



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسنطينة
كلية الطبيعة الحياة

Département : Biologie Animale .

قسم : . بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : (Biologie, Evolution et Contrôle de Population d'Insectes)

Intitulé :

Evaluation Des Effets d'un Biopesticide Sur Drosophila Mélanogaster

Présenté et soutenu par : Bouhouhou Younes

Le : 30/06/2016

Chorfi Moncef

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Ben Kenana Naima (Mc- UFM Constantine).

Rapporteur : Mme Chaaban Meriem (Ma - UFM Constantine).

Examineurs : Mme Aguib Sihem (Mc - UFM Constantine).

Année universitaire
2015 – 2016

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

*Aux êtres les plus chers à mon coeur, et que j'aime
plus que tout au monde*

*Ma mère la prunelle de mes yeux, l'exemple de tendresse
de patience et d'amour éternel.*

*Mon père, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour
et nuit pour mon éducation et mon
bien être.*

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez
consentis pour mon éducation et ma
formation.*

A mes soeurs.

A ma famille.

A toute ma promotion.

A tous ceux qui m'ont aidé,

A tous ceux qui me sont chers.

Bouhouhou younes.

Chorfi moncef

Remerciements

Notre reconnaissance et nos plus vifs remerciements s'adressent à M madaci M C au département de Biologie Animale, pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Toute notre gratitude et nos sincères remerciements vont à madame CHAABANE meriem, Pour avoir accepté de diriger le présent travail. Sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien moral ainsi que ses orientations nous ont permis de mener à bien ce travail.

trouvent ici nos profonde reconnaissance pour nous avoir fait l'honneur de juger ce travail et nous continuez avec les étudiants .

Merci.

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre 1:Données Bibliographiques.....	4
1. Les insecticide.....	4
2. Historique.....	4
3.1.Les différentes familles d’insecticides et leurs modes d’action.....	5
3.2. Les perturbateurs des processus de croissance et de développement chez l’insecte.....	5
3.2.1. Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine.....	6
3.2.2. Les perturbateurs hormonaux.....	6
3.3. Utilisation de certaines bactéries comme insecticides.....	8
3.3.1. Le système nerveux des insectes, cible majeure des insecticides:.....	8
3.3.2. L’acétylcholinestérase.....	9
4..Définition des biopesticides	9
.	.
Chapitre 2 Matériel et méthodes	10
1. Présentation du matériel biologique.....	12
2. Elevage au laboratoire	13
3. Présentation du pesticide et traitement.....	15
4. Echantillonnage	15
5. Extraction et dosage des métabolites	25
5.1. Extraction des métabolites	20
5.2. Dosages des métabolites.....	17
a/ Dosage des protéines.....	17
b/ Dosage des glucides.....	18
c/ Dosage des lipides.....	19
6. Analyse statistique.....	20

SOMMAIRE

CHAPITRE 3:RESULTAT ET DISCUSSION	
Résultats	24
Discussion.....	34
CHAPITRE 4:CONCLUSION ET PERSPECTIVES	36
Conclusion.....	
Résumé.....	
Références bibliographiques.....	

Liste des figures

Figures	Page
Figure 1. <i>D. melanogaster</i> (Sturtevant, 1921) (× 8)	10
Figure 2. <i>D. melanogaster</i> A male B femelle (Sturtevant, 1921) (× 8)	10
Figure 3. Le cycle de vie de <i>D.melanogaster</i> (Howard, 1900) (x12)	12
Figure 4. Elevage de <i>D. melanogaster</i> (Royaume, 2008).	13
Figure 5. surface épineuse de la bactérie	14
Figure 6. Coupe longitudinale de la bactérie	14
Figure 7. Structure du spinosad (Horowitz & Ishaaya, 2003)	14
Figure 8. Extraction (Shibko <i>et al</i> , 1966) et dosage des métabolites dans le corps entier de différents stades de développement chez <i>D.melanogaster</i>	16
Figure 9. Dosage des protéines dans les différents stades de développement de <i>D.melanogaster</i> : droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).	17
Figure 10 Dosage des glucides dans les différents stades de développement de <i>D. melanogaster</i> : droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose (µg).	18
Figure 11. Dosage des lipides dans les différents stades de développement de <i>D. melanogaster</i> : droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité de l'huile de table (µg).	19
Figure 12. Effet, <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI ; 295,12 ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier (µg/mg) des pupes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jour. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries (m ± s ; n=4). (*) Différences significatives.	22
Figure 13. Effet, <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI ; 295,12 ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier (µg/mg) des adultes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries (m ± s ; n=4). Comparaison entre séries témoins et traitées. (*) Différences significatives.	23

<p>Figure 14. Effet <i>in vivo</i>, du spinosad testé par application topique (CI ; 295,12 ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).</p> <p>Comparaison entre séries témoins et traitées :</p> <p>(**) Différences très significatives</p> <p>(***) Différences hautement significative.</p>	<p>25</p>
<p>Figure 15. Effet <i>in vivo</i>, du spinosad testé par application topique (CI ; 295,12 ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).</p> <p>Comparaison entre séries témoins et traitées :</p> <p>(***) Différences hautement significative</p>	<p>25</p>
<p>Figure 16. Effet <i>in vivo</i>, du spinosad testé par application topique (CI ; 295,12 ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$). Comparaison entre séries témoins et traitées :</p> <p>(*) Différence significatives.</p>	<p>27</p>
<p>Figure 17. Effet <i>in vivo</i>, du spinosad testé par application topique (CI ; 295,12 ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$). Comparaison entre séries témoins et traitées</p>	<p>28</p>

Liste des tableaux

Tableaux	Page
Tableau 1: Dosage des protéines pour les différents stades de développement de <i>D. melanogaster</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	17
Tableau 2: Dosage des glucides dans les différents stades de développement de <i>D. melanogaster</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	18
Tableau 3: Dosage des lipides dans les différents stades de développement de <i>D. melanogaster</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	19
Tableau 4. Effets, <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 295,12ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. ($m \pm s$; $n=4$). Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries	21
Tableau 5. Effets, <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 295,12ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de <i>D. melanogaster</i> âgées de 0 jour. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).	22
Tableau 6. Effets <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 295,12ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).	24
Tableau 7. Effets <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 295,12ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).	24
Tableau 8. Effets <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 295,12ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).	26
Tableau 9. Effets <i>in vivo</i> , du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 295,12ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de <i>D.melanogaster</i> âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).	26

Chapitre 1 : Introduction

Les insectes jouent un rôle considérable dans l'équilibre biologique de la nature .En effet, malgré un rôle écologique incontestable, les insectes peuvent avoir une incidence économique néfaste sur les productions agricoles et être responsables de la transmission d'agents pathogènes à l'homme ou à l'animal. Les méthodes de lutte contre ces espèces nuisibles sont basées, généralement, sur l'utilisation de molécules chimiques ou pesticides de synthèse (Ouédraogo, 2005). Le terme pesticide est un terme qui inclut tous les produits chimiques qui sont utilisés pour tuer tous types de « pestes » ou contrôler des fléaux ; à titre d'exemple, il convient de citer les, herbicides (mauvaises herbes), fongicides (champignons), insecticides (insectes), acaricides (acariens) etc. (Bouguerra, 1986).

Les pesticides sont un facteur majeur d'incidence sur la diversité biologique ; en effet, ils peuvent avoir des effets toxiques à court ou long terme sur les organismes qui y sont directement exposés. Selon Metcalf (1994), les avantages des pesticides se résument par les qualités suivantes : facilité de mise en œuvre, simplicité d'emploi, efficacité, flexibilité d'utilisation et coût économique raisonnable. Les pesticides hautement toxiques pour les insectes bénéfiques tels que les abeilles, les araignées et les coléoptères, sont : les carbamates (ex. : aldicarbe, benomyl, carbofurane, methiocarbe), les organophosphorés (chlorpyrifos, diazinon, dimethoate, fenitrothion), les pyréthroïdes (ex. : cyfluthrine, cyhalothrine) Récemment, le clothianidine utilisé dans les traitements de semences a causé un empoisonnement important d'abeilles (Spiegel, 2008). En outre, les résidus d'imidaclopride dans les plantes peuvent altérer de façon néfaste le comportement des insectes (Bonmatin *et al*, 2005).

Parmi les « biopesticides » ou produits dérivés de sources naturelles (Miller *et al*, 1983), se trouve les néonicotinoïdes, l'azadirachtine ou encore le spinosad (Copping et Menn, 2002). Les néonicotinoïdes, insecticides d'origine végétale, sont efficaces et agissent *via* les récepteurs de l'acétylcholine nicotinyne sur le système nerveux central et périphérique des insectes (Kiryama *et al*, 2003). L'azadirachtine, extrait du Neem (arbre asiatique) semble agir comme un régulateur de croissance (Mordue *et al*, 2005) avec une action antagoniste des deux principales hormones de reproduction et du développement des insectes (l'hormone juvénile les ecdystéroïdes). Le spinosad, composé de deux spinosynes (A et D) (Kollman, 2003), est obtenu à partir de la fermentation d'une bactérie « Actinomycète » *Saccharopolyspora*

Chapitre 1 : Introduction

spinoso, découverte dans un échantillon de sol des Caraïbes en 1982 (Larson *et al.*, 1999). Il agit par contact ou ingestion sur le système nerveux non seulement au niveau des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine mais aussi des récepteurs Gabaergiques (Salgado, 1998). Cette dualité d'action pourrait augmenter son efficacité, (Rocheffort *et al.*, 2006) ; par ailleurs, l'effet potentiel du spinosad sur les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine est encore à rechercher. Cette molécule neurotoxique, mène à un arrêt de l'alimentation, une contraction musculaire involontaire puis à une paralysie ; il semble que l'ingestion s'avère être 5 à 10 fois plus efficace que le simple contact (Thompson, 1999) et le spinosad ne requiert aucune manipulation spéciale ou limitation d'emploi (Cuddeford, 2007) ; par ailleurs, du fait de sa faible toxicité pour les mammifères, les oiseaux et les poissons (Jaquet, 2002), le spinosad, considéré comme produit à risque réduit (Cineros *et al.*, 2002) est hautement compatible avec les programmes de lutte intégrée. Le spinosad se dégrade dans l'environnement *via* différents procédés dont l'hydrolyse, la phototransformation, la photolyse et la biotransformation aérobiques (Hale *et al.*, 1996).

La biodégradabilité du spinosad et sa grande efficacité dans le contrôle d'une large majorité d'insectes (Lépidoptères, Diptères, Thysanoptères, Orthoptères, Coléoptères) (Larson *et al.*, 1999), sont des critères essentiels dans le choix pesticide mais cela ne peut éviter, à long terme, l'installation de la résistance aux insecticides. Ce phénomène se développe de façon inquiétante mais les connaissances acquises, très récemment, par la biologie moléculaire laissent entrevoir des possibilités de gestion de la résistance (Haubruge *et al.*, 1998). Cependant, ceci ne peut s'envisager qu'après la détection des différents types de résistance sur des bases moléculaires avec la mise en évidence des gènes de résistance (Nicholson, 1980). Les trois mécanismes principaux de résistance sont comportementales physiologiques et biochimiques ; chez l'insecte, on distingue deux catégories de mécanismes comportementaux de résistance, qui permettent aux individus d'éviter le contact avec le produit toxique ou qui limitent la durée de ce contact (Lockwood *et al.*, 1984), la résistance physiologique s'exprime au niveau des tissus et organes ; elle est caractérisée par une diminution de la pénétration ou par une augmentation de l'excrétion des insecticides (Tanaka, 1981). La résistance biochimique se situe au niveau cellulaire; elle consiste d'une part, en une augmentation de l'activité enzymatique des systèmes de détoxification, et d'autre part, en une diminution de l'affinité des sites d'action vis-à-vis des insecticides (Oppenoorth, 1985).

Chapitre 1 : Introduction

Le spinosad est utilisé en Algérie, depuis 2010, en agriculture, aussi il est important de savoir quand et comment s'installe le processus de résistance à l'égard de ce pesticide naturel chez les organismes visés. Cependant, il est tout d'abord nécessaire d'appréhender les effets toxiques de cette molécule dans les différents compartiments de l'insecte. En effet, l'étude de résistance aux insecticides s'appuie fortement sur des études de physiotoxicité avec des analyses biochimiques et moléculaires (Trent *et al*, 2011).

Aussi, nous nous proposons de tester le spinosad et d'évaluer sa physiotoxicité sur un Diptère de référence en biologie qui est *Drosophila melanogaster* ; cette espèce constitue un modèle biologique de choix pour toute étude de toxicité en laboratoire de par son élevage facile et son cycle biologique très court. Par ailleurs, le séquençage complet de son génome permet d'aborder des expérimentations, au niveau moléculaire, liées à la résistance (Alberts *et al*, 1999) Cependant, il paraît nécessaire, dans un premier temps, de mettre en évidence les impacts physiologiques et biochimiques du pesticide. L'objectif de ce travail est donc d'évaluer les effets du spinosad sur les métabolites (protéines, glucides et lipides corporels), principaux marqueurs biochimiques de « fitness ». La physiotoxicité du spinosad a été déterminée au cours de deux générations successives de *D. melanogaster*, la génération parent (G0) et la première génération ou G1 afin de préciser la rémanence potentielle du spinosad.

Chapitre 1 : Données Bibliographique

1. Les insecticides

Les insecticides sont des substances qui permettent l'élimination des arthropodes. Ils peuvent être utilisés contre les larves et/ou les œufs (larvicides) ou encore contre les adultes. Ils doivent être nocifs vis à vis des insectes ravageurs mais aussi relativement inoffensifs pour les organismes non cibles.

2. Historique

La lutte contre ces organismes existe depuis des millénaires. L'usage du soufre est apparu chez les Sumériens vers 2000 ans avant Jésus-Christ et l'arsenic était recommandé par Pline (naturaliste romain) en tant qu'insecticide.

En 1690, Jean de la Quintinie a décrit les propriétés insecticides du tabac (nicotine). Cependant, ce n'est qu'au XIX^e siècle que l'utilisation des pesticides a connu un développement important. 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 insecticides apparaissent alors avec l'utilisation de l'arsenic pour lutter contre les insectes ravageurs (ex: arséniate de plomb contre l'Eudémis de la vigne). Néanmoins, le véritable essor des pesticides de synthèse débute au XX^e siècle. On assiste à un développement considérable des insecticides organiques qui sont majoritairement des composés organochlorés. Le DDT (dichlorodiphényltri chloroéthane) a été synthétisé en 1874 par Othman et Zeidler et ses propriétés insecticides furent découvertes en 1939 par Müller et Weissman. Il fut très efficace dans la lutte contre les insectes ravageurs comme les moustiques vecteurs du paludisme. D'autres organochlorés furent utilisés comme le HCH

(hexachlorocyclohexane), l'endosulfan, l'aldrine ou la dieldrine. Au cours de la seconde moitié du XX^e siècle, de nombreuses découvertes ont permis d'enrichir la famille des pesticides dans le domaine agricole notamment par les recherches menées sur les gaz de combat durant la seconde guerre mondiale. Des insecticides très efficaces apparaissent alors. Tout d'abord, la famille des organophosphorés dont les propriétés ont été mises en évidence en 1936 et qui se développent à partir de 1944 avec le malathion, le dichlorvos ou encore le parathion. En 1957, le premier insecticide appartenant à une nouvelle famille, les carbamates, est décrit: le carbaryl qui sera suivi par le carbosulfan ou encore l'aldicarbe. Dans les années 1970-1980, une autre famille

Chapitre 1: Données Bibliographique

d'insecticides est découverte: les pyréthrinoïdes, analogues de synthèse des pyréthrines, substances présentes dans les fleurs de chrysanthème. Certaines molécules sont encore utilisées actuellement comme la perméthrine, la cyperméthrine et la deltaméthrine. Les benzoylurées apparaissent en 1972 avec le diflubenzuron puis les phénylpyrazoles en 1993 avec le fipronil. Dans les années 1970s puis 1980s, des recherches basées sur la structure de la nicotine ont permis le développement d'une nouvelle famille d'insecticides, les néonicotinoïdes (Jeschke et Nauen, 2008). La commercialisation de l'imidaclopride débute en 1994 et il sera suivi par d'autres substances comme le thiaclopride, le nitenpyrame ou encore le clothianidine. Les néonicotinoïdes dominent actuellement le marché des insecticides.

3. Les différentes familles d'insecticides et leurs modes d'action

Au cours de ces dernières années de nombreuses familles d'insecticides sont apparues. Elles peuvent être classées par groupe selon leurs modes d'action et la cible visée (Insecticide mode of action classification, IRAC 2012). Ces cibles sont variées et correspondent à des enzymes, des protéines, des canaux, des récepteurs... Certaines familles agissent sur la croissance en perturbant la mue des insectes (famille des diacylhydrazines), d'autres comme les benzoylurées perturbent leurs développements.

Les insecticides interviennent également dans la respiration cellulaire ou encore au niveau des muscles pour une toute petite partie d'entre eux. Certaines bactéries comme *Bacillus thuringiensis* peuvent être aussi utilisées car elles produisent des endotoxines, délétères pour l'insecte.

Cependant une classe reste largement majoritaire de part son efficacité élevée, elle correspond aux neurotoxiques. Ils agissent au niveau du système nerveux et renferment plusieurs familles d'insecticides comme les organochlorés ou les néonicotinoïdes.

D'autres insecticides sont également utilisés mais la cible et le mode d'action restent incertains ou méconnus comme le bifénazate (Casida, 2009). Toutes ces familles d'insecticides agissent donc au niveau de cibles bien distinctes que je vais détailler par la suite.

3.1. Les perturbateurs des processus de croissance et de développement chez l'insecte

Ces insecticides ayant un rôle sur la croissance et le développement de l'insecte sont souvent utilisés en cas d'échec d'autres familles d'insecticides. Chez le moustique en particulier, après l'apparition de résistance aux pyréthrinoïdes et aux organophosphates, des insecticides de ce type ont été utilisés (Belinato *et al.*, 2013). Ils agissent en tant que régulateurs de croissance des insectes (IGR, Insect Growth Regulators). Les IGRs ont été classés en 2 groupes, le

Chapitre 1: Données Bibliographique

premier correspond aux inhibiteurs de la synthèse de la chitine qui intervient dans la formation de la cuticule et le deuxième correspond à des substances qui perturbent l'action des hormones spécifiques des insectes (hormones juvéniles et ecdysone) (Tunaz et Uygun, 2004).

3.2. Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine:

La chitine est un biopolymère très répandu dans la nature qui est produit par les insectes et particulier. Elle est le composant majeur de la cuticule qui constitue l'exosquelette chez les insectes. La chitine est également présente dans la matrice péritrophique, couche protectrice de l'intestin moyen des insectes contre l'attaque de pathogènes ou de toxines (Merzendorfer et Zimoch, 2003).

La synthèse de la chitine est un processus crucial pour la croissance et le développement de l'insecte. En effet, elle est le constituant majoritaire de la cuticule que l'insecte remplace régulièrement à travers le phénomène de mue. L'inhibition de la synthèse de la chitine induit des perturbations dans la formation de la cuticule et la mue avorte. C'est pourquoi des inhibiteurs de la synthèse de la chitine ont été développés en tant qu'insecticides comme les benzoylurées .

Ces insecticides ont une faible persistance dans l'environnement et ils sont presque sans danger pour les organismes non cibles. Ces insecticides restent utilisés dans le domaine de l'arboriculture, la sylviculture et la santé publique pour l'élimination des moustiques vecteurs de maladies humaines. Les benzoylurées représentent 3% du marché mondial (Sparks, 2013).

3.3. Les perturbateurs hormonaux:

Chez les insectes, le développement est rythmé par des processus de mues. Les mues de croissance permettent à la larve d'augmenter sa taille alors que les mues de métamorphose induisent de nombreux changements morphologiques aboutissant à l'imago. Ces différentes étapes sont régulées par deux hormones principales: l'ecdysone, hormone stéroïdienne de mue (active sous forme de 20-hydroxyecdysone, 20E) et les hormones juvéniles (JH) (Dhadialla *et al.*, 1998).

Au niveau moléculaire, la cible de la 20E est un récepteur nucléaire, un hétérodimère composé de EcR (ecdysteroid receptor) et de USP (ultraspiracle). Ces deux protéines font partie de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et présentent un domaine de liaison à l'ADN. Le complexe 20E-récepteur va ensuite se lier à l'ADN au niveau de sites spécifiques et jouer le rôle de facteur de transcription pour des gènes cibles impliqués dans les processus de mues (Dubrovsky, 2005). Ce processus démarre avec l'augmentation de la quantité de la 20E. Chez la

Chapitre 1: Données Bibliographique

drosophile, cette hormone est sécrétée par les glandes prothoraciques au niveau du cerveau de la larve. Suite à l'augmentation de la 20E, la larve arrête de se nourrir. L'ancienne cuticule se détache des cellules de l'épiderme (l'apolyse) et crée un espace qui se remplit de liquide exuvial contenant des enzymes chitinolytiques inactives. Sous l'influence de la 20E, les cellules de l'épiderme s'organisent pour produire massivement les constituants de la nouvelle cuticule. Une fois que la quantité de 20E diminue, les enzymes chitinolytiques sont activées pour digérer une partie de l'ancienne cuticule. Le liquide exuvial est ensuite réabsorbé suivi d'une libération de l'hormone d'éclosion, permettant l'exuviation. Le déclenchement des mues est donc dû à une augmentation de 20E. Si cette hormone agit en synergie avec les hormones juvéniles, une mue larvaire sera déclenchée. Durant le dernier stade larvaire, une action de la 20E en absence d'hormones juvéniles va permettre l'induction non plus de mues larvaires mais de mue de métamorphose. Ces processus de croissance et de développement sont très bien coordonnés principalement par la 20E et les hormones juvéniles. Une perturbation dans l'homéostasie d'une de ces hormones peut avoir des conséquences dramatiques pour l'insecte.

Ainsi des analogues d'hormones spécifiques des insectes ont été utilisés comme insecticides pour le contrôle des nuisibles en agriculture. La famille la plus importante correspond aux diacylhydrazines, agonistes d'ecdystéroïdes. Découverts par Rohm et Haas dans les années 1980s, ces composants provoquent une mue prématurée chez les insectes cibles, qui conduit à la mort de la larve. Ces produits sont donc désignés comme accélérateurs de mues (Fahrbach et al, 2012). L'avantage de ces insecticides réside dans leur spécificité d'action. Par exemple, le tebufénozide est toxique pour les lépidoptères mais très faiblement toxique pour les autres espèces comme les coléoptères, les diptères, les pollinisateurs comme l'abeille ainsi que les mammifères (Dhadialla et al., 1998).

Ils ont également une faible rémanence dans l'environnement. D'autres études ont permis le développement de nouveaux insecticides comme le tétrahydroquinoline pour lutter spécifiquement contre les moustiques (Fahrbach et al, 2012). Ces insecticides sont principalement utilisés dans l'arboriculture et la viticulture. Cependant ces insecticides ont une action plus lente que les neurotoxiques, ce qui provoque des pertes plus importantes dans les cultures utilisant ces insecticides. Les diacylhydrazines représentent 1% du marché mondial des insecticides (Sparks, 2013).

4. Utilisation de certaines bactéries comme insecticides:

Certaines bactéries, en particulier *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), sont pathogènes pour certaines catégories d'insectes (coléoptères, diptères, lépidoptères principalement) surtout durant les stades larvaires (Bravo et al., 2011). *Bt* a la capacité de synthétiser des inclusions cristallines associées aux spores ayant des propriétés insecticides. Elles sont formées de protéines variées appelées toxines Cry (Bravo et al., 2011).

Une fois ingérées (inclusions cristallines-spores) par les larves des insectes, les protoxines contenues dans les inclusions sont solubilisées par les protéases de l'intestin moyen, libérant ainsi les δ -endotoxines. Ces protéines toxiques vont ensuite se lier aux récepteurs cadherin-like situés à la surface des microvillosités des cellules épithéliales et subir une protéolyse. Cette étape va permettre l'oligomérisation des protéines toxiques puis la liaison avec d'autres types de récepteurs (GPI anchored receptor) et enfin l'insertion dans la membrane des cellules épithéliales pour former des pores (Figure 9). Cette étape va induire un choc osmotique au niveau de l'intestin moyen et favoriser la germination des spores. *Bt* va alors se multiplier et se répandre dans l'organisme provoquant la mort de l'insecte par septicémie (Nielsen-LeRoux et al., 2012).

Grâce à ses propriétés insecticides, *Bt* est utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles dans certaines cultures (vignes, arbres fruitiers), dans le domaine de la sylviculture, le stockage de graines et contre les moustiques, vecteurs de maladies humaines. Les insecticides contenant *Bt* représentent environ 2% du marché mondial actuel (Bravo et al., 2011). Ces insecticides sont principalement commercialisés sous forme de suspension de spores mais l'usage commercial est limité.

4.1. Le système nerveux des insectes, cible majeure des insecticides:

Les neurotoxiques restent la classe la plus importante qui correspond à plus de 75% du marché mondial des insecticides (Casida, 2009). Ils agissent au niveau du système nerveux des insectes en perturbant la transmission synaptique. Les neurotoxiques ont l'avantage d'agir rapidement et efficacement pour stopper les dégâts engendrés dans les cultures. Ils agissent également sur les insectes vecteurs de maladies humaines comme le moustique (Casida et Durkin, 2013). Ces neurotoxiques ont pour cibles majeures: (1) les récepteurs canaux de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), cibles des phénylpyrazoles et de certains organochlorés, (2) les canaux sodium voltage-dépendant, cibles des pyréthriinoïdes et de certains organochlorés, (3) l'acétylcholinestérase, cible

Chapitre 1: Données Bibliographique

des organophosphorés et des carbamates et (4) le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR), cible des spinosynes et des néonicotinoïdes.

4.2. L'acétylcholinestérase:

L'acétylcholinestérase est la cible des organophosphorés et des carbamates. Cette enzyme hydrolyse l'acétylcholine pour stopper la transmission synaptique et réguler la concentration de ce neurotransmetteur dans la synapse cholinergique. L'acétylcholine réagit avec les sites actifs de l'acétylcholinestérase (site anionique et la triade catalytique: Ser-His-Glu) et subit une hydrolyse. La choline est ainsi libérée et un intermédiaire "acétyl-enzyme" est formé (Soreq et Seidman, 2001). Une deuxième étape d'hydrolyse permet la libération d'acétate et régénère l'acétylcholinestérase.

Ce mécanisme est perturbé par les organophosphorés et les carbamates. Les carbamates et les organophosphorés sont toujours utilisés à ce jour contre les moustiques vecteurs de maladies humaines, en agriculture et horticulture (Figure 19). Des études sont en cours pour améliorer la sélectivité insectes/mammifères. Actuellement, les organophosphorés représentent 13% et les carbamates 6% du marché mondial (Sparks, 2013).

5. Définition des biopesticides:

les biopesticides contraction de <<pesticide biologiques >> aussi sont définis comme <<une forme de pesticides basée sur des micro-organismes ou des produits naturels>> ces produits sont typiquement produits par la concentration d'organismes naturels ou de leur métabolites dont des bactéries et autres microbes des champignons des nématodes comprennent plusieurs types de méthode de lutte contre les ravageurs et maladies les biopesticides les plus connus sont ceux fabriquée à partir de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (BT) un insecticide communément utilisé en agriculture biologique mais de nombreux autres ingrédients actifs sont également disponibles (abbott, 1925)

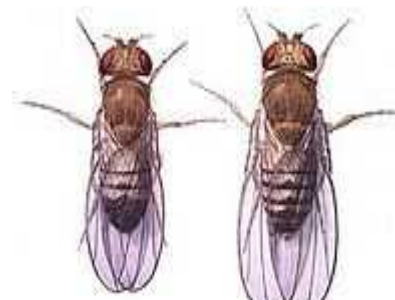
Chapitre 2:matériel et méthodes

1. Présentation du matériel biologique

D. melanogaster, organisme modèle, est aussi appelée mouche du vinaigre (Fig.1). C'est un insecte hygrophile, et holométabole à métamorphose complète (Colombani et al., 2006). Ces mouches, aux yeux rouge vif, sont de couleur brun jaunâtre, avec des anneaux transversaux noirs au travers de l'abdomen (Wolfgang & Werner, 1992). Les adultes de *D. melanogaster* ont un poids moyen de 0.54 mg et une longévité de 30 jours à une température de 29° C. Un dimorphisme sexuel est présent ; en effet, les femelles mesurent environ 3 à 4 millimètres de long mais les mâles, un peu plus petits (3 millimètres) ont la partie arrière de leur corps plus foncée (Fig. 2). *D. melanogaster* présente un potentiel reproducteur important (Griffiths et al. 2002) (les femelles peuvent pondre jusqu'à 500 œufs en dix jours) .



Figure 1 : *D. melanogaster*
(Sturtevant, 1921) (× 8)



A B
Figure 2 : *D.melanogaster*
A mâle B femelle (Sturtevant, 1921) (× 8)

Règne	: Animalia
Embranchement	:Arthropoda
Sous embranchement	: Hexapoda
Classe	: Insecta
Sous-classe	: Pterygota
Infra-classe	: Neoptera
Ordre	: Diptera
Sous-ordre	: Brachycera
Infra-ordre	: Muscomorpha
Famille	: Drosophilidae
Sous-famille	: Drosophilinae
Genre	: <i>Drosophila</i>
Espèce	: <i>melanogaster</i> (Miegen, 1830).

Chapitre 2 : matériel et méthodes

Le cycle biologique de *D. melanogaster* (Fig. 3) s'effectue en moyenne en 11 jours à 25° C. La vitesse de développement est fonction de la température car cette espèce y est très sensible. *D. melanogaster*, présentant des larves (larves de type « asticot ») bien différenciées morphologiquement de l'adulte, passe successivement par les stades suivants :

- **Œuf** : petit, blanc, nanti de deux filaments respiratoires.
- **Larve** (le seul stade pendant lequel l'animal grandit) : vermiforme, blanche, se nourrissant continuellement. Elle n'arrête pas de creuser des galeries dans le milieu nutritif. Au cours de sa croissance, la larve passe par trois stades successifs séparés par des mues.
- **Pupe** (stade de transformation intense, dans une sorte de cocon) : à la fin du dernier stade larvaire, la larve sort du milieu nutritif, gagne un endroit sec, s'y fixe et se métamorphose. Elle apparaît alors comme une sorte de graine brunâtre sur la paroi interne du flacon d'élevage. Ce stade est appelé pupaison et dure environ 4 jours à 25°C.
- **Adulte** (la mouche a acquis sa forme définitive ailée) : au cours de sa vie en apparence immobile à l'intérieur de la pupa, l'animal s'est transformé très profondément pour acquérir des pattes, des ailes, etc. Lors de la mue imaginale, l'adulte apparaît d'abord difforme et blanchâtre, mais il se pigmente et s'active rapidement. En l'espace de quelques heures, il a acquis sa taille, son aspect définitif mais aussi la maturité sexuelle ; c'est seulement à ce dernier stade (Adulte) que la drosophile est capable de se reproduire (maturité sexuelle). L'adulte femelle devient fécondable après 8-10 heures et commence à pondre deux jours plus tard.

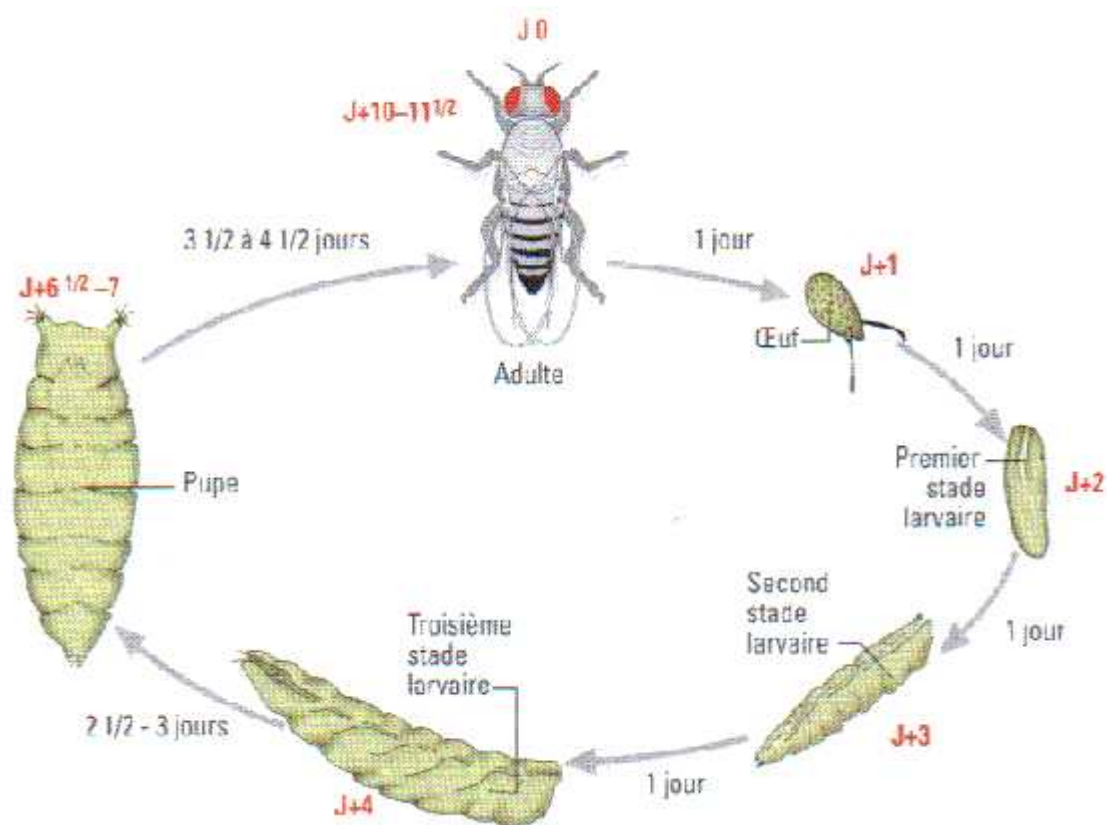


Figure 3. Le cycle de vie de *D.melanogaster* (Howard, 1900) (x12)

2. Elevage au laboratoire

L'élevage se fait sur milieu artificiel, en conditions contrôlées (température : 25°C ; hygrométrie : 70% ; scotophase : 12 h.) dans des tubes avec des bouchons en mousse (Fig. 4) ou dans des bouteilles de stockages (élevages de masse). Le milieu nutritif constitue le milieu dans lequel se développeront les larves ; aussi et afin d'éviter l'engluement, il doit être solide, sans cependant être trop compact pour permettre l'évolution des larves.

Ce milieu gélosé est composée de 33,3 g semoule de maïs, 33,3 g levure de bière, 4,8 g d'agar-agar et de l'eau distillée selon nécessité, Le mélange est porté à ébullition pendant 1 à 2 minutes en agitant sans arrêt pour ne pas accrocher au fond de la casserole. Après refroidissement on ajoute 20 ml d'antifongique (une solution d'acide benzoïque 95% dans de l'éthanol à 70 %). Le substrat est déversé dans des flacons de plastique qui seront bouchés par un tampon de mousse laissant passer l'air.



Figure 4 : Elevage de *D. melanogaster* (Royaume, 2008).

3. Présentation du pesticide et traitement

Le spinosad, pesticide naturel, est issue de la fermentation naturelle (processus découvert en 1982) d'une bactérie Actinomycète (Thompson *et al.*, 2000), présente naturellement dans le sol appelée *saccharopolyspora spinosa*. Le spinosad, suspension concentrée (SC) blanche cristalline, correspond à un mélange de deux molécules responsables de son activité et qui sont appelées spinosyns A et D (Sparks *et al.*, 1995). (Fig.5 et 6).

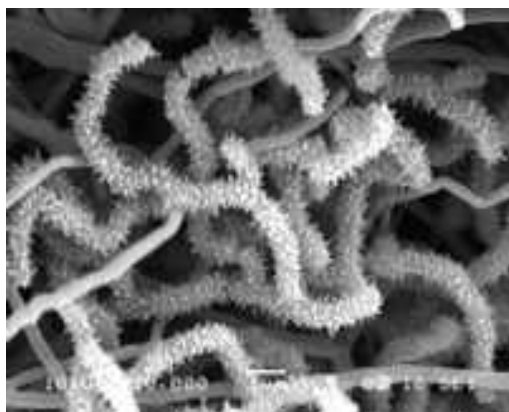


Figure 5: surface épineuse de la bactérie

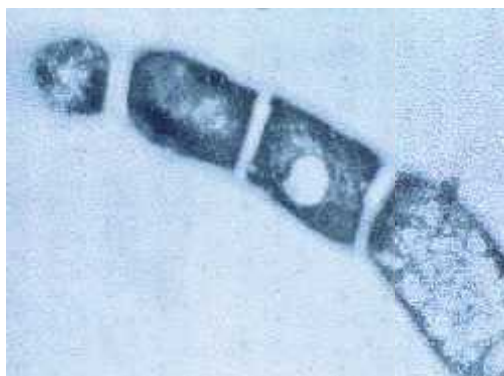


Figure 6: Coupe longitudinale de la bactérie

La figure 7 présente la structure chimique du spinosad avec un radical R correspond soit à un hydrogène pour la spinosyne A, soit à un méthyle pour la spinosyne D. La spinosyne-A de formule chimique $C_{41}H_{65}NO_{10}$ et la spinosyne-D $C_{42}H_{67}NO_{10}$ (EPA, 1997). Le poids moléculaire est de 731,95 g/mol pour la spinosyne A et 745,98 g/mol pour la spinosyne D (Deardorff et Stark, 2009).

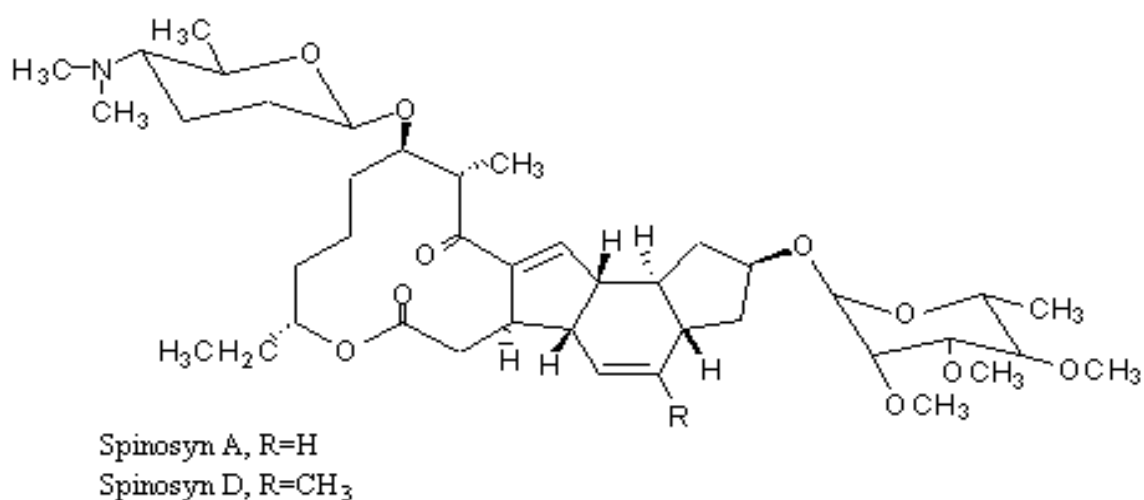


Figure 7. Structure du spinosad (Horowitz & Ishaaya, 2003)

Le spinosad a été testé, *in vivo*, à une concentration de 288,50 ppm préalablement déterminée, (Chaabane, et *al*, données non publiées) correspondant à la concentration d'inhibition de 50% de la mue nymphale ou CI 50 chez *D. melanogaster*. L'insecticide a été administré, par application topique (1 µl par insecte) sur la face ventrale des larves de dernier stade de *D. melanogaster* (L3), à l'aide d'une micro-seringue. Les individus de la série témoin reçoivent uniquement le solvant qui est l'acétone (1 µl). Le traitement est effectué sur les larves de la G0 seulement.

4. Echantillonnage

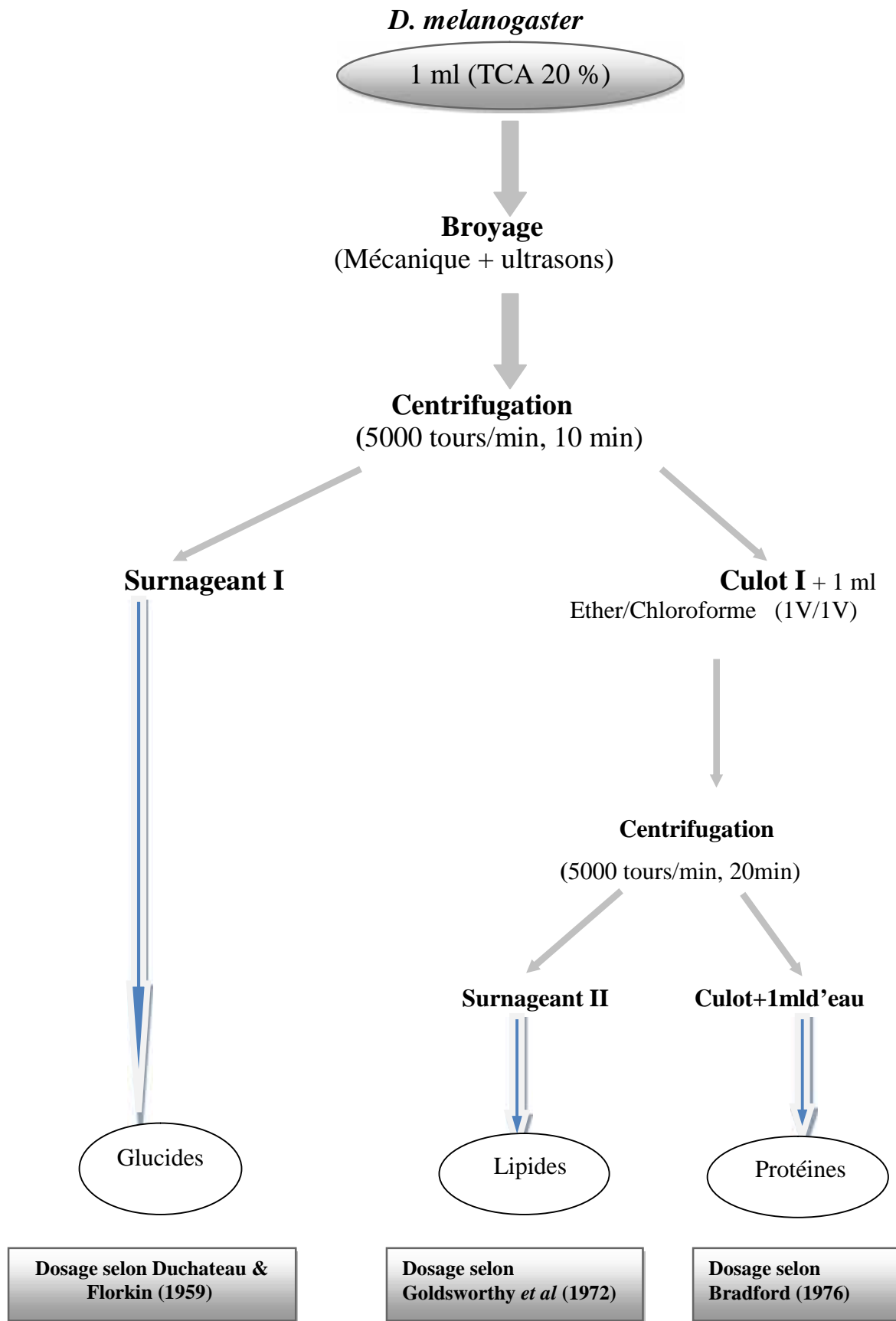
Les différents échantillons correspondent à des pupes et des adultes âgées de 0 jours, des séries témoins et traitées avec le spinosad appartenant à deux générations successives, la génération parents (G0) et à la génération 1 (G1). Les échantillons prélevés sont conservés dans 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA à 20 %) jusqu'au dosage.

5. Extraction et dosage des métabolites

5.1. Extraction des métabolites

L'extraction des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1966) (Fig.8). Après homogénéisation, aux ultrasons, des corps entier des différentes stades de développement de *D. melanogaster*, conservées dans du TCA, une centrifugation (5000 tours/min pendant 10 min), permet d'obtenir un premier surnageant qui servira pour le dosage des glucides. Ce premier culot est récupéré dans 1 ml d'un mélange éther/ chloroforme (V/V) et une deuxième centrifugation (5000 tours/min pendant 20 min) permettra de récupérer le surnageant II qui servira au dosage des lipides. Le culot II servira ensuite pour le dosage des protéines après addition de 1 ml d'eau distillée.

Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes (100 µl) et les teneurs dans les différents métabolites ont été quantifiés par des droites de régression déterminées à partir des courbes de références.



Chapitre 2 : matériel et méthodes

Figure 8. Extraction (Shibko *et al*, 1966) et dosage des métabolites dans le corps entier de différents stades de développement chez *D.melanogaster*.

5.2. Dosages des métabolites

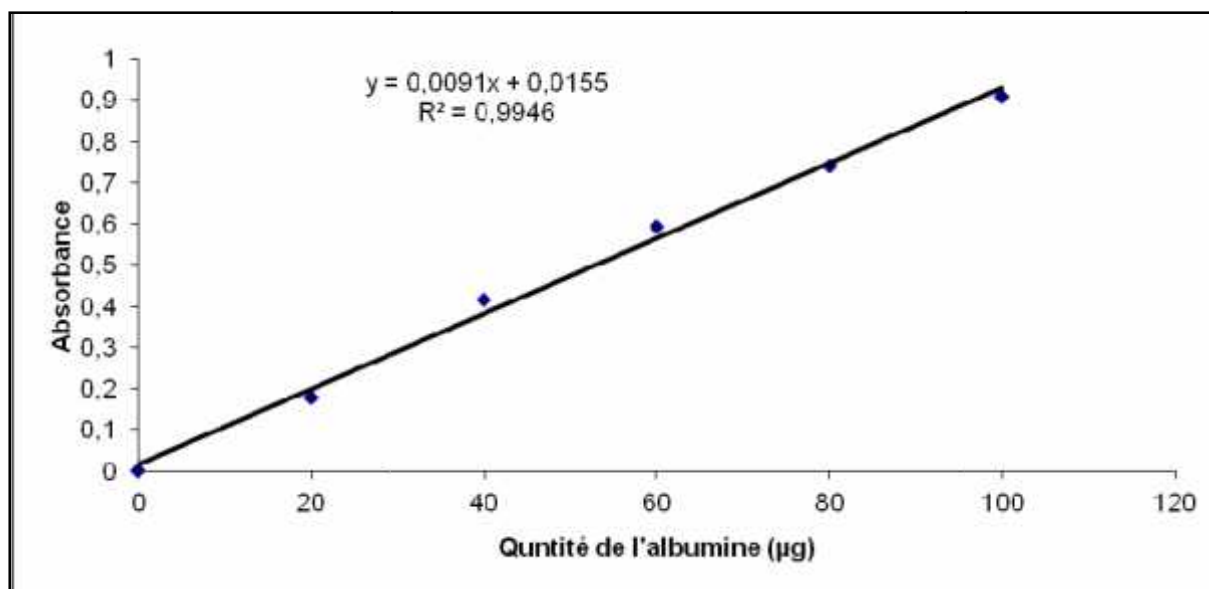
a/ Dosage des protéines

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de coomassie¹ G 250 comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (1 mg/ml) comme standard. Le dosage des protéines dans le corps des mouches a été effectué dans une fraction aliquote de 100 µl. la lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme (Tab.1 ; Fig. 9).

1- 100 mg de BBC+50 ml d'éthanol+Agitation pendant 2 heures, 100 ml d'acide ortho phosphorique à 80% sont alors rajoutés et le tout est complété à 1000 ml avec l'eau distillée.

Tableau 1. Dosage des protéines pour les différents stades de développement de *D. melanogaster* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité de protéines (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbances	0	0,179	0,416	0,593	0,741	0,908



Chapitre 2 : matériel et méthodes

Figure 9. Dosage des protéines dans les différents stades de développement de *D.melanogaster* : droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (μg).

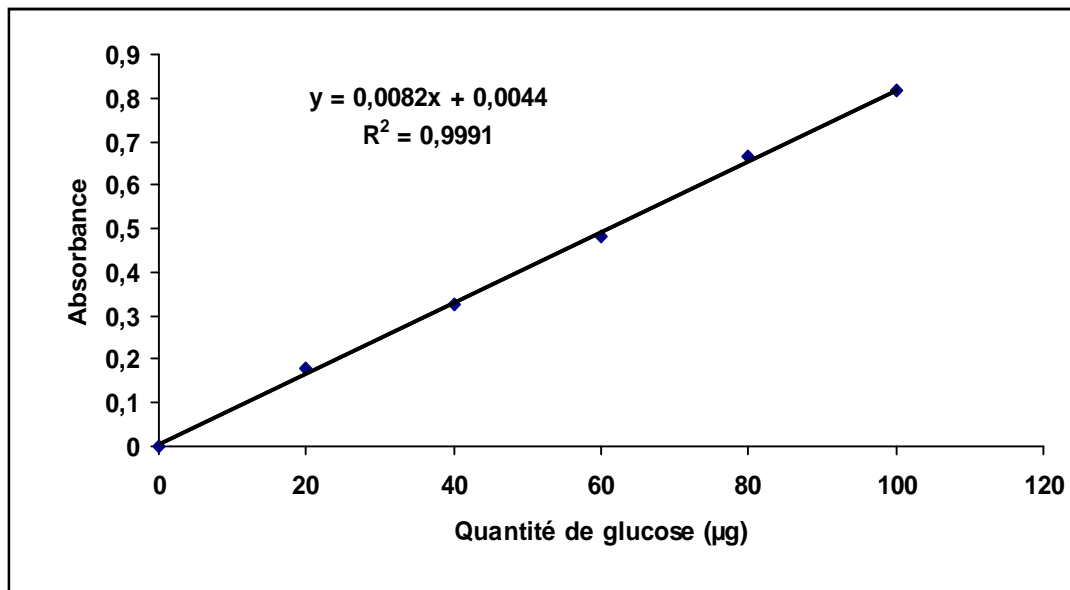
b/ Dosage des glucides

Le dosage des glucides a été réalisé selon Duchateau et Florkin (1959) qui utilise l'antrone² comme réactif et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard. Le dosage des glucides dans le corps des mouches a été effectué dans une fraction aliquote de 100 μl . la lecture des absorbances est réalisée à 620 nm contre un blanc de gamme (Tab. 2 ; Fig. 10).

2- 250 mg d'antrone+ 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée.

Tableau 2. Dosage des glucides dans les différents stades de développement de *D. melanogaster* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Glucose (μl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (μl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité de glucose (μg)	0	20	40	60	80	100
Absorbances	0	0,180	0,325	0,483	0,666	0,818



Chapitre 2 : matériel et méthodes

Figure 10. Dosage des glucides dans les différents stades de développement de *D. melanogaster* : droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose (μg).

c/ Dosage des lipides

Les lipides ont été déterminés selon la méthode de Goldworthy *et al.* (1972) utilisant la vaniline³ comme réactif et une solution mère de lipides (2,5mg/ml) comme standard. Le dosage des lipides dans le corps des mouches a été effectué dans une fraction aliquote de 100 μl . Les absorbances sont lues, après 30 minutes d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm (Tab. 3 ; Fig. 11).

3- 0,38g de vanilline+55ml d'eau distillée+195ml d'acide ortho-phosphorique à 85% -25mg d'huile de table+10ml de solvant éther/chloroforme (v/v).

Tableau 3. Dosage des lipides dans les différents stades de développement de *D. melanogaster* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (μl)	0	20	40	60	80	100
Solvant Ether-chloroforme (μl)	100	80	60	40	20	0
Vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Quantité de lipides (μg)	0	50	100	150	200	250
Absorbances	0	0,082	0,193	0,278	0,393	0,510

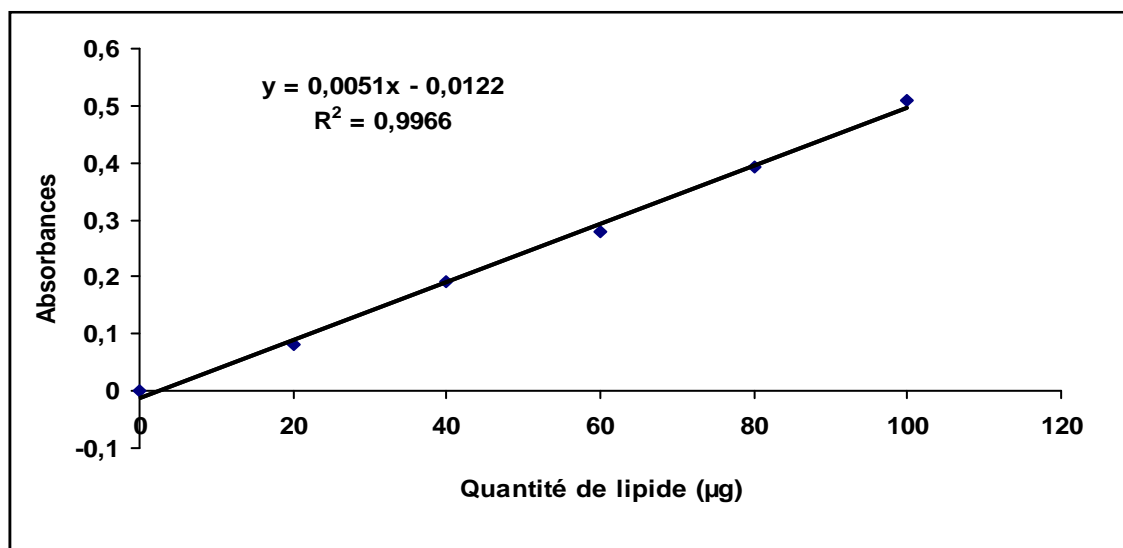


Figure 11. Dosage des lipides dans les différents stades de développement de *D. melanogaster* : droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité de l'huile de table (μg).

6. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont représentés par la moyenne suivie de l'écart type, La régression linéaire, le test de Student ainsi que l'analyse de la variance à un critère de classification. Pour toutes les séries de données, l'égalité des variances a tout d'abord été confirmée grâce aux tests de Bartlett et de Levène avant l'utilisation des tests paramétriques.

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données, version Française 13 pour Windows (X, 2000).

Chapitre 3: résultats et discussion

L'étude biochimique a permis de déterminer les quantités des différents métabolites (protéines, glucides, lipides) dans le corps entier des différents âges de *Drosophila melanogaster* chez les séries témoins et traitées par le spinosad (CI 50 : 288,50 ppm).

1. L'effet de spinosad sur les quantités des protéines dans le corps entier

chez la génération 0 des pupes et adultes âgées de 0 jours, les résultats obtenus par la comparaison des moyennes (test t de student) révèlent une diminution significative, par contre les pupes âgées de 0 jours, aucune différence n'est observée entre les traitées de la génération 1 par rapport aux témoins ($p > 0,05$), une diminution significative ($p=0.046$) chez les adultes âgées de 0 jours, enfin chez les pupes et les adultes âgée de 0 jours aucune différence n'est observée entre traitée de la génération 0 par rapport aux traitées de la génération 1 ($p > 0,05$). L'analyse de la variance à un critère de classification confirme ces résultats et montre aucune effet, ($p > 0,05$) pour les pupes âgées de 0 jours, un effet très significatif ($p=0,009$) chez les adultes âgées de 0 jours.

Tableau 4. Effets, *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 288,50ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. ($m \pm s$; $n=4$). Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries

	Génération 0		Génération 1		ANOVA
	Témoin	Traitée	Témoin	Traitée	
Pupe					p = 0,037*
0 jour	15,31±1,37 a	10,59±0,93 b	15,20±1,18 a	13,61±1,29 Ab	

Seuil de significativité de $p < 0,05$

Chapitre 3 : résultat et discussion

Tableau 5. Effets, *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 288,50ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de *D. melanogaster* âgées de 0 jour. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).

	Génération 0		Génération 1		ANOVA
Adultes 0 jours	Témoin	Traitée	Témoin	Traitée	$p = 0,009^{**}$
	15.91 ± 0.53 a	12.78 ± 0.81 b	15.98 ± 0.71 a	13.73 ± 0.47 B	

Seuil de significativité de $p < 0,05$

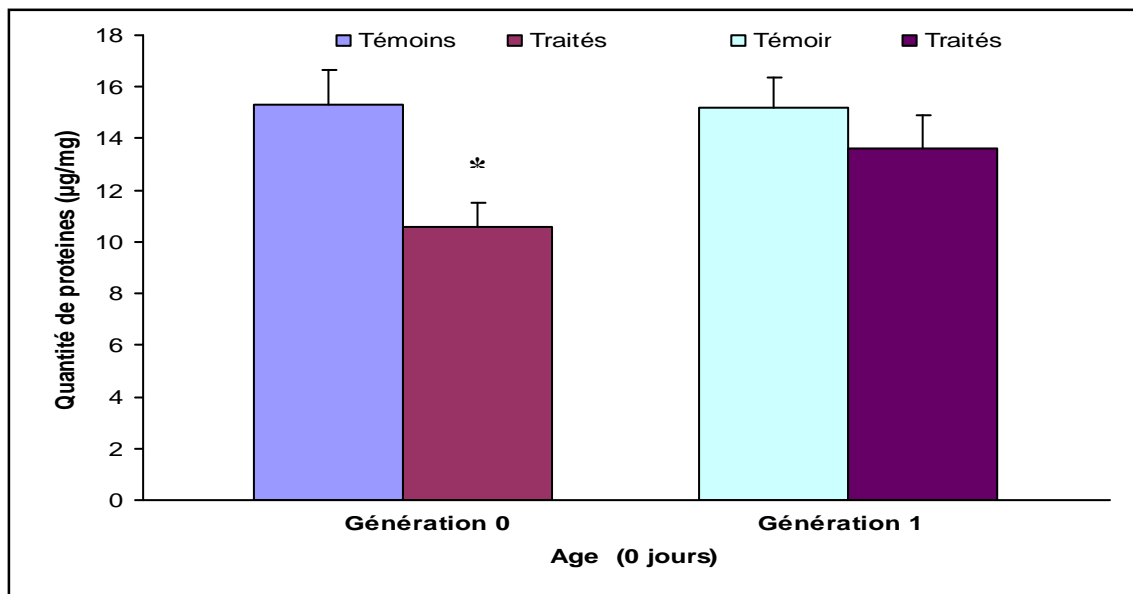


Figure 12. Effet, *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI ; 288,50 ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de *D.melanogaster* âgées de 0 jour. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$). (*) Différences significatives.

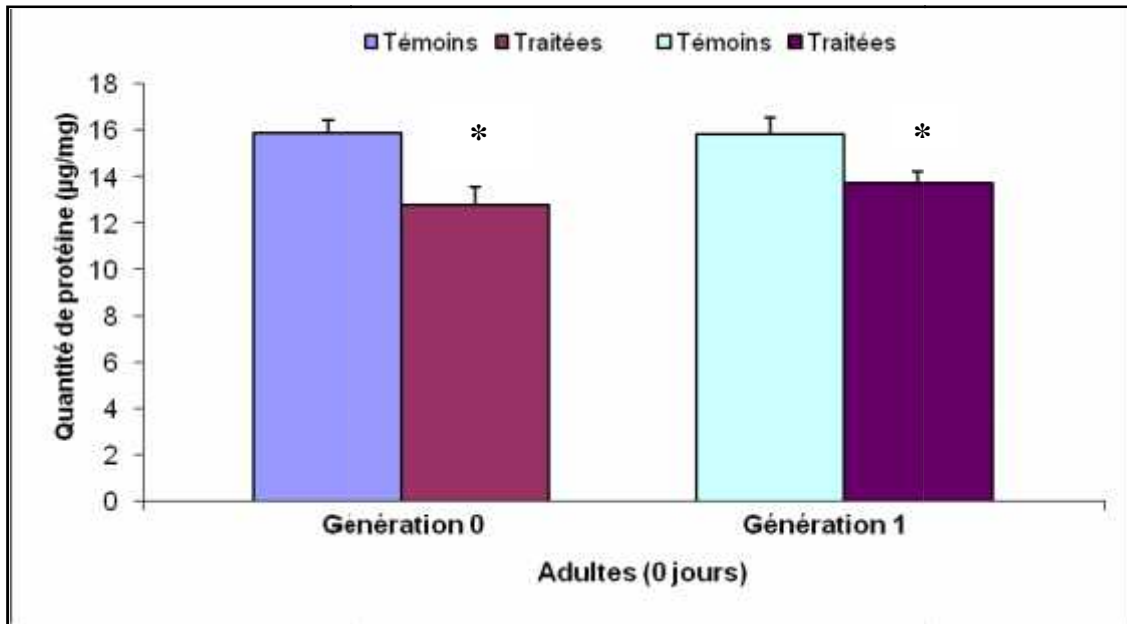


Figure 13. Effet, *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI ; 288,50 ppm) sur les quantités en protéines dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$). Comparaison entre séries témoins et traitées.
(*) Différences significatives.

2. Effets du spinosad sur les quantités des glucides dans le corps entier

Les résultats obtenus par la comparaison des moyennes (test t de student) révèlent une diminution hautement significative entre les témoins et les traitées de la génération 0 ($p < 0,001$) pour les pupes et les adultes âgées de 0 jours, cependant une diminution très significative pour les pupes âgées de 0 jours, hautement significative pour les adultes âgées de 0 jours. Une augmentation très significative des quantités en glucides a été également montrée après comparaison entre les traitées de la génération 0 et la génération 1 ($p < 0,01$) pour les pupes âgées de 0 jours, chez les adultes âgée de 0 jours aucune différence n'a été observée.

L'analyse de la variance à un critère de classification confirme ces résultats et montre un effet hautement significatif ($p < 0,001$) pour les pupes et les adultes âgées de 0 jours.

Chapitre 3 : résultat et discussion

Tableau 6. Effets in vivo, du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 288,50ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).

	Génération 0		Génération 1		ANOVA
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées	
Pupes 0 jours	54,15 \pm 1,1 A	27,76 \pm 2,3 b	53,84 \pm 1,3 a	39,92 \pm 1,5 bc	p 0,001***

Seuil de significativité de p 0,05

Tableau 7. Effets in vivo, du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 288,50ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).

	Génération 0		Génération 1		ANOVA
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées	
Adultes 0 jours	43,40 \pm 1,3 A	24,94 \pm 0,90 b	43.40 \pm 0,90 a	27,94 \pm 1,2 b	P 0,001***

Seuil de significativité de p 0,05

Chapitre 3 : résultat et discussion

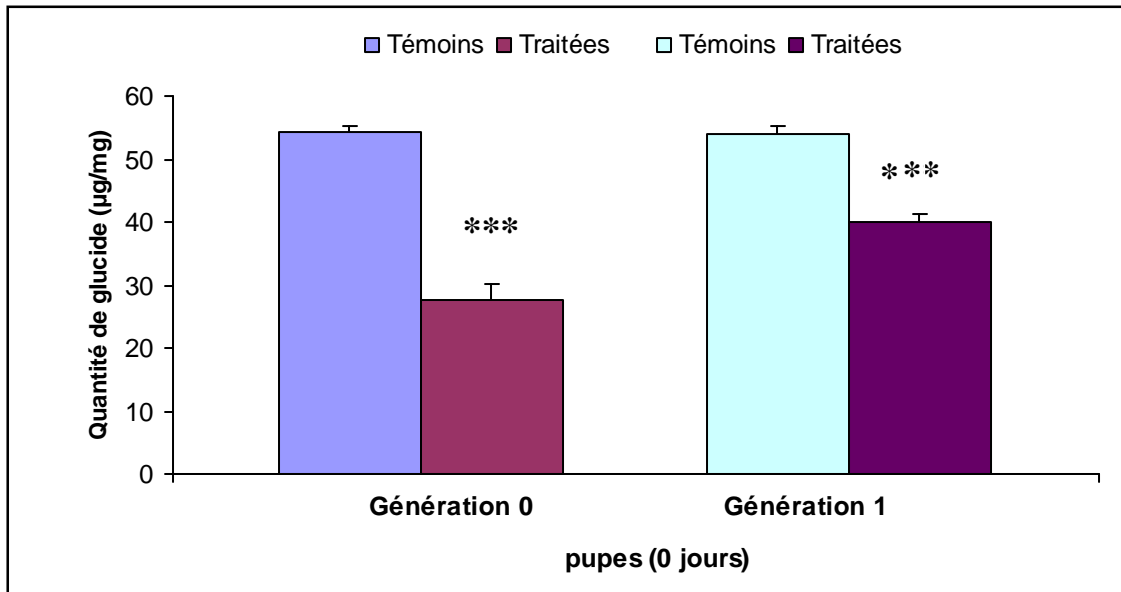


Figure 14. Effet *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI ; 288,50 ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).

Comparaison entre séries témoins et traitées :

(**) Différences très significatives

(***) Différences hautement significative.

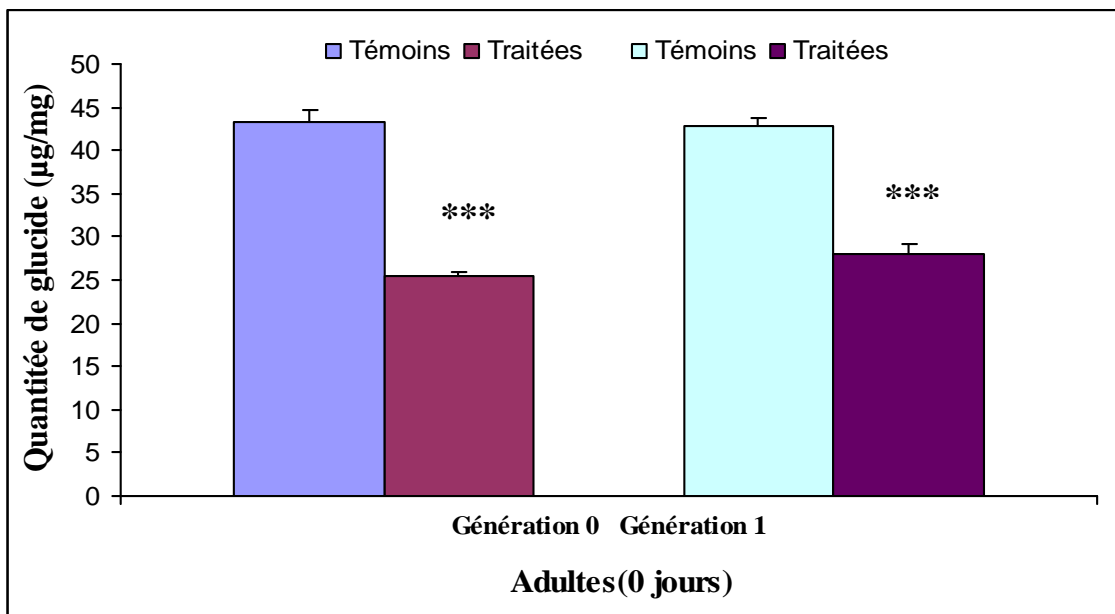


Figure 15. Effet *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI ; 288.50 ppm) sur les quantités en glucides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).

Comparaison entre séries témoins et traitées :

(***) Différences hautement significative.

Chapitre 3 : résultat et discussion

3. Effets du spinosad sur les quantités des lipides dans le corps entier

Les résultats obtenus par la comparaison des moyennes (test t de student) ne révèlent aucune différence entre les témoins et les traitées de la génération 0 ($p > 0,05$) pour les pupes et les adultes âgées de 0 jours., très significative ($p = 0,044$) pour les pupes âgées de 0 jours, et n'indique aucune différence chez les adultes âgées de 0 jours ($p > 0,05$). La comparaison des moyennes entre la génération 0 et la génération 1 révèlent une diminution significative des quantités en lipides ($p = 0,013$) chez les pupes âgées de 0 jours, mais aucune différence n'a été observée pour les adultes âgées de 0 jours.

L'analyse de la variance à un critère de classification confirme ces résultats et montre un effet très significatif ($p = 0,01$) chez les pupes âgées de 0 jours, aucune effet significatif ($p = 0,379$) pour les adultes âgées de 0 jours.

Tableau 8. Effets in vivo, du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 288,50ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des pupes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).

Pupe	Génération 0		Génération 1		ANOVA
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées	
0 jours	80,79 \pm 1,5 a	81,89 \pm 1,2 a	80,20 \pm 1,7 a	73,21 \pm 2,2 b	p 0,01**

Seuil de significativité de p 0,05

Tableau 9. Effets in vivo, du spinosad testé par application topique (CI 50 ; 288,50ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier ($\mu\text{g}/\text{mg}$) des adultes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$).

Adultes	Génération 0		Génération 1		ANOVA
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées	
0 jours	170,84 \pm 1,6 a	170,21 \pm 2,4 a	170,61 \pm 0,79 a	174,93 \pm 2,9 a	P=0,379

Seuil de significativité de p 0,05

D.melanogaster. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$). Comparaison entre séries témoins et traitées :

(*) Différence significatives.

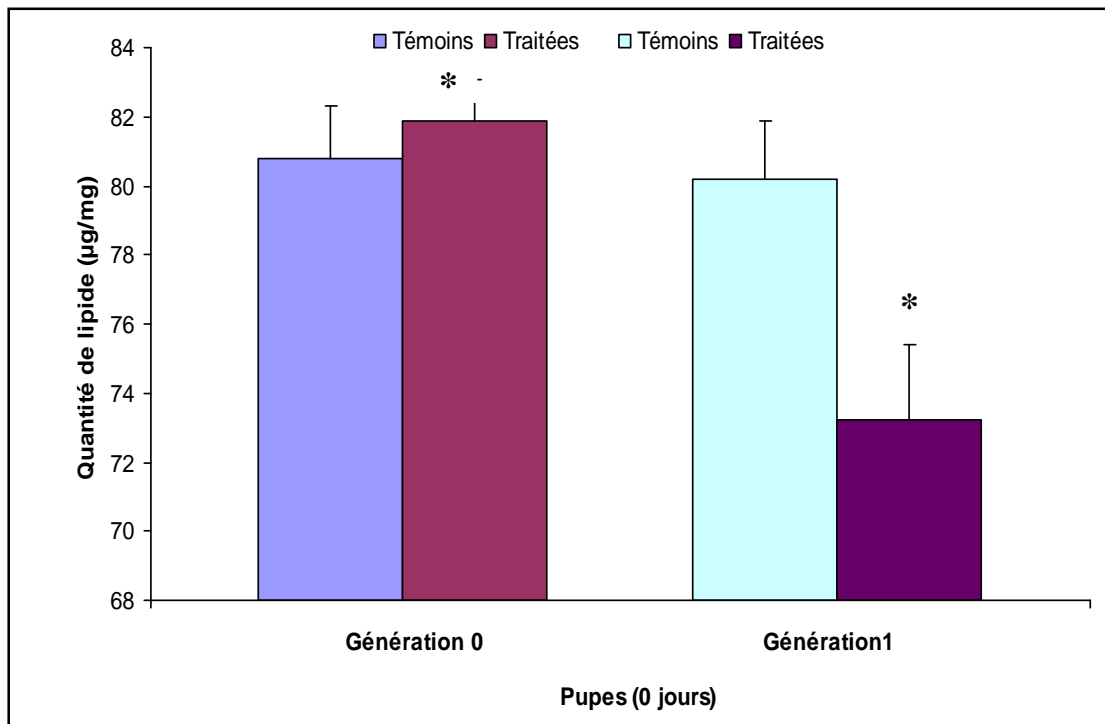


Figure16. Effet *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI ; 288,50 ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier (µg/mg) des pupes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries (m ± s ; n=4). Comparaison entre séries témoins et traitées :
(*) Différence significatives.

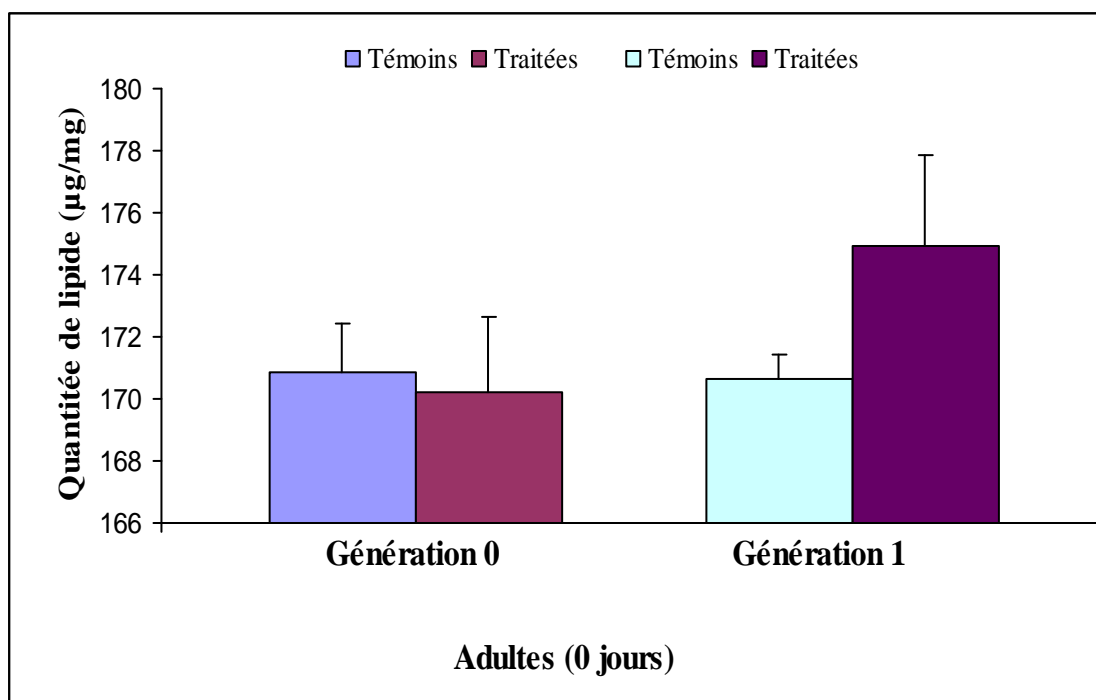


Figure 17. Effet *in vivo*, du spinosad testé par application topique (CI ; 288,50 ppm) sur les quantités en lipides dans le corps entier (µg/mg) des adultes de *D.melanogaster* âgées de 0 jours. Comparaison de moyennes pour un même âge entre les différentes séries ($m \pm s$; $n=4$). Comparaison entre séries témoins et traitées.

CHAPITRE 3: DISCUSSION

4. Discussion

Le contenu des métabolites principaux (protéines, glucides, lipides) sont des biomarqueurs essentiels de “ Fitness de l’insecte, par ailleurs, ces évènements jouent un rôle essentiel particulièrement dans la reproduction et le développement (Gade et Hoffman, 2005).

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues (Malher et al, 1968). Ces dernières entrent dans divers réactions et peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s’intègrent dans la cellule en tant qu’éléments structuraux en même temps que les glucides et les lipides (Jacobe et al, 1961). Nos résultats montrent que le spinosad, administré par application topique, chez les larves L3 de *D.mélanogaster* affecte, en effet différé, le contenu en protéines chez, les pupes et les adultes a l’exuviation de la génération 1 et la génération 0. Ceci et en accord avec la littérature ou les pesticides peuvent affectée les métabolites dans différents compartiment de l’organisme.

Le spinosad entraîne également la diminution en protéines dans les ovaires chez *Blattella germanica* (Maiza et al, 2011). Ces résultats sont en accord avec ceux Tine et al, (2011) sur *Blatta. orientalis* L. (Dictyptera, Blattellidae) après traitement à l’azadrachitine, et de Loucif-Ayad et al, (2010) sur l’abeille *A. mellifera intermissa* après traitement avec des acaricides synthétiques et naturel, Une nouvelle molécule l’indoxacarbe, pesticide à faible risque toxique, qui fait partie du groupe des oxadiazines entraîne une diminution dans le taux des protéines, chez *B. germanica* (Maïza et al, 2010).

Ces résultats similaires ont été aussi constatés chez plusieurs espèces traitées avec des régulateurs de croissance ; en effet, les agonistes des ecdystéroïdes (RH 5849, RH 5992 RH0345) diminuent les contenus en protéines chez *Tenebrio molitor* (Soltani et al, 2002), *Leptinotarsa decemlineata* (Smagghe et al, 1999), *B. germanica* (Kilani-Morakchi et al, 2009 a) ou encore *Spodoptera littoralis* (Smagghe et al, 1992). De plus, il a été montré que le traitement de *Spodoptera exigua* et *Leptinotarsa decemlineata*, avec le RH-0345 et le RH-5992, induisait après une augmentation transitoire, une diminution des concentrations de protéines hémolymphatiques avant la mort des individus traités (Smagghe et al, 1996), Une diminution du taux des protéines du corps a été constatée chez *Panaeus kerathurus* après

Discussion

traitement au RH 0345 (Ghueid, 2006). L'application d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-0345, affecte également le contenu ovarien en protéines, chez *T. molitor* (Taibi *et al*, 2003) ou encore chez un poisson larvifère *Gambusia affinis*, où il affecte la concentration en protéines, dans les ovaires et l'hépatopancréas. Ou encore les analogues de l'hormone juvénile comme le pyriproxifène chez *T. molitor* (Aribi *et al*, 2006) ou le fenoxycarbe chez *Locusta migratoria* (De kort et Koopmanshap, 1991) et chez *Bombyx mori* (Monconduit *et al*, 1998). De la même manière, le KK-42, antiécystéroïdes et hormone juvénile, perturbe la vitellogénèse en inhibant les concentrations des protéines ovariennes *in vivo* chez *T. molitor* (Soltani-Mazouni *et al*, 2001) et *in vitro* (Benlabiod-Boudraa, 1997). Ces résultats sont observés aussi sur les L5 de *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (*Orthoptera, Acrididae*) par l'activité biologique d'un dérégulateur de croissance le Téflubenzuron (TFB) (Halouane *et al*, 2001).

Les glucides représentent également l'élément énergétique de l'organisme jouant un rôle essentiel dans le métabolisme des insectes. Les taux de glycogène et de tréhalose, dans les tissus et l'hémolymphe, sont étroitement liés aux événements physiologiques comme la mue et la reproduction (Wiens *et al*, 1968). Nos résultats montrent que le spinosad, administré par application topique à la CI50 (288.50ppm) chez les larves de *D.melanogaster* entraîne une réduction de glucide, en effet, une diminution significative dans le contenu en glucides est observée à tous les âges testés, et ceci est en accord avec résultats de Blagburn *et al*, (2010) qui indiquent une réduction en glucides dans les œufs chez *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera). Le spinosad entraîne également la diminution en glucides dans les ovaires chez *B. germanica* (Maiza *et al*, 2013) et *B. orientalis* (Tine *et al*, 2013). La réduction du contenu en glucides ovariens a été également montré chez les femelles de *B.orientalis* par un autre pesticide d'origine naturelle l'azadirachtine, (Tine *et al*, 2011) ou encore avec ses dérivés comme la trilogie, qui entraîne de la même manière une diminution dans la concentration en glucides chez *Ctenopharyngodon idella* (Hassanein et Okail, 2008). Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de Loucif-Ayad *et al*, (2010) sur l'abeille *A. mellifera intermissa* après traitement avec des acaricides synthétiques.

Discussion

Une nouvelle molécule l'indoxacarbe, pesticide à faible risque toxique, qui fait partie du groupe des oxadiazines entraîne une diminution dans le taux des glucides chez *B. germanica* (Maïza *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'halofénozide (RH0345) entraîne une diminution des concentrations en glucides, chez *G. affinis* (Bouzioukh, 2000), *Anthonomus grandis* (Thompson *et al.*, 1982) et chez *B. germanica* (Kilani Morakchi *et al.*, 2009). Les mêmes effets sont constatés chez *Musca domestica* par l'altoside ou ZR-515 (analogue de l'hormone juvénile) (Abou El aala *et al.*, 1990). Ces résultats sont observés aussi sur les L5 de *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (*Orthoptera, Acrididae*) par l'activité biologique d'un dérégulateur de croissance le Téflubenzuron (TFB) (Halouane *et al.*, 2001).

Les lipides représentent une partie importante de ces réserves (environ 40% en poids sec) et constitue aussi la principale source d'énergie chez les insectes (Beenakers *et al.*, 1985). Ils sont transportés du corps gras, site de leur synthèse et de leur stockage (Keely, 1985) vers les organes utilisateurs (Kilby, 1963) *via* l'hémolymphe pour être utilisés. Dans nos résultats, les lipides ne semblent pas être affectés par le traitement au spinosad et ceci pour les deux générations. Les mêmes résultats se retrouvent également chez *G. affinis* après traitement au DFB (Bouziouk, 2000). Un autre pesticide d'origine naturelle, l'acétamipride (néonicotinoïde) réduit également le contenu en lipides ovariens chez *B. germanica* (Maïza *et al.*, 2004). A l'opposé, le spinosad réduit ce métabolite dans les œufs chez la puce *Ctenocephalides felis* (Byron *et al.*, 2010) et provoque aussi une diminution en lipides ovariens chez *B. germanica* (Maïza *et al.*, 2013). Les teneurs en lipides diminuent aussi chez *B. orientalis* après traitement à l'azadirachtine (Tine *et al.*, 2011) ; Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de Loucif-Ayad *et al.*, (2010) sur l'abeille *A. mellifera intermissa* après traitement avec des acaricides synthétiques. L'acide borique, un insecticide inorganique (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009 b) présentent les mêmes effets chez *B. germanica*.

Ces résultats sont observés aussi sur les L5 de *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (*Orthoptera, Acrididae*) par l'activité biologique d'un dérégulateur de croissance le Téflubenzuron (TFB) (Halouane *et al.*, 2001).

Les travaux de Daas (2006) ont également démontrés que l'application de plusieurs mimétiques de l'hormone de mue tels que le RH-2485, le RH-5992 et le RH-0345 sur les femelles de *Eupolybothrus nudicornis* (Myriapode) réduisent les concentrations en lipides

Discussion

dans l'hémolymphe et dans les tissus ovariens. Une nouvelle molécule l'indoxacarbe, pesticide à faible risque toxique, qui fait partie du groupe des oxadiazines entraîne une diminution dans le taux des lipides chez *B. germanica* (Maïza *et al*, 2010).

La réduction des taux de ces divers métabolites dans le corps entiers de *D. melanogaster* après le traitement avec le spinosad peut être expliquée par la neurotoxicité du spinosad et les relations étroites entre les systèmes nerveux et neuroendocrinien ceci indique les effets observés du spinosad pourrait s'expliqué *via* l'interaction avec les hormones et neurohormones contrôlant la physiologie et le métabolisme des insectes.

Il apparaît que le spinosad entraîne une diminution dans le contenu en glucides et protéines dans le corps entier chez la première génération mais non pas chez la génération parent ; par conséquent, le spinosad semble agir avec un effet différé, cette rémanence de la molécule devrait être prise en compte dans la lutte pour la gestion du phénomène de la résistance.

Résumé

Le spinosad, pesticide naturel, a été administré, *in vivo*, par application topique à une concentration correspondant à la CI50 (288.50 ppm), chez les larves de derniers stades de *D. melanogaster*. Les effets du spinosad ont été évalués, sur les paramètres biochimiques de l'insecte (protéines, glucides, lipides) dans les différents stades de développement de *D. melanogaster* (pupes et adultes le jour de l'exuviation). Le contenu de ces métabolites déterminé selon Bradford, 1976 (protéine), Duchateau et Florkin, 1959 (glucide) et Goldsworthy *et al*, 1972 (lipide) a été précisé aux cours de deux générations successives, génération parent (G0) et génération 1 (G1).

L'étude biochimique, montre que le spinosad perturbe la synthèse des métabolites chez les pupes et les adultes, en effet une diminution dans le contenu en protéines et en glucide est observée chez *D. melanogaster*, traitées comparativement aux témoins dans la G0 et la G1, cependant le contenu en lipides chez les deux âges ne semblent pas être affecté par le traitement au spinosad et ceci pour les deux générations.

Mots clés: Biopesticide, spinosad, *D. melanogaster*, métabolites, résistance, développement.

Résumé

summary

Spinosad, the natural pesticide, was administered, in vivo, by topical application with a corresponding concentration to the C150 (295-12ppm), among the last stage of larvae by *D.melanogaster*. the effects of spinosad was evaluated over the biochemical settings of the insect (proteins, carbohydrates, lipids) in the different stages of their development by *D.melanogaster* (pupae and adults the day of exuviation).

The value of this metabolism, was defined by Bradford 1976 (protein), Duchateau and Florin 1959 (carbohydrate) and Glodsworthy and al 1972 (lipid). That was specified along the way of two successive generations, parent generation G0 and generation 1 G1.

The biochemical study, shows that spinosad disturbs the metabolism of pupae and adults, in fact a decrease of protein and carbohydrate was observed by *D.melanogaster*. this study was processed comparatively between G0 and G1. However, the value of lipids in the two ages doesn't seem to be effected by the treatment with spinosad, and this was among the two generations.

Spinosa

المبيد الطبيعي سبينوزا كان يدار في الجسم الحي موضعيا بتركيز يوافق 150 (12 جزء من المليون) عند يرقات ذبابة الفواكه في المرحلة الاخيرة.تأثيرات سبينوزا قيمت بمعايير بيو كيميائية للحشرة (بروتينات ، غلوسيدات،الدهون) مختلف مراحل نمو ذبابة الفاكهة (الشرايق والبالغين يوم الانسلاخ).

محتوى هذه الاستقلابان (الايض) Bradford, 1976 (بروتين) Duchateau et Florin, 1959 (غلوسيدات) Goldsworthy *et al*, 1972 (دهون) حددت خلال الجيلين المتتابعين، الجيل 0 الجيل 1بينت الدراسة البيو كيميائية انض السينوزاتعطل تركيب الاستقلاب عند اليرقات والبالغين بسبب نقص البروتين والغلوسيد عند ذبابة الفاكهة .عولجت مقارنة بشواهد الجيل 0 والجيل 1 .مع ان محتوى الدهون عند العمرين او المرحلتين لا يبدو متأثرا بمعالجة السينوزا وهذا للجيلين 1 0

Références bibliographiques :

A

- 📖 Abbott, W. B. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 265 -267
- 📖 Alberts., Jonsen.A , Lewis . J, Ralf.M, Robert.K, Walter. P;(1999)-L'essentiel de la biologie cellulaire, introduction à la biologie moléculaire de la cellule
- 📖 Antony, C. & Jallon, J.M. (1982). Cuticular aphrodisiacs from *Drosophila* and other Diptera. *Bulletin De La Societe Zoologique De France-Evolution Et Zoologie.*, 107: 639-644

B

- 📖 Belinato, T.A., Martins, A.J., Lima, J.B.P., Valle, D., (2013). Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. *Parasit Vectors* 6, 83.
- 📖 Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives* 119, 866.
- 📖 Bourdin, C.M., Moignot, B., Wang, L., Murillo, L., Juchaux, M., Quinchard, S., Lapied, B., Guérineau, N.C., Dong, K., Legros, C., (2013). Intron retention in mRNA encoding ancillary subunit of insect voltage-gated sodium channel modulates channel expression, gating regulation and drug sensitivity. *PLoS ONE* 8, e67290.
- 📖 Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method of the quantitation microgram quantities of Protein utilising the principale dye binding. *Analytic. Biochem.*,72: 248- 254.
- 📖 Bravo, A., Soberón, M., (2008). How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573–579.
- 📖 Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.
- 📖 Buckingham, S.D., Biggin, P.C., Sattelle, B.M., Brown, L.A., Sattelle, D.B.,(2005). Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol. Pharmacol.* 68, 942–951.

C

- 📖 Casida, J.E., (2009). Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res.Toxicol.* 22, 609–619.
- 📖 Casida, J.E., Durkin, K.A., (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117.
- 📖 Catterall, W.A., (2000). From currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13–25.
- 📖 Cantrell, C.L., Dayan, E.F. & Duke, S.O. 2012. Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod.* 75(6): 1231-1242.
- 📖 Cisneros, J., D. Goulson, L. C. Derwent, D. 1. Penagos, O. Hernandez et T. Williams.(2002). «Toxic effects of spinosad on predatory insects». *Biological Control*, vol. 23, no 2, p. 156-163.
- 📖 Colombani. J, Biamchini. L; Layalle. S; Léopard. P, (2006). Stéroïdes, insulín et croissance: Les mouches dopent. La recherché/stéroïds, insulín and groth: The files. Dope the research.Revue: M/S: medecine sciences, 22(3): 241-243.
- 📖 Copping L.G. & Menn J.J., (2000). Biopesticides. A review of their action, applications
- 📖 Costa, L.G., (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* 366, 1–13.
- 📖 Colombani. J, Biamchini. L; Layalle. S; Léopard. P, (2006). Stéroïdes, insulín et croissance: Les mouches dopent. La recherché/stéroïds, insulín and groth: The files. Dope the research.Revue: M/S: medecine sciences, 22(3): 241-243.

D

- 📖 Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S., (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59, 151–162.
- Dekeyser, M.A., (2005). Acaricide mode of action. *Pest Management Science* 61, 103–110
- 📖 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

Bibliographie

distrubing insecticides. In: Comprehensive Insect Molecular Science (Gilbert, L.I., Kostas, I. & Gill, S., eds.). Pergamon Press. 6: 55-116.

📖 Draper, H.H. & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation *Meth. Enzymol.*, 186: 241-431.

📖 Dubrovsky, E.B., (2005). Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 6–11.

📖 Duchateau, G. & Florkin, M. (1959). Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.*, 67: 306-314.

E

📖 Ebeling W., (1978). Urban Entomology. University of California Division of Agricultural Science. Berkeley

📖 Everaerts, C., Farine, J.P., Cobb, M. & Ferveur, J.F. (2010) Drosophila Cuticular Hydrocarbons Revisited: Mating Status Alters Cuticular Profiles. *PLoS ONE.*, 5(3): e9607

F

📖 Fahrbach, S.E., Smagghe, G., Velarde, R.A., (2012). Insect nuclear receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 57, 83–106.

📖 Farine, J.P., Ferveur, J.F. & Everaerts, C. (2012). Volatile Drosophila Cuticular Pheromones Are Affected by Social but Not Sexual Experience. *PLoS ONE.*, 7(7): e40396

📖 Fisher, R.A. & Yates. (1957). Statical tables for biological, agricultural and medicalresearch.

📖 ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J., Le Goff, G., (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20, 163–170.

📖 ffrench-Constant, R.H., Mortlock, D.P., Shaffer, C.D., MacIntyre, R.J., Roush, R.T., (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7209– 7213.

G

📖 Gilbert, S.F. (1996). Biologie du développement. 4ème édition, De Boeck, ISBN2-8041-2263-8, p 892

📖 Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Sanlaville, C., Lewontin, R.C. & Gelbart W.M. (2002). Introduction a l'analyse genetique. 3e edition *De Boeck Université*. ISBN 27-445009-76, p38

📖 Goldsworthy, A.C., Mordue, W. & Guthkelch, J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18: 306-314.

Bibliographie

Govindarajan, M. & Rajeswary, M. 2015. Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 114(5): 1949-1961.

Grolleau, F., Sattelle, D.B., (2000). Single channel analysis of the blocking actions of BIDN and fipronil on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (RDL) stably expressed in a *Drosophila* cell line. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1833–1842.

H

Hale, K. A and D.E. portwood. (1996). The aerobic soil degradation of spinosad, a novel insect control agent. *J environ sci. Health Part B: Pesticides, Food contam, Agric.Wastes*, B 31: 477-484.

Hoffmann, A. A. & Parsons, P. A. (1991). *Evolutionary genetics and environmental stress*, (284 p.). Oxford University Press.

Hosie, A.M., Aronstein, K., Sattelle, D.B., ffrench-Constant, R.H., (1997). Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.* 20, 578–583.

J

Jacquet V.F.Guégun, R.Dutton, 2002.intéret du spinosad en viticulture pour lutter contre les lépidoptères,les thrips et la drosophile.annales.6e CIRA,montpellier, 46.decembre (2002),8p.K

James, (2009). Global status of commercialized biotech/GM crops: (2009) brief 41. ISAAA, International Service for the acquisition of Agri-Biotech applications.

Jeschke, P., Nauen, R., (2008). Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64, 1084–1098.

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.

Jones, A.K., Brown, L.A., Sattelle, D.B., (2007). Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species. *Invert Neurosci* 7, 67–73.

K

Kiriyama K., Itazu Y., Kagabu S., Nishimura K., (2003). Insecticidal and neuroblocking

Bibliographie

activities of azcetamiprid and related compounds. *J. Pestic. Sci*, 28:8-17. efficacy. *Pest. Manag. Sci*, 56: 651-676

📖 Kollman, W.S. (2003). Environmental fate of Spinosad. (2003). Page consultée le 21 novembre 2003

L

📖 Laemmli, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227- 680.

📖 Larson, L.L., T. Sparks and G.D. Thompson. (1999). The Spinosyns, new insect control agents isolated from *Saccharopolyspora spinosa*. Page consultée le 20 novembre (2003)

📖 Lemoine, A. (1980). Les protéines cuticulaire de *Tenebrio molitor* et quelques méthodes de quantification et d'identification. Rapport DEA et Entomologie. Université de Dijon.

📖 Lockwood JA., Sparks TC., Story RN. (1984). Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behaviour. *Bull Entomol. Soc. Am.* 30, p. 41–51.

📖 Lorec, A. (2013). un outil idéal pour decrypter les mécanismes d'attaques bactériennes et nos propres défenses. Les défis du CEA. Le magazine de la recherche et de ses applications N°180 : 15-21

M

📖 Marcillac, F., Grosjean, Y. & Ferveur, J. F. (2005b). A single mutation alters production and discrimination of *Drosophila* sex pheromones. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences.*, 272: 303-309.

📖 McKenzie, J.A. (1974). The distribution of vineyard populations of *Drosophila melanogaster* during vintage and non-vintage periods. *Oecologia.*, 15: 1-16.

📖 McKenzie, J. A. & Mc Kechnie, S. W. (1979). A comparative study of resource utilization in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Oecologia.*, 40: 299-309.

📖 Merzendorfer, H., Zimoch, L., (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412.

📖 Merzendorfer, H., (2006). Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 176, 1–15.

📖 Merzendorfer, H., (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 759–769.

📖 Michaud, D., (2005). Impact environnemental des cultures transgéniques: II. L'impact des caractères recombinants. *Phytoprotection* 86, 107.

Bibliographie

📖 Millar, N.S., (2009). A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 78, 766–776.

📖 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.

N

📖 Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., Givaudan, A., (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 220–231

O

📖 Oppenoorth FJ. (1985). Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In Kerkut GA

📖 O'Reilly, A.O., Khambay, B.P.S., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G.E., (2006). Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel.

Biochem. J. 396, 255–263

📖 Ouédraogo S., (2005), Intensification de l'agriculture dans le plateau central du Burkina Faso: une analyse des possibilités à partir des nouvelles technologies. Thèse de Doctorat, Groningen Rijks universiteit, 317 p. 42

P

📖 Perry, T., McKenzie, J.A., Batterham, P., (2007). A *Dα6* knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 184–188

📖 Possidente, D.R. & Murphey, R.K. (1989). Genetic control of sexually dimorphic axon morphology in *Drosophila* sensory neurons. *Dev Biol.*, 132 (2): 448-57

R

📖 Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J., Sattelle, D.B., (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert. Neurosci.* 5, 119–133.

📖 Rinkevich, F.D., Chen, M., Shelton, A.M., Scott, J.G., (2010). Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *Pxyl 6* with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Invert. Neurosci.* 10, 25–33.

📖 Rochefort. agr. M.Sc., Renée Lalancette, agr. M.Sc. Roselyne Labbé, biol., M.Sc.

Bibliographie

Jacques Brodeur, Ph.D. Projet PARDE Présenté au Ministère du développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP), 2006

S

📖 Salgado, V.L. (1998). Studies on the mode of action of Spinosad : insects symptoms and physiology correlates. *Pesticides Biochemistry and Physiology* 60:91-102.

📖 Sattelle, D.B., Jones, A.K., Sattelle, B.M., Matsuda, K., Reenan, R., Biggin, P.C., (2005). Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 27, 366–376.

📖 Shaoyong, K., Tingting, S., Zhigang, Z., Ya-Ni, Z., Ying L., Kaimei, W. & Ziwen, Y. (2010). Spirodiclofen Analogues as Potential Lipid Biosynthesis Inhibitors: A Convenient Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationship. *Bull. Korean. Chem. Soc.*, Vol. 31, No. 8.

📖 Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratyneck, C., New Hall, & Feidman, L. (1966). A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt. Biochem.*, 19: 415-528

📖 Slack, J. (2004). *Biologie du développement*. 1ère édition, De Boeck, p 481

📖 Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A., 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1337–1349.

📖 Soreq, H., Seidman, S., (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302.

📖 Sparrks T.C Thompson GD. LARSON L.L.Kirst H.A. Jantzo K. Worden T.V. Hertlen M. B. Busacca J.D .(1995).Biological Charecteristics Of The Spinosyns, A New And Naturally.

📖 Sparks, T.C., (2013). Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 8–17

📖 Swaroop, S., Gilroy, A. B. & Uemura, K. (1966). Statistical methods in malaria eradication. Geneva: World Health Organisation.

T

📖 Tanaka K. (1981). The mechanism of resistance to lindane and hexadentated lindane in third Yumenoshima strain of houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16, p. 149–157.

Bibliographie

- 📖 Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364
- 📖 Tavernier, R. & Lizeaux, C., (2002). Sciences Vie Terre Term S – Spec. Maisonneuve & Larose. ISBN 20-472958-58, 117p.
- 📖 Thany, S.H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B., Lapied, B., 2007. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 14–22.
- 📖 Thompson G. et Hutchins S., (1999). Spinosad. *Pestic Outlook*, 10: 78-81.
- 📖 Thompson, G.D., Dutton R., Sparks T.C., (2000). Spinosad—a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest. Manag. Sci.*, 56: 696–702.
- 📖 Tracqui, P. & Demongeot, J. (2003). Elements de biologie a l’usage d’autres disciplines de la structure aux fonctions, *EDP sciences Edition*, 94-95.
- 📖 Trent perrya, Philip Batterhama et Philip J.daborn Corresponding.,(2011),La biologie l’activité insecticide et la résistance,98(1) :50-58
- 📖 Tomizawa, M., Casida, J.E.,(2005). NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247–268.
- 📖 Tunaz, H., Uygun, N., (2004). Insect growth regulators for insect pest control. *Turk J Agric For* 28, 377–387.

V

- 📖 Vain, P., (2007). Trends in GM crop, food and feed safety literature. *Nat. Biotechnol.* 25, 624–626.
- 📖 Vo, D.T., Hsu, W.H., Abu-Basha, E.A., Martin, R.J., (2010). Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 33, 315–322.

W

- 📖 Watson, G.B., Chouinard, S.W., Cook, K.R., Geng, C., Gifford, J.M., Gustafson, G.D., Hasler, J.M., Larrinua, I.M., Letherer, T.J., Mitchell, J.C., Pak, W.L., Salgado, V.L., Sparks, T.C., Stilwell, G.E., (2010). A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance,

Bibliographie

resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 376–384.

📖 Wolfgang Pierl & Werner Ring, (1992). Guides des insectes, délaux et niestlé, Paris, pp 42-198.

Evaluation Des Effets d'un Biopesticide Sur *Drosophila Mélanogaster*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Entomologie

. Résumé

Le spinosad, pesticide naturel, a été administré, *in vivo*, par application topique à une concentration correspondant à la CI50 (288.50 ppm), chez les larves de derniers stades de *D. melanogaster*. Les effets du spinosad ont été évalués, sur les paramètres biochimiques de l'insecte (protéines, glucides, lipides) dans les différents stades de développement de *D. mélanogaster* (pupes et adultes le jour de l'exuviation). Le contenu de ces métabolites déterminé selon Bradford, 1976 (protéine), Duchateau et Florkin, 1959 (glucide) et Goldsworthy *et al*, 1972 (lipide) a été précisé aux cours de deux générations successives, génération parent (G0) et génération 1 (G1).

L'étude biochimique, montre que le spinosad perturbe la synthèse des métabolites chez les pupes et les adultes, en effet une diminution dans le contenu en protéines et en glucide est observée chez *D. mélanogaster*, traitées comparativement aux témoins dans la G0 et la G1, cependant le contenu en lipides chez les deux âges ne semblent pas être affecté par le traitement au spinosad et ceci pour les deux générations.

Mots clés : Biopesticide, spinosad, *D. mélanogaster*, métabolites, résistance, développement

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biosystématiques et écologie des Arthropodes
Université des Frères Mentouri Constantine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Ben Kenana Naima (Mc- UFM Constantine).

Rapporteur : Mme Chaaban Meriem (Ma - UFM Constantine).

Examineurs : Mme Aguib Sihem (Mc - UFM Constantine).

Date de soutenance : 30/06/2016