insecticides in *Drosophila*. *PLoS ONE.* 9(1): e84879. doi:10.1371/journal.pone.0084879.
- Harshman, L.G., Hoffmann, A.A., Prout, T. 1988.** Environmental effects on remating in *Drosophila melanogaster*. *Evolution.* 42: 312-321.



- Hasan, F. & Ansari, M.S., 2011.** Toxic effects of neem-based insecticides on *Pieris brassicae* (Linn.). *Crop Prot.* **30**: 502-507.
- Haubruge, E. & Amichot, M. 1998.** Compréhension des mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les Insectes et les Acariens. *Biotechnol. Agron. Soc.* **2** (3): 161-174.
- Heisenberg, M. 2003.** Mushroom body memoir: From maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 266-275.
- Hopkins, A.D. 1917.** A discussion of C.G. Hewitt's paper on Insect Behaviour. *J Econ Entomol.* **10**: 92-93.
- Hossain, M.B. & Poehling, H.M. 2006.** Effects of a neem-based insecticide on different immature life stages of the leafminer *Liriomyza sativae* on tomato. *Phytoparasitica.* **34**: 360-369.
- Huang, J-F., Shui, K-J., Li, H-Y., Hu, M-Y., Zhong, G-H. 2011.** Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SI-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. *Pestic. Biochem. Phys.* **99**(1):16-24.
- Hussein, K. T. 2000.** Toxicity and some aspects of the action of IGRs and botanical essential oils on the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.* **33**: 81-91.
- Ishaaya, I. 1990.** Benzoylphenyl-ureas and other selective control agent, mechanism and application In: Cassida, J.E. (Ed) *Pesticides and alternatives*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 365-376.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* **51**: 45-66.
- Isman, M.B., Miresmailli, S., Machial, C. 2013.** Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem. Rev* **10**: 197-204.



- Jaenike, J. 1983.** Induction of host preference in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia*. **58**: 320-325.
- Jagannadh, V. & Nair, V. 1992.** Azadirachtin-induced effects on larval-pupal transformation of *Spodoptera mauritia*. *Physiol. Entomol.* **17**: 56-61.
- Jbilou R., Amri, H., Bouayad, A., Ghailani, A., Ennabili, A., Sayah, F. 2008.** Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, a-amylase activity and off spring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). *Bioresour. Technol.* **99**: 959-964.
- Joseph, R.M., Devineni, A.V., King, I.F.G., Heberlein, U. 2009.** Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 11352-11357.
- Khosravi, R., J. J. Sendi, J. J., Ghadamyari, M. 2010.** Effect of *Artemisia annua* L. on deterrence and nutritional efficiency of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Plant Prot. Res.* **50**: 423-428.
- Khosravi, R. & Sendi, J.J. 2013.** Effect of neem pesticide (Achook) on midgut enzymatic activities and selected biological compounds in the hemolymph of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Plant Prot. Res.* **5**: 238-247.
- Koodalingam, A., Deepalakshmi, R., Ammu, M., Rajalakshmi, A. 2014.** Effects of NeemAzal on marker enzymes and hemocyte phagocytic activity of larvae and pupae of the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Asia. Pac. Entomol.* **17**: 175-181.
- Koul, O. & Isman, M.B. 1991.** Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the variegated cutworm *Peridroma saucia*. *Insect. Physiol.* **37**: 591-598.
- Koul, O., Shanka, J.S., Kapil, R.S. 1996.** The effect of neem allelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. *Entomol. Exp. Appl.* **79**: 43-50.



- Koul, O. & Wahab, S. 2004.** Neem: Today and in the New Millenium. pp. 244–291. In: “Present Concepts of the Mode of Action of Azadirachtin from Neem” (R.J. Mordue, ed.). *Kluwer Academic Publishers*. 291 pp.
- Kozlova, T., & Thummel, C. S. 2000.** Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. **11**: 276–28.
- Kozlova, T. & Thummel, C. S. 2003.** Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*. **301**: 1911-1914.
- Kraiss, H., Cullen, E.M. 2008.** Insect growth regulator effects of azadirachtin and neem oil on survivorship, development and fecundity of *Aphis glycines* (Homoptera, Aphididae) and its predator, *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae). *Pest. Manag. Sci.* **64**: 660-668.
- Krause Pham, C. & Ray, A. 2015.** Conservation of olfactory avoidance in *Drosophila* species and identification of repellents for *Drosophila suzukii*. *Scientific. Reports*. **5**: 11527-11527.
- Kumar, S., Raman, R.P., Pandey, P.K., Mohanty, S., Kumar, A., Kumar, K. 2013.** Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish. Shellfish. Immunol.* **34** (2): 564-573.
- Lai, D., Jin, X., Wang, H., Yuan, M., Xu, H. 2014.** Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *Biotechnol.* **185**: 51-56.
- Larson, R.O. 1989.** The commercialization of neem. In *The Neem Tree*; Jacobson, M., ed. Focus on *Phytochemical Pesticides*. CRC Press: Boca Raton, FL. **1**: 155- 168.
- Le glou, E. 2012.** Etude de l'effet de la privation de sommeil sur la mémoire consolidée chez *Drosophila melanogaster*. *Thèse de Doctorat*. Université Pierre et Marie Curie – Paris. 164 p.



- Lehane, M.J., Blakemore, D., Williams, S., Moffatt, M.R. 1995. Regulation of digestive enzyme levels in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **110**: 285–289.
- Lemaitre, B. & Miguel-Aliaga, I. 2013. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet.* **47**: 377-404.
- Leng, P., Zhiming, Z., Guangtang, P., Maojun, Z. 2011. Applications and development trends in biopesticides. *Afr. J. Biotechnol.* **10**(86): 19864-19873.
- Lima, D.B., Melo, J.W., Guedes, N.M., Gontijo, L.M., Guedes, R.N. & Gondim, M.G. Jr. 2015. Bioinsecticide-predator interactions: azadirachtin behavioral and reproductive impairment of the coconut mite predator *Neoseiulus baraki*. *PLoSOne.* **10**(2): e0118343.
- Linford, N.J., Bilgir, C., Ro, J., Pletcher, S.D. 2013. Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*, *J. Vis. Exp.* (71), e50068, doi:10.3791/50068.
- Lucantoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P., Habluetzel, A. 2006. Effects of neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue. Cell.* **38**: 361-371.
- Lynn, O.M., Kim, J-E., Lee, K-Y. 2012. Effects of azadirachtin on the development and gene expression of fifth instar larvae of *Indianmeal moth*, *Plodia interpunctella*. *Asia-Pacific. Entomol.* **15**(1): 101-105.
- Ma, D.L., Gordh, G., Zalucki, M.P., 2000. Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on cotton and artificial diet, *Aust. Entomol.* **39**: 301-304.
- Marchal, E., H. P., Vandersmissen, L., Badisco, S., Van de Velde, H., Verlinden, M., Iga, P., Van Wielendaele, R., Huybrechts, G., Simonet, G., Smagghe, J. Vanden Broeck. 2010. Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: a review. *Peptides.* **31**(3):506-19.



- Martinez, S.S.O., Van Emden, H.F. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* **30**: 113-125.
- Medina, P., Smagghe, G., Budia, F., Tirry, L., Viñuela, E. 2003.** Toxicity and absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after topical application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ Entomol.* **32**(1): 196-203.
- Medina, P., Budia, F., Del Estal, P., Viñuela, E. 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *Econ. Entomol.* 9743-50.
- Meigen, J.W. 1830.** Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. *Hamm.* **6**: 401.
- Merzendorfer, H. & Zimoch, L. 2003.** Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* **206**: 4393–4412.
- Miller, G.L. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* **31**: 426–428.
- Min-Li, Z. & Shin-Foon, C. 1987.** The effects of azadirachtin on the ecdysteroid titre in the larvae of *Ostrinia furnicalis* Guenee. *Applied Entomology*, **103**: 355-359.
- Montell, C. 2009.** A taste of the *Drosophila* gustatory receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**: 345–353.
- Mordue, L.A.J. & Blackwell, A. 1993.** Azadirachtin: an update. *J Insect Physiol.* **39**(11): 903- 924.



- Mordue, L.A. J., Nisbet, A. J., Jennens, L., Ley, S. V., Mordue, W. 1999.** Tritated hiydroazadirachtin binding to *Schistocerca gregaria* testes and *Spodoptera* Sf9 cells suggests a similar cellular mechanism of action for azadirachtin, pp. 247–258. In R. P. Singh and R. C. Saxena (eds.), *Azadirachta indica* A. Juss. International Neem Conference, Gatton, Australia 1996. Oxford & IBH Publ. Co. PVT Ltd, New Delhi, India.
- Mordue, L.A. J. 2004.** Present concept of the mode of action of azadirachtin from neem, pp. 229–242. In O. Koul and S. Wahab (eds.), *Neem: today and in the new millennium*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D., Nisbet, A.J. 2005.** Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, UK. 6: 117–135.
- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D., Nisbet, A.J. 2010.** Addendum: Azadirachtin, a natural product in insect control: An update. In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds). *Insect Control*. Elsevier, Oxford, UK. 204–206.
- Morgan, E.D. 2009.** Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.* 17(12): 4096- 4105.
- Mulla, M.S. & Su, T. 1999.** Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 133-152.
- Müller, P.H. 1948.** Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane and Newer Insecticides (Nobel Lecture, December 11, 1948).
- Nasr, M. Sendi, J.J., Moharramipour, S., Zibae, A. 2015.** Evaluation of *Origanum vulgare* L. essential oil as a source of toxicant and an inhibitor of physiological parameters in diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.06.002>



- Nauen, R., Elbert, A., McCaffery, A., Slater, R., Sparks, T.C. 2012.** IRAC: insecticide resistance, and mode of action classification of insecticides, in: Kramer, W., Schrimmer, U., Jeschke, P., Witschell M. (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*, Vol. 3: Insecticides, seconded., Wiley-VCH, Weinheim. pp. 935-955.
- O'Grady, PM. & Markow, T. 2009.** Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*. *Landes Bioscience*. **3**(1) : 10-14.
- Olson, S. 2015.** An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*. DOI: 10.1564/v26.
- OMS. 2011.** Organisation mondiale de la santé, Santé 2020, à paraître, OMS, Genève.
- Pandey, S., Pandey, J.P. and Tiwari, R.K. 2011.** Effect of some neem based insecticides on wing shape and pigmentation in Lemon-Butterfly, *Papilio demoleus* L. *World applied sciences journal*. **13**(6): 1356-1360.
- Paranagama, P.A., Kodikara, K.A.B.CH., Nishantha, H.M.I., Mubarak, A.M. 2001.** Effect of azadirachtin on growth and the activity of midgut enzymes of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Natl Sci Found*. **29**: 69-79.
- Parvathi, D.V., Amritha, A. S., Paul, S.F.D. 2009.** Wonder animal model for genetic studies - *Drosophila melanogaster* - its life cycle and breeding methods - a review. *Sri Ramachandra J Med*. **2**(2): 33-38.
- Pascual-ruiz, S., Carrillo, L., Alvarez-alfagemey F., Ruiz, M., Castanera, P., Ortego, F. 2009.** The effects of different prey regimes on the proteolytic digestion of nymphs of the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bull. Entomol. Res*. **99**: 487-491.
- Pener, M.P. & Dhadialla, T.S. 2012.** An overview of insect growth disruptors; applied aspects. – *Adv. Insect. Physiol*. **43**: 1-162.
- Philogène, B. J. R., Regnault-Roger, C., Vincent, C. 2002.** Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale : promesses d'hier et d'aujourd'hui. Biopesticides d'origine végétale C. Regnault-Roger, P. B.J.R. and C. Vincent. *Paris, Lavoisier*. 1-17.



- Pineda, S., Martínez, A.M., Figueroa, J.I., Schneider, M.I., Estal, P.D., Viñuela, E., Gómez, B., Smagghe, G., Budia, F. 2009.** Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entom.* **102**: 1490-1496.
- Popp, J., Petö, K., Nagy, J. 2013.** Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustainable Dev.* **33**: 243-255.
- Prokop, A., Beaven, R., Qu, Y., Sánchez-Soriano, N. 2013.** A rough guide to *Drosophila* mating schemes. In: J. Roote & A. Prokop (Eds.), G3/Bethesda. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics (pp. 353–358). 3, <http://dx.doi.org/10.6084/m6089>.
- Qi, B., Gordon, G., Gimme, W. 2001.** Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol. Control.* **22**(2): 185–190.
- Qiao, J., Zou, X., Lai, D., Yan, Y., Wang, Q., Li, W., Deng, S., Xu, H., Gu, H. 2014.** Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. *Pest. Manag. Sci.* **70**(7): 1041-1047.
- Quinn, L., Lin J., Cranna N., Lee, J.E.A., Mitchell, N. Hannan, R. 2012.** Steroid hormones in *Drosophila*: How ecdysone coordinates developmental signalling with cell growth and division. In: Abduljabbar, H. (Ed). *Steroid – Basic Science*. Intech, Rijeka. 141-168.
- Raabe, M. 1989.** Recent developments in insect neurohormones. New York and London: Plenum Press.
- Ramade, F. 2011.** Introduction à l'écochimie. Les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. DOC T. &. (Ed.)Paris: Lavoisier ISBN.
- Reese, J.C. 1978.** Chronic effects of plant allelochemicals on insect nutritional physiology. *Entomol. Exp. Appl.* **24**: 425-431.



- Renwick, J.A.A. & Chew, F.S. 1994.** Oviposition behaviour in Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 377–400. doi:10.1146/annurev.en.39.010194.002113
- Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N., Sayah, F. 2008.** Effects of azadirachtin on post embryonic development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). *Stored. Prod. Res.* **44**: 290-294.
- Riba, M., Marti, J., Sans, A. 2003.** Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L, (Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* **127**: 37-41.
- Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X., Nelson, C.A. 2003.** Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 1327–1338.
- Rondeau, G., Sánchez-Bayo, F., Tennekes, H.A., Decourtye, A., Ramírez-Romero, R. 2014.** Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Scientific Reports.* **4**: 5566.
- Roya, K. & Sendi, J.J. 2013.** Effect of neem pesticide (Achook) on midgut enzymatic activities and selected biochemical compounds in the hemolymph of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Plant Prot. Res.* **53**: 238–247.
- Sadeghi, A., Van Damme, E.M., Smaghe, G. 2009.** Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *J Ins. Sci.* **9**(65):1-8.
- Saguez J., Vincent C., Laberche J. C., Giodanengo P., 2007.** Pourquoi les inhibiteurs de chitinases peuvent être considérés comme de nouveaux moyens de lutte contre les aphides ?. *Revue de Cytologie et Biologie végétale - Le Botaniste.* **27**(3/4) : 23-31.
- Sami, A.J. 2014.** Azadirachta indica derived compounds as inhibitors of digestive α -amylase in insect pests: potential bio-pesticides in insect pest management. *Eur. J. Exp. Biol.* **4** (1): 259–264.



- Sarin, S. & Dukas, R. 2009.** Social learning about egg-laying substrates in fruit flies. *Proc. Biol. Sci.* **276**: 4323-4328.
- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* **35**: 271-297.
- Schmutterer, H. & Singh, R.P. 1995.** List of insect pests susceptible to neem products. In: Schmutterer H. (Ed). *The Neem Tree Azadirachta indica A. Juss, And other Meliaceae Plants*. VHC, Verlag, Weinheim Germany. 696.
- Scudeler, E.L. & Santos, D.C.D. 2013.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). *Micron.* **44**: 125-132.
- Scudeler, E.L., Padovani, C.R., Santos, D.C. 2014.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis. *Acta Histochem.* **116**(5): 771-780.
- Senthil Nathan, S., Chung, P.G., Murugan, K. 2004.** Effect of botanicals and bacterial toxin on the gut enzyme of *Cnaphlocrocis medinalis*. *Phytoparasitica.* **32**(5): 433-443.
- Senthil Nathan, S., Kalaivani, K., Murugan, K., Chung, P.G. 2005.** The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphlocrocis medinalis* (Guinée) the rice leaffolder. *Pestic. Biochem. Physiol.* **81**(2): 113-122.
- Senthil-Nathan, S., Chung, P.G., Murugan, K. 2006.** Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (the rice leaffolder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **64**: 382-389.
- Senthil-Nathan, S. 2013.** Physiological and biochemical effect of neem and other plant secondary metabolites against Lepidoptera insects. *Front. Physiol.* **4**: 1-17.
- Shanbhag, S. & Tripathi, S. 2009.** Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *J.Exp.Biol.* **212**: 1731-44.



- Shannag, H. K., Capinera, J. L., Freihat, N. M. 2015.** Effects of neem-based insecticides on consumption and utilization of food in larvae of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Sci.* **15**(1): 152.
- Shen, Z., & Jacobs-Lorena, M. 1997.** Characterization of a novel gut specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 28895–28900.
- Shen, C.R., Chen, Y.S., Yang, C.J., Chen, J.K., Liu, C.L. 2010.** Colloid chitin azure is a dispersible, low-cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible assay. *Biomol. Screen.* **15**: 213–217.
- Shu, B., Wang, W., Hu, Q., Huang, J., Hu, M. & Zhong, G. 2015.** A comprehensive study on apoptosis induction by azadirachtin in *Spodoptera frugiperda* cultured cell line sf9. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* doi: 10.1002/arch.21233.
- Smagghe, G., Gomez, L.E., Dhadialla, T.S. 2012.** Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. In: Dhadialla, T.S. (Ed). *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, Burlington, MA, USA. **43**: 163–249.
- Sparks, T.C. & Nauen, R. 2015.** IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pest. Biochem. Physiol.* **121**: 122-128.
- Stark, J.D., Vargas, R.I., Thalman, R.K. 1990.** Azadirachtin: effects on metamorphosis, longevity and reproduction of three tephritid fruit fly species. *J Econ. Entomol.* **83**(6): 2168-2174.
- Stark, J.D., Wong, T.T.Y., Vargas, R.I., Thalman, R.K. 1992.** Survival, Longevity and reproduction of tephritid fruit fly parasitoids (Hym. Braconidae) reared from fruit flies exposed to azadirachtine. *J Econ. Entomol.* **85**: 1125-1129.
- Suman, D.S., Parashar, B.D., Prakash, S., 2010.** Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol.* **47**: 996-1002.



- Swevers, L., Raikhel, A.S., Sappington, T.W., Shirk, P., Iatrou, K. 2005.** Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, U.K. **6**: 87-156. Ok.
- TaiJun, R., XiaoXian, Q., Gong, C., GuoHua, Z. 2009.** Azadirachtin may inhibit *Drosophila melanogaster* growth by apoptosis interference. *Journal of Hunan Agricultural University*. **35**(1):92-95.
- Takamura, T. & Fuyama, Y. 1980.** Behaviour genetics of choice of oviposition sites in *Drosophila melanogaster*. I. Genetic variability and analysis of behavior. *Behav. Genetics*. **10**: 105-120. doi:10.1007/BF01067322
- Tanimura, T., Isono, K., Takamura, T., Shimada, I., 1982.** Genetic dimorphism in the taste sensitivity to trehalose in *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology* **147**: 433-437.
- Tanzubil, B. P. & McCaffery, R. A. 1990.** Effects of azadirachtin on reproduction in the African armyworm (*Spodoptera exempta*). *Entomol. Exp. Appl.* **57**: 11-121.
- Tavernier, R. & Lizeaux, C. 2002.** Sciences vie de la Terre Terminale S- Spec. *Maisonneuve & Larose*. paris, France. 255 p.
- Technau, G. & Heisenberg, M. 1982.** Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **295**: 405-407.
- Tenessen, J.M. & Thummel, C.S. 2011.** Coordinating growth and maturation insights from *Drosophila*. *Current. Biology*. **21**: R750-R757.
- Terra, W. R. & Ferreira, C. 2005.** Biochemistry of digestion. In: Gilbert, LI, Iatrou K, Gill SS (eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*. *Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 4. Elsevier, Amsterdam, pp 171-224.
- Thakore Y., 2006.** The biopesticide market for global agriculture use. *Ind. Biotechnol.* **2**: 194-208.



- Thomson, J.N. & Pellmyr, O. 1991.** Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. **36**: 65–89.
- Timmins, W.A. & Reynolds, S.E. 1992.** Azadirachtin inhibit secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars: reduced growth due to impaired protein digestion. *Entomol. Exp. Appl.* **63**: 47–54.
- Tine, S., Aribi, N. & Soltani, N. 2011.** Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *Afr J Biotechnol.* **10**(85): 19816-19824.
- Tomé, H.V.V., Martins, J.C., Corrêa, A.S., Galdino, T.V.S., Picançon, M.C., Guedes, R.N.C. 2013.** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Prot.* **46**: 63-69.
- Trumm, P. & Dorn, A. 2000.** Effects of azadirachtin on the regulation of midgut peristalsis by the stomatogastric nervous system in *Locusta migratoria*. *Phytoparasitica.* **28**: 7–26.
- Tsujita, T., Ninomiya, H., Okuda, H. 1989.** p- nitrophenyl 865. butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase 866 from bovine adipose tissue. *Lipid Research.* **30**: 997-1004.
- Tully, T., Cambiazo, V., Kruse, I. 1994.** Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *Neurosci.* **14**(1): 68-74.
- Ureña, E., Manjón, C., Franch-Marro, X., Martín, D. 2014.** Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous, insects, vol.111.19: 7024-7029. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1401478111.
- Venu, I., Durisko, Z., Xu, J., Dukas, R. 2014.** Social attraction mediated by fruit flies' microbiome. *J. Exp. Biol.* **217**: 1346–1352.
- Wang, S.F., Zhu, J.D., Raikhel, A.S. 2004.** Regulation of vitellogenin gene expression by ecdysteroids. In: Raikhel, A.S. & Sappington, T.W. (Eds.). *Reproductive biology of invertebrates*, Part B: Progress in vitellogenesis. Science Publishers, Enfield, USA/Plymouth, UK. **12**: 69-94.



- Wang, H., Lai, D., Yuan, M., Xu, H. 2014. Growth inhibition and differences in protein profiles in azadirachtin-treated *Drosophila melanogaster* larvae. *Electrophoresis*. **35**(8): 1122-1129.
- Wang, Z., Cheng, X., Meng ,Q., Wang, P., Shu, B., Hu, Q., Hu, M., Zhong, G. 2015. Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. **4**(64): 126-135.
- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jackle, H., Janning, W. and Klambt, C. 2003. Fly Move--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* **19** : 310-1.
- Wertheim, B., Dicke, M., Vet L.E. 2002. Behavioural plasticity in support of a benefit for aggregation pheromone use in *Drosophila melanogaster*. *Entomol. Exp. Appl.* **103**: 61-71.
- Wong, R., Piper, M.D.W., Wertheim, B., Partridge, L. 2009. Quantification of food intake in *Drosophila*. *PLoS ONE*. **4**(6):e6063.doi:10.1371/
- Woodring, J., Diersch, S., Lwalaba, D., Hoffmann, K.H., Meyering-Vos, M. 2009. Control of the release of digestive enzymes in the caeca of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Physiol. Entomol.* **34**: 144-51.
- Yang, C.H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 2008. *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science*. **319**: 1679-1683.
- Yang, W.J.; Xu, K.K., Zhang, R.Y., Dou, W., Wang, J.J. 2013. Transcriptional regulation of a chitinase gene by 20-hydroxyecdysone and starvation in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 20048-20063
- Zapata, N., Budia, F., Vinuela, E., Medina, P. 2009. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep: Noctuidae). *Ind. Crops Prod.* **30**: 119-1255.



Zibae, A. & Bandani, A.R. 2009. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the Sun pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauveria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*. **12**: 1-11.

Zibae, A. 2011. Botanical insecticides and their effects on insect biochemistry and immunity, pp.55-68. *In* M. Stoytcheva (ed.), *Pesticides in the modern world-pests control and pesticides exposure and toxicity assessment*. Intech, Paris, France.

Ziedler, O. 1874. Verbindungen von chloral mit brom- und chlobenzol. *Berichte*. **7**: 1180-1181

ANNEXES

Production scientifique

I/ Publications Internationales

1. **BEZZAR-BENDJEZIA R., KILANI-MORAKCHI S., ARIBI N., 2016.**
Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Accepted, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.02.009>. IF: 2,014
2. **BEZZAR-BENDJEZIA R., KILANI-MORAKCHI S., ARIBI N., 2016.**
Growth and molting disruption effects of azadirachtin against *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2016: **4(1)**: 363-368. <http://entomoljournal.com>. IF: 0,5

II/ Communications Internationales

1. Radia Bendjazia, Samira Kilani-Morakchi & Nadia Aribi. Effet de l'azadirachtine chez un modèle biologique *Drosophila melanogaster* : Toxicité et Développement. International Conference in Integrated Management of Environment ICIME. Le 25 au 28 September 2014, Hammamet-Tunisia (**Communication affichée**).
2. Radia Bendjazia, Samira Kilani-Morakchi & Nadia Aribi. Effets d'un pesticide naturel, l'azadirachtine, sur la longévité et la fertilité des adultes chez *Drosophila melanogaster* (Diptera). 5^{èmes} Journées Scientifiques de L'Association Tunisienne de Toxicologie (ATT) « Processus Toxiques et Sécurité Sanitaire » le 21 au 23 Mars 2015. Monastir-Tunisie (**Communication orale**).
3. Radia Bendjazia, Samira Kilani-Morakchi & Nadia Aribi. Toxicité d'un pesticide naturel, l'azadirachtine chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (Diptera). L'Association Tunisienne des Sciences Biologiques ATSB « Le 26^{ème} Forum des Sciences Biologiques et de Biotechnologie » le 23 au 26 Mars 2015. Monastir-Tunisie (**Communication affichée**).

4. Radia Bendjazia, Samira Kilani-Morakchi & Nadia Aribi. Effet d'un pesticide naturel l'azadirachtine, sur la longévité et la fertilité d'une espèce non ciblée, *Drosophila melanogaster* (Diptera). Colloque d'EcoPhysiologie Animale - CEPA du 4 au 6 Novembre 2015. La Rochelle-France (**Communication affichée**).

III/ Communications Nationales

1. Radia Bendjazia, Samira Kilani-Morakchi & Nadia Aribi, Effets de l'azadirachtine, pesticide naturel, chez *Drosophila melanogaster* (Diptera) : Toxicité et impact sur le développement. 1^{er} Séminaire National sur l'Entomologie Médicale et La Lutte Biologique, le 19 et 20 Octobre 2015. Tébessa (**Communication affichée**).