

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا التطبيقية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : *Biotechnologie et Biothérapie*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Activité d'un biopesticide issu du neem (*Azadirachta indica*) chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (Diptera)

Présenté par : BIRI Abdelhakim

Le 20/06/2022

SAHLI Asma

Jury d'évaluation :

Encadreur : BOULAHBEL Bilel (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : KARA ALI Mounira (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : BOUDOUKHANI Meriem (MAB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout à Dieu qui nous a donné la force, le courage et la volonté d'élaborer ce mémoire scientifique.

*Nos sincères remerciements vont à notre directeur de mémoire, Mr **Bilel BOULAHBEL** pour son aide précieuse. Nous lui exprimons notre gratitude pour sa disponibilité, sa compréhension et ces encouragements.*

*Nous exprimons également nos plus vifs remerciements à **Mme Mounira KARA ALI** et **Mme Meriem BOUDOUKHANI** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements à **Madame N. Benkenana**, directrice du laboratoire de biosystématique et écologie des arthropodes pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire.*

Enfin, Nos remerciements vont à titre particulier à nos chers parents et à tous ceux et celles qui ont contribué de loin ou de près à l'aboutissement de ce travail.



J'ai l'immense plaisir de dédier ce modeste travail :

*A ma très chère mère et mon père qui m'ont toujours poussé à être
le meilleur merci pour leur soutien, leur sacrifice, leur amour et
leur irremplaçable présence.*

*A mon frère Abderrahmane, je lui exprime mes sentiments de
fraternité et d'amour à travers ce travail.*

*A mes deux sœurs que j'aime et qui m'ont apporté un grand soutien
moral tout au long de mon travail.*

*A ma collègue et mon amie Ahlem qui m'a aidée et elle était
toujours à mes côtés pendant mon parcours.*

A mes +++ pour tous les moments passés ensemble.

A toute personne heureuse de mon réussite.

ABDELHAKIM



Je dédie ce travail :

A mes très chers parents qui m'ont toujours guidé vers la réussite, par leur encouragement, leur disponibilité, leur patience, leurs conseils avisés et leur soutien précieux.

A mes frères charaf Eddin, Ihab et Mohamed Faiz.

A mes sœurs Fayza et Racha.

A mon amie Imane

A mon binôme.

A toute ma promotion du master 2 "2021-2022"

ASMA

RESUMES

RÉSUMÉ

Les pesticides naturels, alternative aux insecticides conventionnels, constituent un élément de réponse à la politique du développement durable de par leur faible impact écotoxicologique.

Dans le présent travail, l'effet d'une formulation commerciale de l'azadirachtine, l'Huile de Neem, provenant d'une espèce végétale, *Azadirachta indica*, a été évalué sur la toxicité chez un modèle de référence *D. melanogaster*. Différentes concentrations variant entre 0,5 et 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ont été testées par application topique sur des pupes nouvellement exuviées.

Les résultats obtenus révèlent que l'Huile de Neem induit une inhibition de l'émergence adulte avec une relation concentration-réponse. L'Huile de Neem provoque également l'apparition de plusieurs anomalies morphologiques chez *D. melanogaster*. Les CI_{25} et CI_{50} obtenues à partir d'une courbe concentration-réponse et correspondant à une mortalité de 25 et 50 % sont de l'ordre de 0,68 et 1,17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivement.

Mots clés : *D. melanogaster*, *Azadirachta indica*, Huile de Neem, Toxicité.

ABSTRACT

Natural pesticides, an alternative to conventional insecticides, constitute an element of response to sustainable development policy in relation with their low ecotoxicological impact.

In the present study, the effect of a commercial formulation of azadirachtin, Neem Oil, obtained from a plant species, *Azadirachta indica*, was evaluated on the toxicity in a reference model, *D. melanogaster*. Different concentrations ranging from 0.5 and 6.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ were tested by topical application on newly ecdysed pupae.

The results obtained reveal that Neem Oil induces an inhibition of adult emergence with a concentration-response relationship. Neem Oil also causes the appearance of several morphological anomalies in *D. melanogaster*. The IC_{25} and IC_{50} obtained from a concentration-response curve and corresponding to a mortality of 25 and 50% are in the order of 0.68 and 1.17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectively.

Key words: *D. melanogaster*, *Azadirachta indica*, Neem Oil, Toxicity.

المخلص

تعتبر المبيدات الطبيعية بديل للمبيدات الحشرية التقليدية كما تشكل عنصر استجابة لسياسة التنمية المستدامة بسبب تأثيرها الضعيف على البيئة.

في هذا العمل، تم تقييم تأثير تركيبة تجارية من azadirachtine ، زيت النيم ، المشتق من أحد الأنواع النباتية ، *Azadirachta indica*، على السمية عند نموذج مرجعي *D. melanogaster*. استخدمت جرعات تتراوح بين 0,5 و 6,5 µg/µl بواسطة التطبيق الموضعي يوم إنسلاخ العذراء *D. melanogaster*.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن زيت النيم أدا إلى تثبيط ظهور البالغين مع وجود علاقة بين الجرعة والاستجابة. أبدت النتائج أيضاً أن زيت النيم تسبب في ظهور العديد من التشوهات المورفولوجية عند *D. melanogaster* حيث تم الحصول على CI_{25} و CI_{50} من منحنى تركيز-استجابة والمطابقة للوفيات 25 و 50 % هي 0,68 و 1,17 µg/µl على التوالي.

الكلمات المفتاحية : *D. melanogaster*، *Azadirachta indica* ، زيت النيم ، السمية.

Table des matières

- Résumé
- Abstract
- الملخص
- Liste des tableaux
- Liste des figures
- Liste des abréviations

Introduction	1
Chapitre I	
1. Définition de biopesticides	3
2. Différentes catégories de biopesticides	3
2.1. Biopesticides végétaux	3
2.2. Biopesticides microbiens	4
2.3. Biopesticides animaux	4
3. Les avantages et les inconvénients des biopesticides.....	4
3.1. Les avantages des biopesticides	4
3.2. Les inconvénients des biopesticides	5
4. Mode d'action des bioinsecticides	5
5. Caractéristiques des biopesticides	6
5.1. Sélectivité.....	6
5.2. Spécificité	6
5.3. Biodégradabilité.....	6
5.4. Résistance	6
5.5. Biodisponibilité.....	7
5.6. Courte durée de vie résiduelle	7
6. Marché des biopesticides	7
Chapitre II	
1. Généralité sur le Neem.....	9
2. L'arbre de Neem : <i>Azadirachta indica</i>	9
2.1. Origine et distribution géographique	9
2.2. Description botanique	9

2.3. Classification botanique	10
3. Composés bioactifs présents dans <i>Azadirachta indica</i>	11
4. Effets bénéfiques d' <i>Azadirachta indica</i>	12
5. Propriétés insecticides d' <i>Azadirachta indica</i>	13
5.1. Effets régulateurs de croissance	13
5.2. Effets sur le système nerveux	13
5.3. Effets sur la reproduction.....	13
5.4. Effets anti-appétant	14
5.5. Effets moléculaires.....	14
Matériel et Méthodes	15
1. Matériel biologique	15
1.1. La drosophile : Organisme modèle	15
1.2. Présentation du matériel biologique	15
1.3. Cycle biologique	17
1.4. Elevage au laboratoire	18
2. Présentation de l'Huile de Neem	19
3. Traitement des insectes	20
4. Essais toxicologiques	20
5. Analyse statistique.....	21
Résultat	22
Discussion	27
Conclusion & perspectives.....	29
Références bibliographiques.....	30

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux constituants chimiques d' <i>Azadirachta indica</i>	11
Tableau 2 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition observée (%) de l'émergence adulte ($m \pm \text{SEM}$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	23
Tableau 3 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition corrigée (%) de l'émergence adulte. ($m \pm \text{SEM}$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	23
Tableau 4 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : sur le pourcentage d'inhibition corrigé de l'émergence adulte ($m \pm \text{SEM}$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune) : Analyse de la variance à un critère de classification.	24
Tableau 5 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Détermination des concentrations d'inhibition de l'émergence adulte (CI en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et leurs intervalles de confiance à 95%.	26

Liste des figures

Figure 1. L'arbre de Neem et ses composants.....	10
Figure 2. Femelle et Mâle de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
Figure 3. Peignes sexuels.	16
Figure 4. Cycle de vie de <i>D. melanogaster</i> à 25°C	18
Figure 5. Elevage de <i>D. melanogaster</i> au laboratoire	19
Figure 6. Structure chimique de trois constituants principaux de l'Huile de Neem	19
Figure 7. Procédure expérimentale pour les essais toxicologiques.	20
Figure 8. Exemples des malformations les plus fréquentes chez <i>D. melanogaster</i> après traitement des pupes nouvellement exuviées à l'Huile de Neem	22
Figure 9. Toxicité de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition corrigée de la mue adulte. Les lettres représentent le classement des concentrations selon le test HSD de Tukey.	25
Figure 10. Courbe concentration -réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la concentration de l'Huile de Neem ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), administrée <i>in vivo</i> , par application topique le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i>	25

Liste des abréviations

CAGR :	Compound Annual Growth Rate
D :	Drosophila
HJ :	Hormone juvénile
IGDs :	Perturbateurs de croissance des insectes
PPTH :	Neurohormones prothoracicotrope
SNC :	Système nerveux centrale
SOD :	Superoxyde dismutase
CAT :	Catalase
GST :	Glutathion S-transférase
ROS :	Reactive oxygen species
L₁ :	Stade larvaire 1
L₂ :	Stade larvaire 2
L₃ :	Stade larvaire 3
EC:	Emulsion Concentrée
HSD :	Honest Significant Difference
SEM :	L'erreur standard de la mesure
G :	Gramme
°C :	Degré Celsius
Mm :	Millimètre
µg/µl :	Microgramme par microlitre
g/mol :	Gramme par molle
SEM :	Standard Erreur of the Mean.
SCE :	Somme des carrés des écarts
CM :	Carré moyen
F Obs :	F observé
R² :	Coefficient de détermination
CI :	Concentrations d'inhibition
P :	Niveau de signification
20E :	20-hydroxyecdysone

Ppm :	Parts per million
H3D :	Terraneem
UE :	Union Européenne
PGPR :	Plant Growth Promoting <i>Rhizobacteria</i>
ddl :	Degré de liberté
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Economique
XX ème :	vingtième
Cm :	Centimètre
Ca :	Calicium
Mg :	Magnésium
P :	Phosphore
h :	Heure
Fig :	Figure

Introduction

Introduction

L'augmentation de la productivité agricole, pour répondre aux besoins de la population mondiale en pleine croissance, tout en préservant les ressources naturelles, est l'un des défis majeurs de l'humanité qui doit être surmonté (Ben Mrid *et al.*, 2021). La population mondiale devrait augmenter de deux milliards d'ici à 2050, passant de 7,7 milliards en 2019 à 9,7 en 2050, pourra atteindre, un chiffre de 10,9 milliards à l'horizon 2100 (Leridon, 2020); une telle augmentation, qui aura lieu principalement dans les pays en développement, exigera inévitablement une production agricole supplémentaire de $2,4 \times 10^9$ tonnes/ans. Cette prévision, strictement dépendante de l'intensification de la productivité agricole, ne pourra être envisagée que par l'adoption de technologies appropriées dont la lutte contre les bio-agresseurs des cultures (Ouédraogo, 2005). En effet, des pertes de récoltes, estimées en moyenne à 40% de la production potentielle, sont dues, essentiellement, à des ravageurs (Kulkarni *et al.*, 2009 ; Abhilash & Singh, 2009 ; Dimetry, 2014). Elle pourraient atteindre les 70% en absence de protection efficace (Popp *et al.*, 2013).

Actuellement l'utilisation de pesticides chimiques de synthèse reste l'approche le plus largement adopté dans la production agricole pour lutter contre les ravageurs, les maladies et d'autres agents pathogènes des plantes afin de réduire et/ou d'éliminer les pertes de rendement et de maintenir la qualité élevée des produits (Damalas & Eleftherohorinos 2011; Sharma *et al.*, 2020; Rajmohan *et al.*, 2020). Néanmoins, si ces pesticides conventionnels ont joué un rôle crucial dans l'augmentation de la productivité agricole, leur utilisation intensives et répétées sont responsables du phénomène de pollution de l'environnement, l'apparition de résistance des bioagresseurs, mais également des effets nocifs sur la santé humaine (Jan et al. 2015; Bilal *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020 ; Rajmohan *et al.*, 2020). C'est pourquoi, aujourd'hui, pour des raisons écologiques et économiques, il y a nécessité de développer des méthodes de substitution aux pesticides de synthèse dans la protection des cultures.

Ainsi dans le cadre de la politique mondiale du développement durable, des pesticides à moindre impact environnemental ont été commercialisés ; ils sont représentés par les substances d'origine naturelle. Ces composés se définissent, au sens large, comme des substances d'origine naturelle provenant d'organismes vivants : animaux, plantes, bactéries ou encore certains minéraux comme le bicarbonate de potassium (Sporleder & Lacey, 2013). Leur production et utilisation à grande échelle a été possible grâce à l'essor de la biotechnologie à la mise en place du processus du développement durable (Sporleder & Lacey, 2013).

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 essence a connu un essor massif pour différents usages (médecine traditionnelle, agronomie, ornementation). De nombreux composés biologiquement actifs ont été extraits des différentes parties de cet arbre mais les graines de neem restent la source la plus importante des composés utilisés dans les formulations insecticides (Su & Mulla, 1999; Copping & Duke, 2007). Parmi ceux-ci se trouve l'azadirachtine, un tetranortriterpénoïde le plus puissant, commercialisée sous diverses formulations (Huile de neem, Neem-Azal, Bioneem, etc.) dans le monde (Mordue *et al.*, 2005 ; Aribi *et al.*, 2020). Ce pesticide naturel est utilisé avec succès dans les agro-écosystèmes (Morgan, 2009; Mordue *et al.*, 2005, Benelli *et al.*, 2017), d'autant qu'il un composé biodégradable, sans danger pour les mammifères (Mordue *et al.*, 2010) et n'induit aucun impact sur les organismes microbiens présents dans le sol (Spyrou *et al.*, 2009).

Par conséquent, la présente étude a pour but d'évaluer l'activité d'une formulation commerciale de l'azadirachtine, l'Huile de Neem chez *D. melanogaster*, modèle biologique le plus utilisé en toxicologie (Rand *et al.*, 2014; Scot & Buchon, 2019). Aussi l'objectif de cette étude est donc le suivant :

- Évaluer la toxicité d'une formulation commerciale de l'azadirachtine, l'Huile de Neem, testé par application topique, sur des pupes nouvellement exuviées de *D. melanogaster*. Les testes toxicologique permettront de déterminer les concentrations d'inhibition de l'émergence adulte (CI₁₀, CI₂₅, CI₅₀ et CI₉₀) ainsi que leurs intervalles de confiance respectifs.

Les biopesticides

1. Définition de biopesticides

Les biopesticides ou pesticides bio-rationnels, sont des organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de limiter ou de supprimer les ennemis des cultures tels que les bactéries, champignons, mauvaises herbes, virus et insectes (Deravel *et al.*, 2014, Samada & Tambunan, 2020). Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (Chandler *et al.*, 2011 ; Leng *et al.*, 2011).

Les biopesticides peuvent être aussi bien utilisés en agriculture conventionnelle qu'en agriculture biologique, certains permettent aux plantes de résister à des stress abiotiques et d'une manière générale, ils sont moins toxiques que leurs homologues chimiques (Deravel *et al.*, 2014). Même s'ils ont souvent la réputation d'être moins efficaces que ces derniers, les biopesticides sont l'objet d'un intérêt croissant de la part des exploitants, notamment dans le cadre de stratégies de lutte intégrée (Deravel *et al.*, 2014).

2. Différentes catégories de biopesticides

Les biopesticides sont regroupés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (Chandler *et al.*, 2011).

2.1. Biopesticides végétaux

Les plantes représentent la source la plus importante de biopesticides, en produisant de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs potentiellement applicables dans les programmes de lutte intégrée. Parmi les pesticides d'origines végétales qui ont eu beaucoup de succès sont ceux qui proviennent de l'arbre du Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) (Isman & Grieneisen, 2014). Plusieurs molécules dont d'azadirachtine, la nimbidine, la nimbidinine, la solanine, le déacétylazadirachtinol et méliantriol ont été identifiées comme biologiquement actives dans l'huile extraite des graines de neem. D'autres extraits de plantes ont des activités insecticides ; comme *Tanacetum (Chrysanthemum) cinerariaefolium*, plus communément appelé pyrèthre, dont les principes actifs les pyréthrine, sont neurotoxiques pour les insectes (Deravel *et al.*, 2014).

2.2. Biopesticides microbiens

Cette catégorie comprend les bactéries, champignons, oomycètes, champignons, virus et protozoaires (Arthurs & Dara, 2019). L'efficacité d'un nombre important d'entre eux repose sur des substances actives dérivées des micro-organismes. Ce sont, en principe, ces substances actives qui agissent contre le bio-agresseur plutôt que le micro-organisme lui-même.

2.3. Biopesticides animaux

Ces biopesticides sont des animaux comme les prédateurs, et les parasitoïdes, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées, de scorpions, des hormones d'insectes ou des phéromones (Goettel *et al.*, 2001 ; Saidenberg *et al.*, 2009; Aquiloni *et al.*, 2010).

3. Les avantages et les inconvénients des biopesticides

3.1. Les avantages des biopesticides

- L'un des grands avantages des biopesticides est qu'ils sont élaborés de façon à ne cibler que certains types d'insectes. En d'autres termes, les biopesticides possèdent une spécificité accrue vis-à-vis des espèces contre lesquelles ils sont dirigés, contrairement aux pesticides classiques qui affectent de nombreux organismes différents (oiseaux.....).

- Les biopesticides sont généralement moins toxiques que les pesticides conventionnels.

- Ils sont biodégradables et ne laissent pas de résidus nocifs, peuvent être moins chers que les pesticides chimiques de synthèse lorsqu'ils sont produits localement et peuvent s'avérer plus efficaces à long terme, tout évitant la pollution de l'environnement (sol, air et eau) et les problèmes de résistance grâce à leur mode d'action complexe (Fravel, 2005; Bhattacharjee & Dey 2014; Zaki *et al.*, 2020).

- Certains produits (comme des champignons *Trichoderma*) peuvent avoir des effets complémentaires sur la culture comme la facilitation de l'absorption d'éléments nutritifs du sol par les plantes (Harman, 2011). De même, il a été mis en évidence que certains micro-organismes endophytes et/ou certaines rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ou PGPR) peuvent conférer à certaines cultures une tolérance aux stress abiotiques comme la sécheresse (Compant *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012).

3.2. Les inconvénients des biopesticides

Certains des avantages écologiques des biopesticides, comme leur faible rémanence ou le fait qu'un produit soit actif contre un faible spectre de nuisibles, peuvent être considérés comme des inconvénients. En effet, ces deux avantages écologiques combinés à leur activité souvent dépendante des conditions climatiques et environnementales rendent les biopesticides moins efficaces que leurs homologues chimiques. Certains professionnels de l'agriculture estiment que les biopesticides ne leur conviennent pas car ils ne sont pas assez efficaces. Ces derniers évaluent les résultats du biopesticide à court terme, comme s'il s'agissait d'un substitut aux produits phytosanitaires chimiques. Cependant, la mise en place et l'efficacité d'un contrôle biologique doivent être évaluées sur la durée (Popp *et al.*, 2013).

4. Mode d'action des bioinsecticides

En général, le mode d'action de l'insecticide et du bioinsecticide sont fondées sur la perturbation anatomique, physiologique ou biochimique dans le métabolisme de l'insecte : attaque au système nerveux, perturbation de la respiration cellulaire et de la mise en place de la cuticule (Ralalarinivo, 2010).

L'action de l'insecticide sur les différents insectes varie en fonction des produits utilisés selon leur composition et leur nature. Ils se distinguent par leurs produits actifs qui agissent :

- Par ingestion : au niveau du tube digestif des insectes
- Par contact : souvent absorbés par la cuticule des insectes (couche organique solide constituant le squelette externe des insectes).
- Par inhalation : il s'agit des fumigants gazeux qui se diffusent rapidement dans l'hémolymphe des insectes.
- Sur la chitine (substance organique, principal composant du squelette externe des insectes) : provoquant un dessèchement immédiat et la mort de l'insecte, mais ils n'attaquent pas le système nerveux de l'insecte.
- De manière répulsive : en repoussant les insectes très utilisés comme une véritable barrière (Ralalarinivo, 2010).

5. Caractéristiques des biopesticides

5.1. Sélectivité

Végétaux et insectes ont suivi une coévolution parallèle mais étroitement interdépendante. Les insectes pollinisateurs favorisent la reproduction des plantes supérieures; l'existence d'insectes phytophages est de toute évidence subordonnée à la présence d'espèces végétales qui constituent leur source de nourriture, même si dans certains cas, des dérivés nutritionnelles ? ont pu être observées au cours de phénomènes d'adaptation (Strebler, 1989).

5.2. Spécificité

Les études sur l'efficacité des fractions des plantes aromatiques démontrent qu'il existe une grande variation dans la sensibilité des espèces pour une même huile essentielle (Shaaya *et al.*, 1991). Une même molécule allélochimique n'exerce pas forcément la même activité aux différents stades du cycle reproductif d'un insecte, c'est-à-dire que la sensibilité d'un insecte peut évoluer en fonction de son développement physiologique (Regnault-Roger, 2005).

5.3. Biodégradabilité

Autrefois appelés composés secondaires des plantes, les molécules allélochimiques végétale appartiennent au métabolisme secondaire des polyphénols, terpènes, alcaloïdes ou glucides cyanogénétiques. Ces composés sont facilement biodégradés par voie enzymatique. La durée de demi-vie des composés végétaux est particulièrement courte, allant de quelques heures à quelques jours (Kleeberg & Ruch, 2006).

5.4. Résistance

Comme les antibiotiques, un insecticide phytochimique peut générer des cas de résistance si des applications de ce composé sont faites de manière systémique, répétée et sans discernement. Il faut donc limiter les fréquences d'épandages et surtout varier les formulations en associant plusieurs composés de modes d'action différents (Regnault-Roger, 2008).

5.5. Biodisponibilité

Les molécules allélochimiques biosynthétisées par les végétaux sont sujettes aux facteurs environnementaux, physiologiques et génétiques qui influencent leur biodisponibilité au sein d'une espèce donnée. Toutefois, leur ubiquité dans l'ensemble du règne végétale devrait permettre de limiter cet inconvénient. Il faut cependant être attentif à ce que les développements industriels et commerciaux de nouveaux biopesticides d'origine végétal ne se réalisent pas au détriment de la biodiversité. Pour pallier une absence éventuelle de disponibilité, un débat s'est ouvert récemment pour savoir si les formulations à base d'extraits végétaux pouvaient être enrichies de substances de synthèse ou d'hémisynthèse en tout point identiques aux molécules (Hintz, 2001).

5.6. Courte durée de vie résiduelle

Après leur application, de nombreux biopesticides ne persistent pas longtemps dans l'environnement; ils se détériorent et se dégradent rapidement. En termes techniques, ils sont « non persistants » dans l'environnement, ont des risques moindres d'exposition et sont potentiellement moins dangereux pour les humains et l'environnement (Arnault *et al.*, 2021).

6. Marché des biopesticides

L'utilisation des biopesticides a longtemps été cantonnée à l'agriculture biologique. Ces produits ont été progressivement employés en agriculture conventionnelle car les agriculteurs sont de plus en plus soucieux de leur impact écologique (Frost *et al.*, 2009). Le marché des biopesticides est très en dessous de celui des produits phytosanitaires chimiques. Cependant il est en constante croissance. En 2008, aux USA et en Europe de l'Ouest, il a été estimé à 594,8 millions de dollars. Avec un taux de progression annuel de 8%, il est prévu que ce marché atteindra 1 082,0 millions de dollars en 2015 (Frost *et al.*, 2009). La majorité des biopesticides commercialisés est d'origine microbienne. Il s'agit principalement d'insecticides à base de *Bacillus thuringiensis* (Rosa-Garcia, 2009).

Les fournisseurs de biopesticides sont principalement des petites et moyennes entreprises qui ont des difficultés compréhensibles à développer de nouveaux produits et à commercialiser pleinement ceux déjà existants (Farm Chemical International, 2010). Deux cent soixante biopesticides microbiens sont commercialisés dans les 34 pays de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) (Kabaluk & Gazdik, 2011).

Il ya beaucoup plus de biopesticides disponibles sur le continent Américain qu'en Europe. Des études suggèrent que cet écart serait dû au prix élevé et au délai souvent long du système européen d'autorisation des principes actifs et de la complexité des procédures d'homologation (Keiwnick, 2007).

L'origine biologique des substances et produits proposés à l'homologation ne garantit pas leur approbation. Ainsi des biopesticides d'origines microbienne, animale et végétale se retrouvent dans la liste mise à jour au 21 Octobre 2013 des 783 substances phytosanitaires non approuvées par l'Union Européenne (UE) et d'autres parmi les 440 substances approuvées.

L'arbre de neem

1. Généralité sur le Neem

Les composés bioactifs issus de ressources naturelles renouvelables ont importance significative au cours des dernières années, et le margousier est mondialement bien établi comme une source riche de ces composés fonctionnels. *Azadirachta indica*, l'arbre de neem, appartient à la famille de l'acajou Meliaceae, il est originaire des sous-continentes indiens et la plupart des pays africains. Il a été estimé que 60% de la population mondiale d'arbres de neem habitent l'Inde, et le reste sont trouvés en Afrique, Amérique centrale, Malaisie, Thaïlande, Sri Lanka, Indonésie, Singapour, les Philippines, et les îles des Caraïbes (Khanna *et al.*, 2017).

Au début du XXème siècle, l'arbre est introduit dans plusieurs pays en voie de développement, et particulièrement en Afrique tropicale. Il a fait l'objet d'intenses campagnes de plantations au cours des dernières années, particulièrement au Sénégal où on le trouve aussi bien en campagne qu'en ville (Butterworth & Morgan, 1971).

2. L'arbre de Neem : *Azadirachta indica*

2.1. Origine et distribution géographique

Azadirachta indica A. Juss (Neem) est un arbre de la famille des Méliaceae, originaire de l'Inde et du sud-est de l'Asie, sa présence est aujourd'hui largement répandue dans le monde entier, en particulier dans les pays tropicaux et subtropicaux (Schmutterer, 2002 ; Morgan, 2009 ; Paes *et al.*, 2011 ; Koriem, 2013 ; Chattopadhyay *et al.*, 2014).

2.2. Description botanique

Azadirachta indica A. Juss (Synonymes : *Antelaea azadirachta* L. ou *Melia azadirachta* L.), plus communément de son nom vernaculaire margousier ou, en anglais, Neem (Aribi *et al.*, 2020) est un arbre utilisé en médecine traditionnelle depuis plus de 2000 ans (Mordue *et al.*, 2005; Benelli *et al.*, 2017). C'est une plante verte attrayante avec une multitude de feuilles (Fig. 1). Caractérisée par une croissance rapide et par certaines variétés résistantes aux gelées, mesurant de 6 à 15 m de haut (Gherida & Goetz, 2014), et pouvant atteindre 20 à 30 m (Puri, 1999). Cet arbre est caractérisé aussi par un tronc solide dur, brun foncé avec une croûte brune fissurée de 75 à 150 cm, les feuilles, qui mesurent jusqu'à 25 cm de long, sont constituées de cinq à huit paires de folioles. L'inflorescence en forme de panicules axillaires est constituée de

nombreuses fleurs (Fig. 1). La fleur est aromatique et blanche, et le fruit peut atteindre un centimètre de long. Il est vert et devient jaune lorsqu'il mûrit, et a un goût amer de graine (Ketkar, 1976, Radwanski & Wickens, 1981).

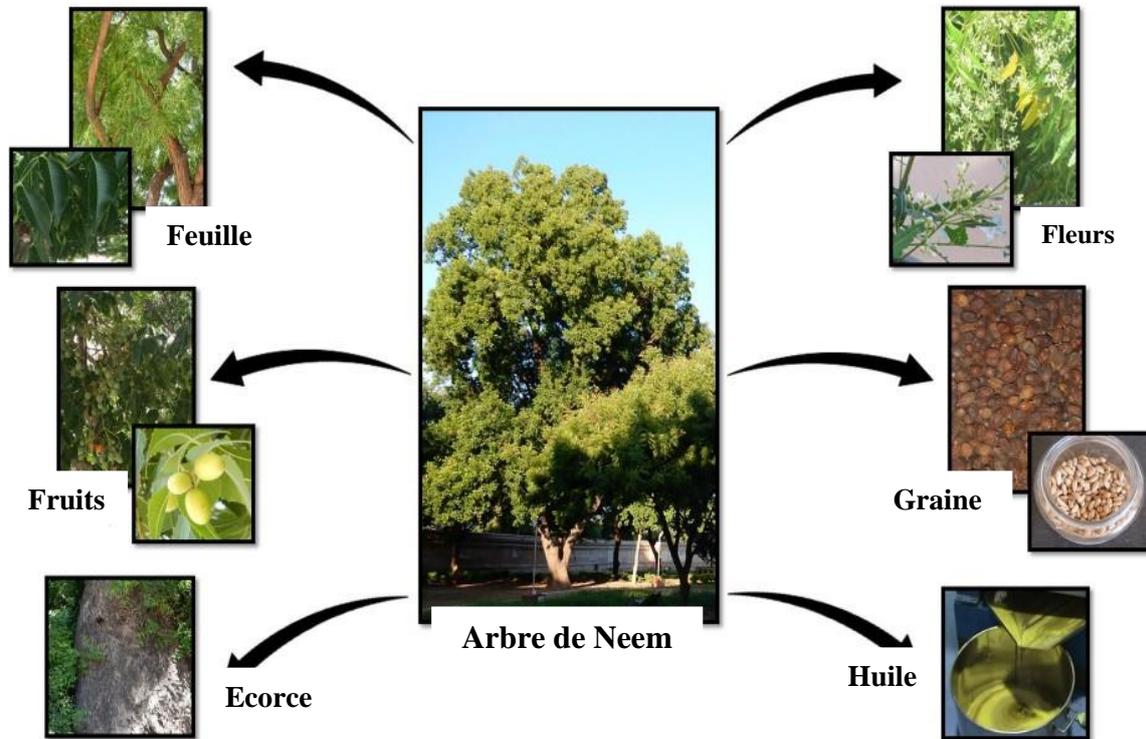


Figure 1. L'arbre de Neem et ses composants (Fernandes *et al.*, 2019).

Neem, Feuille, Fruits, Ecorce, Fleurs, Graine et Huile

2.3. Classification botanique

Le neem peut être classé comme suit (Schmutterer, 1995 ; Puri, 1999):

- Ordre : *Rutales*
- Sous ordre : *Rutineae*
- Famille : *Meliaceae*
- Sous famille : *Melioideae*
- Genre : *Azadirachta*
- Espèce : *Indica A. Juss*

3. Composés bioactifs présents dans *Azadirachta indica*

Au fil du temps, la recherche a montré que l'*Azadirachta indica* est riche en une large gamme de composés, dont plusieurs ont un potentiel pharmacologique. De cet arbre, plus de 300 composés phytochimiques différents ont été identifiés (Saleem *et al.*, 2018, Fernadez *et al.*, 2019), notamment des limonoïdes ou tétranortriterpènes qui comprennent l'azadirachtine, azadirone, azadiradione, etc., des protolimonoïdes du groupe gédunine (nimbine, nimbofine, salanine, etc.), des flavanoïdes (nimbaflavone) et d'autres constituants, comme les tanins, le Bêta-sitostérol et les vilasanine (Ghedira & Goetz, 2014; Gupta *et al.*, 2017). Malgré des concentrations qui varient selon les différents segments du végétal, l'azadirachtine en constitue la molécule prédominante (Gupta *et al.*, 2017; Chaudhary *et al.*, 2017; Fernadez *et al.*, 2019), L'azadirachtine a suscité l'intérêt des chercheurs depuis longtemps, de par la diversité de ses propriétés pharmacologiques, mais aussi par son activité pesticide (Mordue *et al.*, 2005; Fernadez *et al.*, 2019).

Tableau 1: Principaux constituants chimiques d'*Azadirachta indica* (Gherida & Goetz, 2014).

Familles de constituants chimiques principaux	Constituants chimiques principaux
Limonoïdes (C-seco tétranortiterpènes)	Azadirachtine (azadirachtine A), 3-tigloylazadirachtol (azadirachtine B), 1-tigloyl-3-acétyl-11-hydroxyméliacarpine (azadirachtine D), 11-déméthoxycarbonyl azadirachtine (azadirachtine H), 1-tigloyl-3-acétyl-11-hydroxy-11-déméthoxycarbonyl méliacarpine (azadirachtine I), azadiriadione, azadirachtanine, époxyazadiradione
Protolimonoïdes du groupe gédunine	Nimbine, déacetylnimbine, salannine, azadirachtolide, isoazadirolide, margosinolide, nimbandiol, nimbinène, nimbofine A, nimbofine, nimbofineolide, nimbofine, nimocine, nimocinol
Flavonoïdes	Hyperoside, nimbaflavone, quercitrine, quercétine, rutine
Autres constituants	Tanins, β -sitostérol, vilasanine Ca, Mg, P

4. Effets bénéfiques d'*Azadirachta indica*

Azadirachta indica étant une plante connue depuis plus de 2 000 ans pour ses nombreuses vertus thérapeutiques dans de nombreuses zones rurales de régions d'Asie et d'Afrique. Il a également été très étudié par la médecine moderne. En effet ; en Asie, l'arbre de Neem est l'une des principales sources de médicaments naturels, utilisé dans la médecine ayurvédique comme l'un des plus anciens remèdes pour traiter diverses affections et maladies humaines telles que la malaria, le diabète, les infections de la peau, les allergies (comme antihistaminique), l'asthme, les céphalées, les infections microbiennes et virales, le paludisme, les calculs rénaux, mais aussi les maladies cardiovasculaires (hypertension, athérosclérose), gastriques (ulcères) et dermatologiques (plaies septiques, furoncles, démangeaisons dues à la varicelle, gale, leishmaniose) (Biswas *et al.*, 2002; Pasquoto-Stigliani *et al.*, 2017; Aribi *et al.*, 2020). *Azadirachta indica* présente aussi des propriétés fongicides, antiparasitaires (helminthes), antipyrétiques, anti-inflammatoires immunostimulantes, immunomodulatrices, neuroprotectrices (dans la maladie de Parkinson), contraceptives et anticancéreuses (Saleem *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2017; Chaudhary *et al.*, 2017; Chutulo *et al.*, 2018).

Le potentiel fongicide du margousier semble lié à la présence d'azadirachtine et de nimbine (Saleem *et al.*, 2018); son effet anticarcinogène reposerait sur l'azadirachtine et le nimbolide (Fernandez *et al.*, 2019). L'azadirachtine est également utilisée comme répulsif contre les insectes hématophages (les moustiques) qui sont vecteurs de nombreux agents pathogènes pour l'homme (Mordue *et al.*, 2005).

Les extraits de Neem auraient également des effets inhibiteurs sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Patel *et al.*, 2016). Les composés obtenus à partir des feuilles sont décrits comme étant efficaces dans le traitement de l'anorexie et des problèmes de peau. Les fruits sont largement utilisés comme purgatifs et émollients, assumant une grande importance dans le traitement des problèmes intestinaux et urinaires, ainsi que comme agents anticancéreux.

5. Propriétés insecticides d'*Azadirachta indica*

L'azadirachtine est le composé le plus abondant, le plus puissant et le plus performant présent dans *Azadirachta indica* (Morgan, 2009). Ce composé se trouve dans les différentes parties de l'arbre de Neem (graines, callosités, fruits et feuilles) ; utilisé avec succès dans les agro-écosystèmes (Mordue *et al.*, 2005 ; Benelli *et al.*, 2017) . L'azadirachtine possède une activité biopesticide contre les insectes de différents ordres (Mordue *et al.*, 2005; Poland *et al.*, 2016) avec un mode d'action multiple interférant avec différents processus physiologiques et biochimiques de l'insecte.

5.1. Effets régulateurs de croissance

Le mode d'action le plus connu de l'azadirachtine est son effet perturbateur de croissance des insectes (IGDs). En effet, l'azadirachtine est connu pour être un antagoniste des deux principales hormones (Hormone juvénile : HJ et ecdysone "forme active 20-hydroxyecdysone (20E) qui contrôlent la reproduction et le développement chez les insectes (Mordue *et al.*, 2005 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2021).

Son action principale est sa capacité à modifier ou supprimer les taux hémolymphatiques de ces deux hormones en inhibant la libération de neurohormones prothoracicotrope (PPTH) et allatotropine responsables respectivement de la biosynthèse et la sécrétion des ecdystéroïdes et de l'HJ induisant ainsi une perturbation du développement de l'insecte (Mordue & Blackwel, 1993 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2017).

5.2. Effets sur le système nerveux

L'azadirachtine interfère avec le système nerveux central (SNC) par inhibition de la transmission cholinergique excitatrice *via* les canaux calciques (Qiao *et al.*, 2014) mais aussi sur la voie de signalisation de l'insuline (Shao *et al.*, 2016). Cependant, les mécanismes d'action de l'azadirachtine restent encore inconnus.

5.3. Effets sur la reproduction

Les effets de l'azadirachtine sur les différents paramètres reproducteurs ont été rapportés chez plusieurs espèces d'insectes (Tomé *et al.*, 2013; Er *et al.*, 2017; Oulhaci *et al.*, 2018). L'azadirachtine entraîne une réduction de la fécondité, de la fertilité et une stérilité chez différents insectes (Mordue *et al.*,). Il interfère également avec le comportement d'oviposition des insectes et le choix du site de ponte (Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016).

5.4. Effets anti-appétant

Parmi les différentes propriétés attribuées à l'azadirachtine, l'activité anti-appétante est la plus documentée (Schmutterer & Singh, 1995 ; Mordue *et al.*, 2005). L'effet anti-appétant primaire de l'azadirachtine est lié à une action directe du bioinsecticide sur les centres contrôlant l'alimentation et le métabolisme chez l'insecte. L'azadirachtine stimule les cellules chimioréceptrices, 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 conduisant ainsi à une inhibition de l'alimentation (Blaney *et al.*, 1990 ; Simmonds & Blaney 1996 ; Mordue (Luntz) *et al.*, 1999). Cette activité représente, l'effet anti-appétant primaire de l'azadirachtine. 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 (Rharrabe *et al.*, 2008 ; Khosravi & Sendi, 2013 ; Kilani Morakchi *et al.*, 2017).

5.5. Effets moléculaires

Le traitement à l'azadirachtine augmente l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion S-transférase (GST) et induit l'expression génique des ces enzymes antioxydantes (Zhang *et al.*, 2018) et ce dans un but de protection contre les dommages oxydatifs causés par une augmentation et une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) déclenchées par une réponse au stress causé par l'azadirachtine.

*Matériel et
Méthodes*

Materiel et Methodes

1. Matériel biologique

1.1. La drosophile : Organisme modèle

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830) communément appelée mouche du vinaigre, est un organisme modèle dans toutes les sous-disciplines de la biologie ou presque. Son génome entièrement séquencé (Adams, 2000), sa facilité et son faible coût d'élevage, son cycle de reproduction court (10 à 12 jours à 25° C), sa petite taille (3-4 mm) ainsi que la disponibilité de nombreux outils génétiques et moléculaires font de cette mouche un organisme modèle de premier choix dans de nombreux axes de recherche scientifique et médicale. 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 ses recherches en immunologie. Aujourd'hui, la drosophile est essentiellement utilisée en biologie du développement (Haase 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). Le dernier prix Nobel a été obtenu en 2017 par Jeffrey C. Hall et ses collaborateurs pour leurs études sur les mécanismes moléculaires qui contrôlent le rythme circadien.

1.2. Présentation du matériel biologique

D. melanogaster est un petit insecte Diptère de couleur jaune brunâtre avec un abdomen plutôt court et rayé de bandes sombres. Mesurant environ 3 ou 4 mm de long (Fig. 2), elle est cosmopolite, hygrophile et luciole (Baudry, 1998).

Cette espèce présente un dimorphisme sexuel (Va *et al.*, 2009) permet de différencier les mâles et les femelles (Fig. 2). L'extrémité abdominale est foncée et arrondie chez le mâle (Fig. 2B) mais plus claire et pointue chez la femelle (Fig. 2A). Le mâle se distingue aussi par sa plus petite taille (2 à 3 mm) et par la présence de « peignes sexuels » (Fig. 3) sur ses pattes avant.

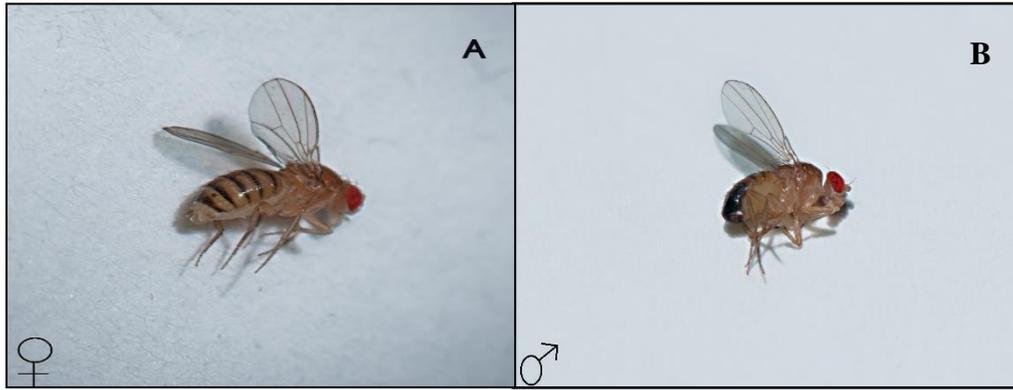


Figure 2. Femelle et Mâle de *Drosophila melanogaster*
(A : Cr x 6,87 ; B : x 5,94).



Figure 3. Peignes sexuels. www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/images/drospatf.

Sa position systématique est la suivante :

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> .(Meigen, 1830).

1.3. Cycle biologique

D. melanogaster se reproduit très rapidement et de façon continue (cycle de vie court). Au laboratoire, à une température de 25 °C, une nouvelle génération est obtenue tous les 12 jours ; ceci correspond en moyenne à 25 générations par an, (Griffiths *et al.*, 2002; Tavernier & Lizeaux, 2002). Le cycle de vie de *D. melanogaster* comprend 4 stades : embryonnaire, larvaire, pupal et adulte (Fig. 4), tous utilisés comme modèle en laboratoire pour l'étude de divers processus biologiques (Jennings, 2011; Pandey & Nichols, 2011).

Œufs : La femelle pond des centaines d'œufs (200 à 300 œufs) sur des fruits en putréfaction ou d'autres matières humides ou en fermentation, les œufs pondus sont à peine visibles, de couleur blanchâtre, allongés d'environ 0,5 mm de long et ont la forme d'un ballon de rugby (Tavernier & Lizeaux, 2002).

Stade larvaire: Vingt-trois heures après la ponte, les œufs vont éclore pour donner naissance à une larve blanchâtre appelée aussi « 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 dernier stade (110 h après la ponte), les larves de 3^{ème} stade cessent de s'alimenter, sortent du milieu nutritif et entame une phase d'errance. A son terme, les larves secrètent une glu et se fixent sur un support.

Stade pupal : L'éversion des spiracles antérieurs 120 h après la ponte, définit le début du stade pré-pupale qui durera 12 h. La dernière cuticule larvaire se tanne rapidement et devient le puparium, dans lequel la métamorphose va se dérouler. La métamorphose 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 formés à partir des disques imaginaux (Compbell & Reece, 2006; Quinn *et al.*, 2012).

Stade adulte: A la fin du stade pupale, la jeune drosophile adulte non encore pigmentée sort de la puppe 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 puppe. 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).

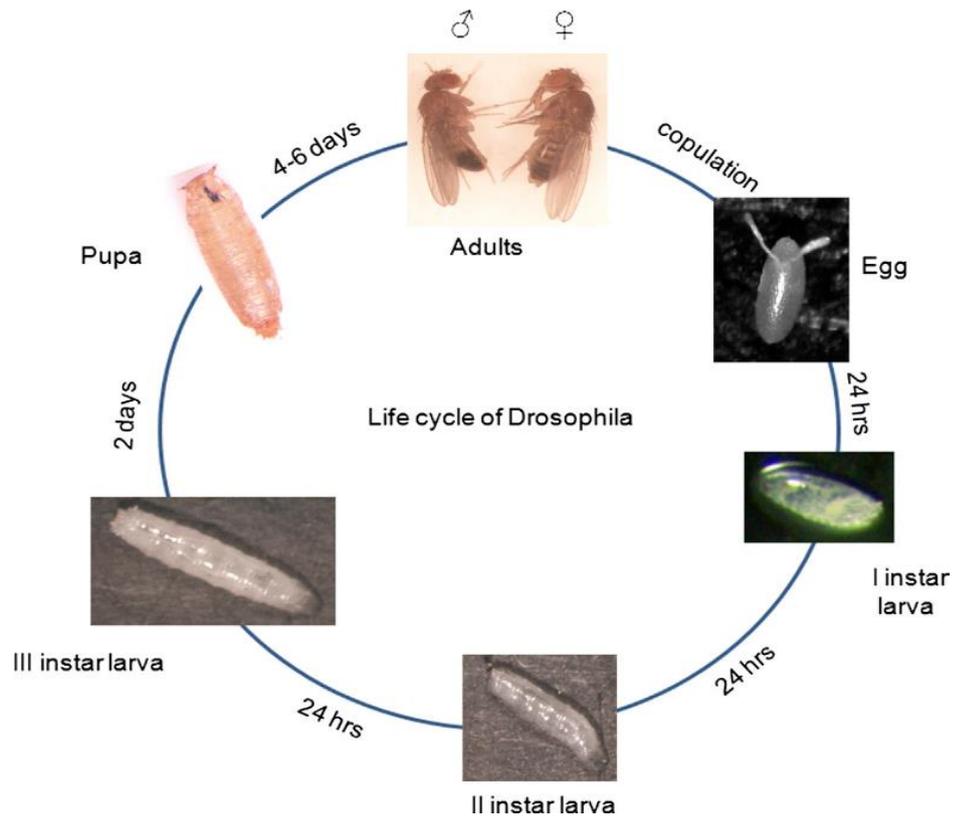


Figure 4. Cycle de vie de *D. melanogaster* à 25°C (Ram & Chowdhuri, 2014).

1.4. Elevage au laboratoire

L'élevage *D. melanogaster* (souche Canton S : souche de référence) est réalisé, en laboratoire dans une étuve, à une température de 25°C, une hygrométrie de 70% et une scotophase de 12 h.

Le milieu nutritif artificiel gélosé sur lequel est élevée la drosophile est à base de farine de maïs et de levure de bière. Il est composé essentiellement de :

- 33,3 g semoule de maïs
- 33,3 g levure de bière
- 4,8 g d'agar-agar
- 20 ml d'antifongique (méthyl-hydroxy-4-benzoate à 10% dans l'éthanol à 95 %)
- Eau distillée

Les drosophiles sont élevées dans des flacons de plastique et bouchés par un tampon de mousse (Fig. 5). Les mouches sont transférées tous les 3 jours dans des tubes contenant un nouveau milieu afin d'éviter toute compétition entre les larves.



Figure 5. Elevage de *D. melanogaster* au laboratoire.

2. Présentation de l'Huile de Neem

Le biopesticide commercialisé sous le nom de l'Huile de Neem comprend trois substances actives la Nimbine, la Salanine et l'Azadirachtine (Emulsion Concentrée (EC); Firme: H3D Terraneem-France). La formule chimique de la Nimbine, la Salanine et l'Azadirachtine est de $C_{30}H_{36}O_9$ (540 g/mol), $C_{34}H_{44}O_9$ (596 g/mol) et $C_{35}H_{44}O_{16}$ (720,7 g/mol) respectivement (Fig. 6). Cette formulation, insoluble dans l'eau, correspond à un liquide jaune avec une odeur caractéristique du Neem.

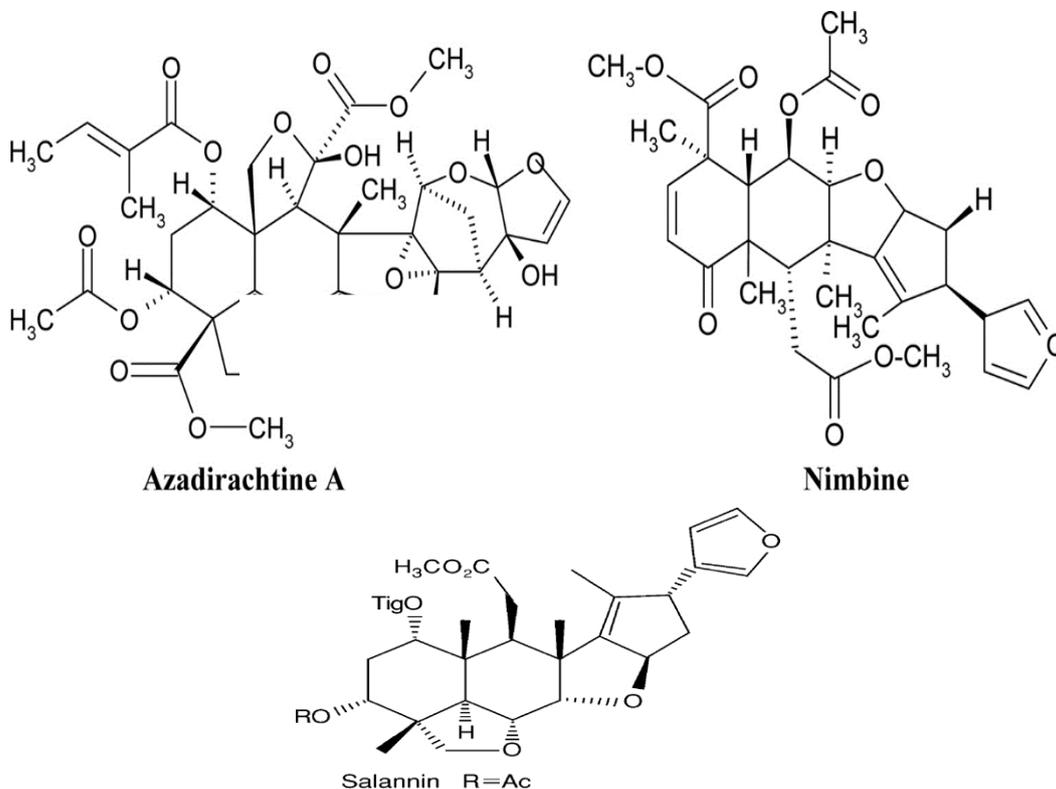


Figure 6. Structure chimique de trois constituants principaux de l'huile de Neem (Mordue *et al.*, 2005; Gherida & Goetz, 2014).

3. Traitement des insectes

Le biopesticide a été dissous dans l'acétone et administré par application topique (1 μ l/pupe), à l'aide d'une micro-seringue (Hamilton) (Fig. 07). Dans le but de standardiser l'élevage et d'obtenir des pupes 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 heures. Les adultes sont alors retirés et les tubes sont maintenus dans les conditions standards (citées plus haut) (Fougeron, 2011). Après 6 jours les pupes obtenues seront alors au début de stade pupal.



Figure 7. Procédure expérimentale pour les essais toxicologiques.

4. Essais toxicologiques

L'Huile de Neem a été testé, par application topique (1 μ l), sur pupes nouvellement exuviées (0 jour) de *D. melanogaster*. Le biopesticide à été dissous dans l'acétone (solvant) et différentes solutions stocks ont été préparées. Après un screening préalable, le biopesticide à été testé à différentes concentrations 0,05; 0,1; 0,162; 0,325; et 0,65 % correspondant respectivement aux concentrations 0,5; 1; 1,62; 3,25 et 6,5 μ g/ μ L. Les tests de toxicité ont été réalisés dans des boîtes de Pétri en plastique comportant chacune 30 individus; trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration (Fig. 7). Une série témoin est conduite en parallèle et les individus reçoivent uniquement 1 μ l de solvant (Acétone). Les pupes des séries témoins et traitées sont maintenues dans les conditions standard citées plus haut.

La mortalité observée des différentes séries a été déterminée à partir de la mortalité des pupes, des mues imaginaires incomplètes et des adultes malformés ; puis corrigés 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), cités par Fisher et Yates (1957). Les données ainsi normalisées font l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification et un classement des concentrations par le test HSD de Tukey, afin d'évaluer l'effet de l'Huile de Neem. Enfin, la régression non linéaire exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme de la concentration a permis d'estimer, pour l'Huile de Neem, les concentrations létales et sublétales (CI₁₀, CI₂₅, CI₅₀ et CI₉₀) ainsi que leurs intervalles de confiance (95 % IC).

5. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont représentés par la moyenne suivie de l'écart type ($m \pm sd$). Pour toutes les séries de données l'égalité des variances a été confirmée grâce aux tests de Bartlett et Levene avant l'utilisation des tests paramétriques.

La 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 variance à un critère de classification suivie du test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey a été utilisés pour mettre en évidence des différences entre les échantillons mais aussi pour définir des groupes ou des classes selon leurs effets (classement des doses).

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism d'analyse et de traitement statistique des données version 6.01 pour Windows (GraphPad software, La Jolla California, USA, www.Graphpad.com).

RESULTATS

Résultats

L'efficacité d'une formulation commerciale, Huile de Neem a été testée, par application topique, sur des pupes nouvellement exuviées de *D. melanogaster*. Les pourcentages d'inhibition de l'émergence adulte ont été calculés pour les différentes séries à partir des mues incomplètes, des adultes malformés (ailes déformés) avec une forme de corps courbée et plus petite, des pupes brûlées ainsi que des adultes morts à l'intérieur des pupes (Fig. 8).

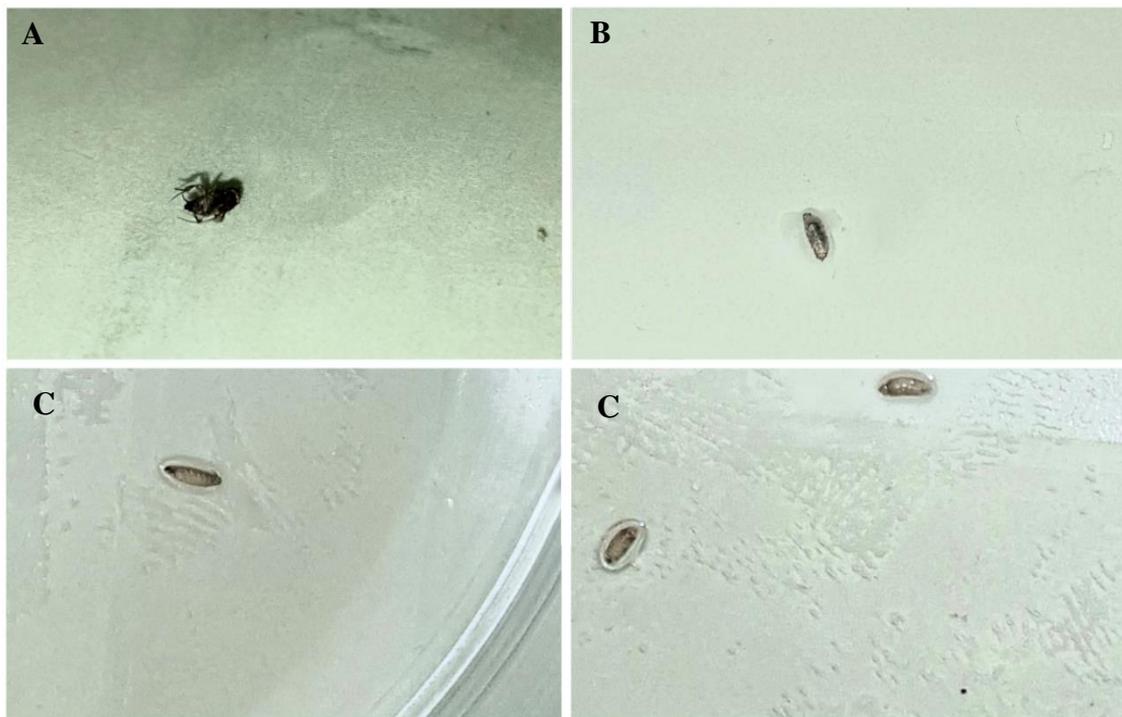


Figure 8. Exemples des malformations les plus fréquentes chez *D. melanogaster* après traitement des pupes nouvellement exuviées à l'Huile de Neem.

A : Adulte malformé (ailes malformés, forme du corps courbée et plus petite) ; **B :** Adulte mort à l'intérieur d'une pupe ; **C :** Pupe brûlée.

Le traitement avec l'Huile de Neem, en application topique à des concentrations variant de 0,5 à 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ le jour de l'exuviation nymphale de *D. melanogaster*, induit une inhibition de l'émergence adulte dont les pourcentages sont précisés dans le tableau 2.

Le pourcentage d'inhibition observée enregistré, de l'ordre de $10,44 \pm 1,97 \%$ chez les séries témoins (inhibition naturelle). Ce pourcentage d'inhibition naturelle augmente, chez les séries traitées significativement en fonction des concentrations; ainsi, il est noté, pour la concentration la plus élevée, un pourcentage d'inhibition observée de $96,15 \pm 3,84 \%$.

Résultats

Tableau 2 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Inhibition observée (%) de l'émergence adulte ($m \pm \text{SEM}$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).

Répétition	Témoins	0,5	1	1,62	3,25	6,5
R1	13,33	23,33	46,66	80	70	100
R2	11,33	23,33	53,33	76,92	98,33	88,46
R3	6,66	13,33	46,66	60	90	100
m \pm SEM	10,44 \pm 1,97	19,99 \pm 3,33	48,88 \pm 2,22	72,30 \pm 6,21	86,11 \pm 8,40	96,15 \pm 3,84

Les pourcentages de l'inhibition corrigée de l'émergence adultes correspondant à l'effet seul de l'Huile de Neem (soustraction de la mortalité naturelle) ont été ensuite précisés dans le tableau 3. Les résultats obtenus, montrant une augmentation de l'inhibition de l'émergence adulte en fonction des concentrations, indiquent des valeurs varient de $10,80 \pm 1,94$ % à la concentration la plus faible ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) à $95,67 \pm 4,33$ % à la concentration la plus forte ($6,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Tableau 3).

Tableau 3 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Inhibition corrigée (%) de l'émergence adulte. ($m \pm \text{SEM}$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).

Concentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,5	1	1,62	3,25	6,5
R1	11,53	38,45	76,92	65,38	100
R2	13,74	47,49	74,03	98,12	87,01
R3	7,14	42,85	57,14	89,28	100
m \pm SEM	10,80 \pm 1,94	42,93 \pm 2,61	69,36 \pm 6,16	84,26 \pm 9,77	95,67 \pm 4,33

Résultats

L'analyse de la variance à un critère de classification réalisée après transformation angulaire des pourcentages de l'émergence adulte présentée dans le tableau 4, révèle des différences hautement significatives entre les différentes concentrations testées ($F_{(4,10)} = 25,22$; $P < 0,0001$).

Tableau 4 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : sur le pourcentage d'inhibition corrigé de l'émergence adulte ($m \pm \text{SEM}$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune) : Analyse de la variance à un critère de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	6830	4	1707	25,22	0,0001***
Erreur résiduelle	676,9	10	67,69	-	-
Total	7507	14	-	-	-

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

Un classement des concentrations réalisé, grâce au test HSD de Tukey, permet de classer les concentrations testées en fonction de leur toxicité (Fig. 9). Le test HSD de Tukey met en évidence 5 groupes de concentrations qui révèlent une toxicité significativement différente de l'Huile de Neem (Fig. 9) ; ainsi une toxicité accrue est observée en fonction des concentrations croissantes du biopesticide : **0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ < 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ < 1,62 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ < 1,62 et 3,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ < 3,25 et 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.**

Une régression non linéaire a permis d'obtenir la courbe concentration-réponse chez les pupes de *D. melanogaster* ; cette courbe, exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la concentration de l'Huile de Neem présente un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 0,98$) démontrant une liaison très forte entre le pourcentage d'inhibition corrigé et le logarithme de la concentration (Fig. 10). Par ailleurs, cette analyse a permis d'estimer les valeurs des différentes concentrations d'inhibition de l'émergence adulte (CI) mentionnées dans le tableau 5 ainsi que leurs intervalles de confiance (95%) et le Hill Slope.

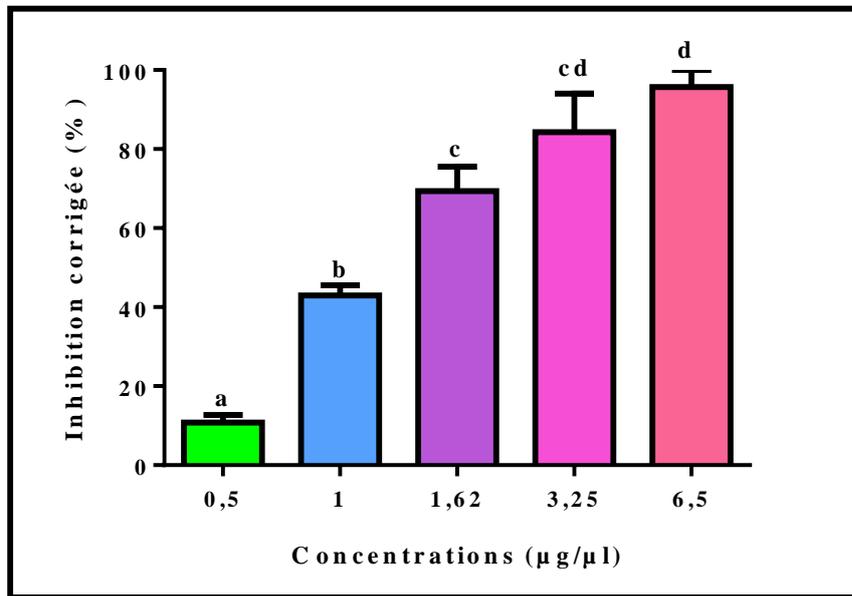


Figure 9. Toxicité de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes concentration (µg/µl) le jour de l’exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Inhibition corrigée de la mue adulte. Les lettres représentent le classement des concentrations selon le test HSD de Tukey.

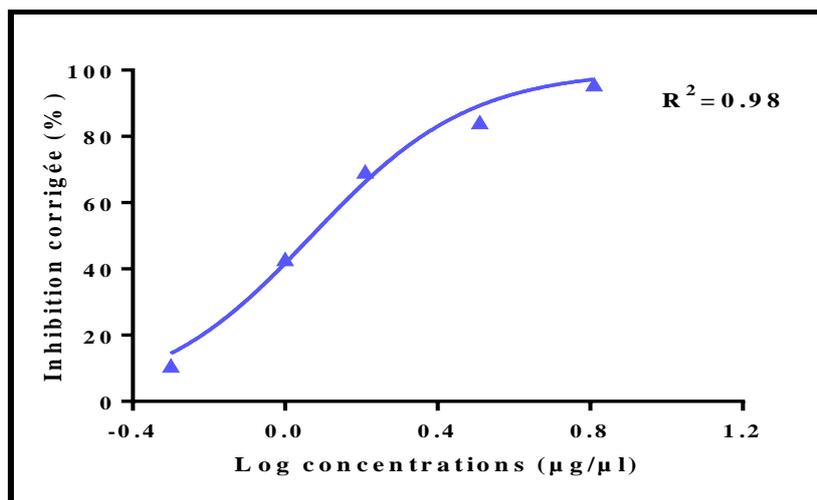


Figure 10. Courbe concentration-réponse exprimant le pourcentage d’inhibition corrigée en fonction du logarithme de la concentration de l’Huile de Neem (µg/µl), administrée *in vivo*, par application topique le jour de l’exuviation nymphale chez *D. melanogaster*. $R^2 = 0,98$. $Y = 100/1+10^{(\log EC50 - X)*Hill\ Slope}$.

Résultats

Tableau 5 : Toxicité de l'Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Détermination des concentrations d'inhibition de l'émergence adulte (CI en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et leurs intervalles de confiance à 95%.

	Valeur ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Intervalle de confiance	Erreur standard	R ²
CI₁₀	0,40	[0,26 - 0,61]	0,23	0,98
CI₂₅	0,68	[0,52 - 0,89]		
CI₅₀	1,17	[0,98 - 1,38]		
CI₉₀	3,38	[2,26 - 5,058]		
Hille slope	2,06	[1,33 - 2,80]		

DISCUSSION

Discussion

Dans la présente étude, une formulation commerciale de l'azadirachtine (Huile de Neem), à été testée, par application topique, chez *D. melanogaster* sur des pupes nouvellement exuviées. Nos résultats révèlent que l'huile de Neem provoque des effets létaux et sublétaux lors de la formation des pupes conduisant à l'inhibition de l'émergence adulte. De plus, le traitement induit plusieurs anomalies morphologiques dont : Pupes brûlées, adultes malformés (ailes déformées, taille corporelle plus petite et abdomen déformé) ainsi que des adultes morts à l'intérieur des pupes. Les malformations enregistrées conduisent à la mort de l'insecte. Les concentrations d'inhibition de l'émergence adulte, sont respectivement de l'ordre de 0,40, 0,68, 1,17 et 3,38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour les CI_{10} , CI_{25} , CI_{50} et CI_{90} .

La toxicité de l'azadirachtine, largement reportée dans la bibliographie. Elle varie en fonction de l'ordre de l'insecte, du stade de développement, du mode d'application (Ingestion, Topique) mais aussi, de la formulation commerciale utilisée (Tomé *et al.*, 2013; Koodalingam *et al.*, 2014; Asaduzzaman *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2017; Taffar *et al.*, 2021 ; Guettal *et al.*, 2021). En effet, il est important de noter que la sensibilité des insectes aux insecticides varie avec la régulation des récepteurs membranaires (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010), le taux de pénétration à travers la cuticule, l'absorption par les insectes, le transport dans les tissus du corps et le métabolisme (Besard *et al.*, 2011).

La réduction des pourcentages de pupaison et d'émergence adultes sous l'effet de l'azadirachtine a été rapportée chez différents insectes tels que *D. melanogaster* (Anjum *et al.*, 2010), *Plodia interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012), *Aedes aegypti* (Koodalingam *et al.*, 2014), *Helicoverpa armigera* (Ahmad *et al.*, 2015), et *Tirathaba rufivena* (Zhong *et al.*, 2017) affectant ainsi leur cycle vie.

Récemment, Taffer *et al.*, (2021) ont démontré qu'une formulation commerciale de l'azadirachtine (le Neem-Azal) administré par application topique chez des pupes nouvellement exuviées d' *Ephestia kuehniella* Zeller induit une inhibition de l'émergence adulte.

Plusieurs travaux démontrent également l'efficacité de ce biopesticide dans le contrôle de différentes espèces d'insectes adultes notamment les Lépidoptères, les Hyménoptères, les Hémiptères ou encore les Coléoptères (Tomé *et al.*, 2013; Abedi *et al.*, 2014; Asaduzzaman *et al.*, 2016; Guettal *et al.*, 2021).

Chez *D. melanogaster*, le stade pupal (où se réalise le traitement) se caractérise par le plus important pic de 20-hydroxyecdysone (20 E) qui est strictement corrélé au développement des structures de l'adulte (Quinn *et al.*, 2012). A cette étape du développement, la 20E contrôle les différents aspects de la métamorphose, où 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). Toute interférence dans l'homéostasie de la 20 E avec des sources exogènes d'agonistes ou antagonistes, peut conduire à une perturbation du développement de l'insecte (Dhadialla *et al.*, 2010 ; Smagghe *et al.*, 2012).

Ainsi, les différents effets négatifs induits par l'Huile de Neem (inhibition de l'émergence adulte et la perturbation de la métamorphose) après traitement des pupes de *D. melanogaster* semblent être liés à l'action antagoniste de l'azadirachtine sur la 20 E; en effet, ce biopesticide, est connu pour avoir une action inhibitrice sur le système endocrinien et neuroendocrinien (Morgan, 2009) ; selon la littérature, l'inhibition de la mue pourrait être due à un blocage de la synthèse et la libération des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques *via* l'action spécifique de l'azadirachtine sur la libération de l'hormone prothoracicotropique (PTTH) (Mordue *et al.*, 2005). L'azadirachtine peut affecter directement la production de l'enzyme responsable de la conversion de l'ecdysone (E) en 20 E au niveau du corps gras et de l'intestin moyen (Mordue *et al.*, 2005).

Enfin, l'impact de ce biopesticide est aussi observé sur la modulation de l'expression de gènes liés au développement, au stress et à l'immunité (Lai *et al.*, 2014 ; Shaurub *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.

Conclusion &
PERSPECTIVES

Conclusion & perspectives

Le Neem ou *Azadirachta indica* source remarquable de molécules biologiquement actives est connu pour ces propriétés médicinales depuis des millénaires. L'huile essentielle de cette plante est une huile végétale dont les bienfaits proviennent de siècle. Divers travaux effectués sur cette huile montrent qu'elle possède beaucoup d'activité biologique dont l'activité anti-inflammatoire, antivirale, antiseptique et antifongique...etc.

Nos expérimentations ont été menées dans le but d'évaluer les effets de l'exposition d'une formulation commerciale de l'huile essentielle de l'arbre *Azadirachta indica* sur la toxicité chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*.

Les essais biologiques révèlent que l'huile de Neem entraîne une inhibition de l'émergence adulte qui augmente significativement en fonction de la concentration. Les concentrations sublétales et létales (CI₁₀, CI₂₅, CI₅₀ et CI₉₀), déterminées à partir d'une courbe concentration-réponse sont respectivement de 0,40, 0,68, 1,17 et 3,38 µg/µl.

Une exposition à l'huile de Neem entraîne également l'apparition de plusieurs malformations et anomalies morphologiques chez *D. melanogaster*, ces effets peuvent être liés à l'action antagoniste de l'azadirachtine sur les principales hormones contrôlant le processus de développement (Hormone Juvénile/Ecdystéroïdes).

Le biopesticide à base d'huile essentielle de Neem est inoffensif pour l'environnement. Elle est sélectivement toxique, ne s'accumule pas et a une courte persistance dans l'écosystème, suggère que ce biopesticide pourrait être utilisé dans le contrôle des insectes nuisibles, et ce dans le cadre des programmes de lutte intégrée.

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

- Suivre le développement de l'insecte sur un milieu contenant l'huile de Neem.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology* 18, 265–267.

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). *Journal of economic entomology* 107, 638–645.

Abhilash, P.C., Singh, N., 2009. Pesticide use and application: an Indian scenario. *Journal of hazardous materials* 165, 1–12.

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 genomes sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.

Ahmad, S., Ansari, M.S., Muslim, M., 2015. Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Crop Protection* 68, 72–78.

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*. *Journal of Animal & Plant Sciences* 20, 9–12.

Aquiloni, L., Gherardi, F., 2010. The use of sex pheromones for the control of invasive populations of the crayfish *Procambarus clarkii*: a field study. *Hydrobiologia* 649, 249–254.

Aribi, N., Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Joly, D., 2020. L'azadirachtine, un pesticide naturel aux effets multiples. *médecine/sciences* 36, 44–49.

Arnaud, A., Prudent, L., Laffont-Schwob, I., 2021. Évaluation du risque sanitaire de sols pollués méditerranéens : Choix de variables et spatialisation. *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement* 21(1).

Arthurs, S., Dara, S.K., 2019. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of invertebrate pathology* 165, 13–21.

Asaduzzaman, M., Shim, J.-K., Lee, S., Lee, K.-Y., 2016. Azadirachtin ingestion is lethal and inhibits expression of ferritin and thioredoxin peroxidase genes of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 19, 1–4

Baudry, M., 1998. Encyclopédie des sciences, La pochothèque. *Librairie générale française, Paris.*

- Ben Mrid, R., Benmrid, B., Hafsa, J., Boukcim, H., Sobeh, M., Yasri, A., 2021.** Secondary metabolites as biostimulant and bioprotectant agents: A review. *Science of the Total Environment* 777, 146204.
- Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Murugan, K., Pavela, R., Nicoletti, M., 2017.** Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? *Natural product research* 31, 369–386.
- Besard, L., Mommaerts, V., Abdu-Alla, G., Smagghe, G., 2011.** Lethal and sublethal side-effect assessment supports a more benign profile of spinetoram compared with spinosad in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Pest Management Science* 67, 541–547.
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., 2016.** Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 133, 85–90.
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S., Maroua, F., Aribi, N., 2017.** Azadirachtin induced larval avoidance and antifeeding by disruption of food intake and digestive enzymes in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pesticide biochemistry and physiology* 143, 135–140.
- Bhattacharjee, R., Dey, U., 2014.** An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. *African Journal of Microbiology Research* 8, 1749–1762.
- Bilal, M., Iqbal, H.M., Barceló, D., 2019.** Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. *Science of the Total Environment* 695, 133896.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U., 2002.** Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current science* 1336–1345.
- Blaney, W.M., Simmonds, M.S.J., Ley, S.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.
- Butterworth, J.H., Morgan, E.D., 1971.** Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*. *Journal of Insect Physiology* 17, 969–977.

Campbell, N.A., Reece, J.B., 2006. Biología. Ed. *MédicaPanamericana*.

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. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366, 1987–1998.

Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R., 2014. Artificial sweeteners—a review. *Journal of food science and technology* 51, 611–621.

Chaudhary, S., Kanwar, R.K., Sehgal, A., Cahill, D.M., Barrow, C.J., Sehgal, R., Kanwar, J.R., 2017. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Frontiers in plant science* 8, 610.

Chutulo, E.C., Chalannavar, R.K., 2018. Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *Azadirachta indica*: a comprehensive review. *Journal of Fungi* 4, 42.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for Utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 669–678.

Copping, L.G., Duke, S.O., 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science* 63, 524–554.

Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health* 8, 1402–1419.

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., Retnakaran, A., Smagghe, G., 2010. Insect growth and development disrupting insecticides. In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds). *Insect Control*. Elsevier, New York. USA. 121-166.

Dimetry, N.Z., 2014. Different plant families as bioresource for pesticides. In : Singh, D. (Ed). *Advances in Plant Biopesticides*. Springer, New York, Dordrecht, London. 1-20.

Dukas, R., 2008. Evolutionarybiology of insectlearning. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 145–160.

Er, A., Taşkıran, D., Sak, O., 2017. Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera : Pyralidae). *Arch Biol Sci* 69: 335–344.

Farm Chemical Internationals.,2010. Biological pesticide on the rise, www.farmchemicalsinternational.com/uncategorized/biological-pesticides ontherise/,(03.02.14).

Fernandes, S.R., Barreiros, L., Oliveira, R.F., Cruz, A., Prudêncio, C., Oliveira, A.I., Pinho, C., Santos, N., Morgado, J., 2019. Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. *Fitoterapia* 134, 141–150.

Fisher, R.A., Yates, F., 1957. Statistical tables for biological, agricultural, and medical research, 5^{eme}. ed. Olivier et Boyd, london.

Fougeron, A.-S., 2011. Réponses comportementales et préférences envers les acides gras à longue chaîne chez *Drosophila melanogaster* (PhD Thesis). Université de Bourgogne.

Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337–359.

Frost & Sullivan., 2009. North American and Western European biopesticides market. M472-39.

Ghedira, K., Goetz, P., 2014. *Azadirachta indica* A. Juss- Neem, Meliaceae. *Phytothérapie* 12:252-257.

Goettel, M.S., Hajek, A.E., 2001. Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. Evaluating indirect ecological effects of biological control 81–97.

Griffiths, A.J.F., Miller J. H., Suzuki D. T., Sanlavielle C., Lewontin R. C. & Gelbart W.M. 2002. Introduction à l'analyse génétique. 3^{eme} édition *De Boeck Université*. 860p.

Guettal, S., Tine, S., Tine-Djebbar, F., Soltani, N., 2021. Repellency and toxicity of azadirachtin against *granary weevil Sitophilus granarius* L (Coleoptera: Curculionidae). *Agriculture International*.

Gupta, S.C., Prasad, S., Tyagi, A.K., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., 2017. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine* 34, 14–20.

Haase Gilbert, E., Kwak, S.-J., Chen, R., Mardon, G., 2013. Drosophila signal peptidase complex member Spase12 is required for development and cell differentiation. *PLoS One* 8, e60908.

Harman, G.E., 2011. Trichoderma—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39, 103–108.

Hintz, W., 2001. Working group report of biological Canadian weed science society. Site Web: http://www.cwss-scm.ca/biological_control.htm.

Isman, M.B., Grieneisen, M.L., 2014. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends in plant science* 19, 140–145.

Jan, M.T., Abbas, N., Shad, S.A., Saleem, M.A., 2015. Resistance to organophosphate, pyrethroid and biorational insecticides in populations of *spotted bollworm*, *Earias vittella* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), in Pakistan. *Crop Protection* 78, 247–252.

Jennings, B.H., 2011. Drosophila—a versatile model in biology & medicine. *Materialstoday* 14, 190–195.

Kabaluk, T. & Gazdik K., 2011. Directory of microbial pesticides for agricultural crops in OEDC countries. Ottawa, ON, Canada: Agriculture and Agri-Food Canada, <https://www4.agr.gc.ca/MPDD-CPM/search-recherche.do?lang=eng>.

Ketkar, C.M., 1976. Utilization of neem (*Azadirachta indica* Juss.) and its by-products [sic].

Khanna, J., Medvigy, D., Fueglistaler, S. and Walko, R., 2017. Regional dry-season climate changes due to three decades of Amazonian deforestation. *Nature Climate Change*, 7(3), pp.200-204.

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). *Journal of Plant Protection Research* 53.:238–247.

Kiewnick, S., 2007. Practicalities of developing and registering microbial biological control agents. *CAB Rev* 2, 1–11.

- Kilani-Morakchi, S., Bezzar-Bendjazia, R., Ferdenache, M., Aribi, N., 2017.** Preimaginal exposure to azadirachtin affects food selection and digestive enzymes in adults of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pesticide biochemistry and physiology* 140, 58–64.
- Kilani-Morakchi, S., Morakchi-Goudjil, H., Sifi, K., 2021.** Azadirachtin-based insecticide: Overview, risk assessments, and future directions. *Front. Agron.* 3: 32.
- Kleeberg, H., Ruch, B., 2006.** Standardization of Neem-extracts, proceedings of international Neem conference, kuming, china 11-15 November 2006, 1-11.
- 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*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17, 175–181.
- Korangi Alleluya, V., Kubindana, G., Fingu Mabola, J., Sulu, A., Kasereka, G., Matamba, A., Ndindir, J., 2021.** Utilisation des biopesticides pour une agriculture durable en République Démocratique du Congo (Synthèse bibliographique). *Revue Africaine d'Environnement et d'Agriculture* 53–67.
- Koriem, K.M., 2013.** Review on pharmacological and toxicological effects of oleum azadirachtin oil. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 3, 834–840.
- Kulkarni, J., Kapse, N., Kulkarni, D.K., 2009.** Plant based pesticide for control of *Helicoverpa armigera* on *Cucumis sativus*. *Asian Agri-History* 13, 327–332.
- Lai, D., Jin, X., Wang, H., Yuan, M., Xu, H., 2014.** Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *Journal of biotechnology* 185, 51–56.
- Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C., Lapied, B., 2010.** How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333, 264–272.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., Zhao, M., 2011.** Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology* 10, 19864–19873.
- Leridon, H., 2020.** Population mondiale: vers une explosion ou une implosion? *Population Societes* 1–4.

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*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15, 101–105.

Meigen, J.W., 1869. Systematische Beschreibung der bekannteneuropäischenzweiflügeligeninsekten. H.W. Schmidt.

Mordue L.A.J., Morgan E.D., Nisbet A.J., 2005. Azadirachtin, a natural product in insect control. In : Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, UK : Elsevier, : 117-35. 7.

Mordue Luntz, A.J., Nisbet, A.J., Jennens, L., Ley, S.V., Mordue, W., Singh, R.P., Saxena, R.C., 1999. Tritated dihydroazadirachtin binding to *Schistocerca gregaria* testes and Spodoptera Sf9 cells suggests a similar cellular mechanism of action for azadirachtin. *Azadirachta indica A. Juss.* 247-256.

Mordue, A.J., Blackwell, A., 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of insect physiology* 39, 903–924.

Morgan, E.D., 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17, 4096–4105.

Olson, S., 2015. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on pest management* 26, 203–206.

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 Rijksuniversiteit 317 p.

Oulhaci, C.M., Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J.-C., Kaiser, L., Joly, D., Aribi, N., 2018. Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Pest management science* 74, 174–180.

Paes J.B., Souza A.D., Lima, C.R., Medeiros Neto, P.N., 2011. Efficiency of neem (*Azadirachta indica*) and castor (*Ricinus communis*) oils on protection of *Ceiba pentandra* wood against xylophagous termites under feed preference assay. *Rev Árvore* 35: 751-758.

Pandey, U.B., Nichols, C.D., 2011. Humandisease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews* 63, 411–436.

Pasquoto-Stigliani, T., Campos, E.V., Oliveira, J.L., Silva, C.M., Bilesky-José, N., Guilger, M., Troost, J., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Fraceto, L.F., 2017. Nanocapsules containing neem (*Azadirachta indica*) oil: development, characterization, and toxicity evaluation. *Sci. Rep.* 7, 1–12.

Patel, S.M., Venkata, K.C.N., Bhattacharyya, P., Sethi, G., Bishayee, A., 2016. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases, in: *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier, pp. 100–115.

Poland, T.M., Ciaramitaro, T.M., McCullough, D.G., 2016. Laboratory Evaluation of the Toxicity of Systemic Insecticides to Emerald Ash Borer Larvae. *J Econ Entomol.* 109:2, 705–716 .

Popp, J., Pet\Ho, K., Nagy, J., 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development* 33, 243–255.

Puri, H.S., 1999. Neem: the divine tree *Azadirachta indica*. CRC Press, Amsterdam.

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 management science* 70, 1041–1047.

Quinn, L., Lin, J., Cranna, N., Lee, J., Mitchell, N., Hannan, R., 2012. Steroid hormones in *Drosophila*: How ecdysone coordinates developmental signalling with cell growth and division. *Steroids-Basic Science. InTech, Rijeka* 141–168.

Radwanski, S.A., Wickens, G.E., 1981. Vegetative fallows and potential value of the neem tree (*Azadirachta indica*) in the tropics. *Economic Botany* 35, 398–414.

Rajmohan, K.S., Chandrasekaran, R., Varjani, S., 2020. A review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian Journal of Microbiology* 60, 125–138.

Ralalarinivo, B., 2010. Evaluations préliminaire de l'activité insecticide des huiles essentielles de tagete minuta et d'eucalyptus rostrata, université d'Antananarivo école supérieure polytechnique d'Antananarivo, pp25.

Ram, K.R., Chowdhuri, D.K., 2014. *Drosophila: A Model for Biotechnologists*, in: *Animal Biotechnology*. Elsevier, pp. 3–19.

Rand, M.D., Montgomery, S.L., Prince, L., Vorojeikina, D., 2014. Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model. *Current protocols in toxicology* 59, 1–12.

Regnault-Roger C., 2005. Recherche de nouveaux biopesticides d'origine végétale à caractère insecticide in biopesticides d'origine végétale, Regnault-Roger C., phellogène B.J.R.,vincent C, TEC& DOC, Lavoisier .paris, 33p.

Regnault-Roger, C., 2008. Recherche de nouveaux biopesticides d'origine végétale à caractère insecticide: démarche méthodologique et application aux plantes aromatiques méditerranéennes. *Biopesticides d'origine végétale* 25–49.

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* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.* 44, 290–294.

Rosas-García, N.M., 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Patents on biotechnology* 3, 28–36.

Sadeghi, A., Van Damme, E.J., Smaghe, G., Cullen, E., 2009. Evaluation of the susceptibility of the peaaphid, *Acyrtosiphonpisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *Journal of Insect science* 9.

Saidemberg, D.M., Ferreira, M.A., Takahashi, T.N., Gomes, P.C., Cesar-Tognoli, L.M., da Silva-Filho, L.C., Tormena, C.F., da Silva, G.V., Palma, M.S., 2009. Monoamine oxidase inhibitory activities of indolylalkaloid toxins from the venom of the colonial spider *Parawixia bistriata*: Functional characterization of PwTX-I. *Toxicon* 54, 717–724.

Saleem, S., Muhammad, G., Hussain, M.A., Bukhari, S.N.A., 2018. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytotherapy research* 32, 1241–1272.

Samada, L.H., Tambunan, U.S.F., 2020. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. *Online J. Biol. Sci* 20, 66–76.

Schmutterer H. 2002. *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceae plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. 2nd edn. *Neem Foundation. Mumbai, India.* 760-779.

Schmutterer H., 1995. (eds.), The Neem Tree, *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceous Plants. VCH: Weinheim.

Schmutterer, H., Singh, R. P. 1995. List of insect pests susceptible to neem products. In: *The neem tree Azadirachta indica* A. Juss. and other meliaceous plants In Schmutterer H (ed) - Source of unique products for pest management and other purposes. Weinheim, VCH. 326-365.

Scott, J.G., Buchon, N., 2019. *Drosophila melanogaster* as a powerful tool for studying insect toxicology. *Pesticide biochemistry and physiology* 161, 95–103.

Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juven, B., Zisman, U., Pissarev, V., 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *Journal of chemical ecology* 17, 499–504.

Shao, X., Lai, D., Zhang, L., Xu, H., 2016. Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by azadirachtin a in *Spodoptera litura* cells. *Scientific reports* 6, 1–12.

Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., Singh, G., Barnwal, R.P., Singla, N., 2020. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 201, 110812.

Shaurub, E.-S.H., Abd El-Meguid, A., Abd El-Aziz, N.M., 2014. Quantitative and ultrastructural changes in the haemocytes of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) treated individually or in combination with *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV) and azadirachtin. *Micron* 65, 62–68.

Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M., 1996. Azadirachtin: advances in understanding its activity as an antifeedant. *Entomol Exp Appl* 80: 23-26.

Smagghe, G., Gomez, L.E., Dhadialla, T.S., 2012. Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control, in: *Advances in Insect Physiology*. Elsevier, pp. 163–249.

Sporleder M., Lacey L.A., 2013. *Biopesticides*. In: Giordanengo, P. Vincent, C. Alyokhin, A. (Eds). *Insect pests of potato: Global perspectives on biology and management*. Elsevier, Oxford UK. 463-497.

Spyrou, I.M., Karpouzias, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., 2009. Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community? *Microbial ecology* 58, 715–727.

- Staats, S., Lüersen, K., Wagner, A.E., Rimbach, G., 2018.** *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism in food and nutrition research. *Journal of agricultural and foodchemistry* 66, 3737–3753.
- Strebler G., 1989.** Les médiateurs chimique- leur incidence sur la bio écologie des animaux, Tec et Doc, Lavoisier, paris.
- Su, M., Mulla, M.S., 1999.** Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J. Am. Mosq. Control Assoc* 15, 133–152.
- Taffar, A., Yezli-Touiker, S., Bendjedid, H., Soltani, N., 2021.** Evaluation of azadirachtin, a biopesticides, on growth, development and cuticle secretion of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Journal of Entomological Research* 45, 436–443.
- Tavernier, R., Lizeaux, C., 2002.** Sciences de la Vie et de la Terre, Term S, programme 2002. Bordas.
- Tine, S., Aribi, N., Soltani, N., 2012.** Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *African J Biotechnol* 10: 19816–19824.
- Tomé, H.V.V., Martins, J.C., Corrêa, A.S., Galdino, T.V.S., Picanço, 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.
- Ureña, E., Manjón, C., Franch-Marro, X., Martín, D., 2014.** Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 7024–7029.
- Va, D.P., Sa, A.A., Paul, S.F., 2009.** Wonder animal model for genetic studies-*Drosophila melanogaster*—its life cycle and breeding methods—a review. *Sri Ramachandra Journal of Medicine* 2, 33–38.
- Wang, C.-J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D.-D., Liu, H.-X., Wang, Y.-P., Guo, J.-H., 2012.** Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting *rhizobacterium* strains. *Plos one* 7, e52565.
- Zaki, O., Weekers, F., Thonart, P., Tesch, E., Kuenemann, P., Jacques, P., 2020.** Limiting factors of mycopesticide development. *Biological Control* 144, 104220.

Références bibliographiques

Zhang, J., Sun, T., Sun, Z., Li, H., Qi, X., Zhong, G., Yi, X., 2018. Azadirachtin acting as a hazardous compound to induce multiple detrimental effects in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.* 359, 338–347.

Zhong, B., Lv, C., Qin, W., 2017. Effectiveness of the botanical insecticide azadirachtin against *Tirathaba rufivena* (Lepidoptera: Pyralidae). *Florida Entomologist* 100, 215–218.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BIRI Abdelhakim
SAHLI Asma

Activité d'un biopesticide issu du neem (*Azadirachta indica*) chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (Diptera)

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Biothérapie

Les pesticides naturels, alternative aux insecticides conventionnels, constituent un élément de réponse à la politique du développement durable de par leur faible impact écotoxicologique.

Dans le présent travail, l'effet d'une formulation commerciale de l'azadirachtine, l'Huile de Neem, provenant d'une espèce végétale, *Azadirachta indica*, a été évalué sur la toxicité chez un modèle de référence *D. melanogaster*. Différentes concentrations variant entre 0,5 et 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ont été testées par application topique sur des pupes nouvellement exuviées.

Les résultats obtenus révèlent que l'Huile de Neem induit une inhibition de l'émergence adulte avec une relation concentration-réponse. L'Huile de Neem provoque également l'apparition de plusieurs anomalies morphologiques chez *D. melanogaster*. Les CI_{25} et CI_{50} obtenues à partir d'une courbe concentration-réponse et correspondant à une mortalité de 25 et 50 % sont de l'ordre de 0,68 et 1,17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivement.

Mots-clefs : *D. melanogaster*, *Azadirachta indica*, Huile de Neem, Toxicité.

Laboratoires de recherche : Laboratoire de biosystématique et écologie des arthropodes (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : BOULAHBEL Bilel (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : KARA ALI Mounira (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : BOUDOUKHANI Meriem (MAB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).