

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministre de l'enseignement supérieure et de la recherche scientifique
UNIVERSITE CO NSTANTINE 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : biologie Animale

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie animale
Option : Biologie, Evolution et Contrôle de Population d'Insectes

Intitulé

***Evaluation des effets d'un biopesticide sur
Drosophila mélanogaster***

Présenté par :

*** Mr Bouali Mostafa**

*** Mr Ben merzouk Bilel**

Soutenue le : 02/07/2014

JURY DE SOUTENANCE :

PRESIDENT: Mr .MADASSI IBRAHIM

Prof. Univ.Constantine1.

Rapporteuse : Melle.CHAABANE.MERIEEM

MA.Univ.Constantine 1.

Examineur :Mme.FRAHTIA KHALIDA

MA.Univ. Constantine1.

ANNEES UNIVERSITAIRE : 2013- 2014

Dédicace

Je dédie ce travail à ma très chère mère Rachida, tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. A mon père Slimane, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères et sœurs ; Sabrina, Saleh, Kenza et Fatah, vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissances de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

A mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidée; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

A mes amies ; Azzedine, Sofiane, Yacine, Lotfi, Bilel, Dalel, Najat, Hossam, Khaled, Miloud, Je vous remercie de votre patience vous m'a aidée toujours à avancer vous êtes tous des grandes amies si gentilles, merci d'être toujours près de moi, amies avec lesquelles je souris.

A mes camarades de la faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Enfin je le dédie à tous mes amis que je n'ai pas cités et à tous ceux qui me connaissent en particulier les jeunes de Teleghema

Remerciement

En préambule à ce mémoire nous remerciant **ALLAH** qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements profonds à l'égard de mademoiselle **MERIEME CHAABANE**, maitre assistance à l'université de Constantine 1, qui a proposé le sujet et accepté de le diriger avec beaucoup de rigueur et de patience.

Mes remerciements s'adressent également à monsieur **MADACI IBRAHIM**, maitre de conférences à l'université de constantine1, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.

Je tiens à remercier sincèrement madame **FRAHTIA KHALIDA**, maitre assistance à l'université de constantine1.

Je remercie vivement tous les enseignants de poste graduation d'entomologie à l'université de constantine1 pour leurs prodigieux conseils.

Je n'oublier pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. En fin j'adresse mes plus sincères remerciement à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

SOMMAIRE :

| | |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| Introduction générale..... | 1 |
| CHAPITRE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUE..... | 5 |
| I. Rappels sur les insecticides..... | 5 |
| 1. Insecticides inorganiques ou insecticides minéraux..... | 5 |
| 1.1. Insecticides arsenicaux..... | 5 |
| 1.2. Insecticides fluorés..... | 5 |
| 1.3. Insecticides soufrés..... | 5 |
| 1.4. L'acide cyanhydrique..... | 5 |
| 2. Insecticides végétaux..... | 5 |
| 3. Insecticides organiques de synthèse..... | 6 |
| 3.1. Insecticides chlorés..... | 6 |
| 3.2. Insecticide organophosphorés..... | 6 |
| 3.3. Les carbamates..... | 6 |
| 3.4. Les pyréthrinoides..... | 7 |
| 3.5. Les cyclopiens ou cycloïdes..... | 7 |
| 4. Définition des bio pesticides..... | 7 |
| 5. Mode d'action des insecticides..... | 8 |
| II .Rappels sur Drosophiles..... | 10 |
| 1. Caractéristique de drosophile..... | 11 |
| 2. Mode de reproduction..... | 14 |
| 3. Répartition géographique..... | 14 |
| 4. L'habitat..... | 14 |
| 5. Plante hôte..... | 14 |
| 6. Alimentation..... | 15 |
| 7. Rôle écologique..... | 15 |
| 8. Moyens de lutte..... | 16 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| •La lutte biologique : culturale..... | 16 |
| •La lutte chimique : insecticide..... | 17 |
| 9. Symptômes et dégâts..... | 18 |
| 10. Piégeage des drosophiles adultes..... | 18 |
| CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES..... | 22 |
| 2.1. Présentation du matériel biologique..... | 22 |
| 2.1.1 Cycle de vie de D.melanogaster..... | 23 |
| 2.1.2. Elevage en laboratoire..... | 26 |
| 2.2 .Présentations de l'insecticide..... | 27 |
| 2.3 .Traitement..... | 28 |
| 2.4.Echantillonnage..... | 28 |
| 2.5. Extraction et dosage des vitellines et vitellogénines | 28 |
| 2.5.1. Extraction des vitellines et vitellogénines..... | 28 |
| 2.5.2. Dosage des vitellines et des vitellogénines | 29 |
| 2.6. Analyse statistique..... | 29 |
| CHAPITRE 3 : RESULTATS..... | 31 |
| 1. Effets spinosad sur les vitellogénines et les vitellines..... | 31 |
| 2. Effets du spinosad sur les vitellogénines et les vitellines ovariennes..... | 31 |
| CHAPITRE 4 : DISCUSSION..... | 33 |
| Conclusion et perspectives | 36 |
| Résumé..... | 37 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | |

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| .Figure.1. <i>D.melanogaster</i> adulte(1) mâle (2) femelle (Média, 2001) | 12 |
| .Figure 2. Abdomen de drosophile..... | 12 |
| .Figure 3. Organes sexuels des drosophiles : pénis Mâle(A) et plaque vaginale Femelle (Média, 2001)..... | 13 |
| . Figure 4. Peignes sexuels chez les drosophiles mâles (Média, 2001)..... | 13 |
| . Figure 5 .Chariot utilisé pour la récolte, dotée d'un petit panier pour recueillir les fruits non vendables..... | 17 |
| . Figure 6: cerises infestées montrant des piqûres comme des trous d'épingle et des dommages directement sous la peau. On voit ici les larves et les pupes qui sont sorties du fruit. <i>Crédit photo : V. Walton, Oregon State Université</i> | 18 |
| . Figure7. Piège maison utilisé en Ontario pour capturer des Drosophiles comportant de nombreux trous (de 3 mm). Du ruban rouge a été ajouté pour rendre le piège plus attrayant pour les insectes (des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph)..... | 19 |
| . Figure 8. Piège mis en place dans des plantes hôtes sauvages (des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph)..... | 20 |
| . Figure 9. Piège attaché à un treillis dans des framboisiers. (Des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph)..... | 21 |
| . Figure 10. Utilisation d'un microscope pour identifier la Drosophile (des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph)..... | 21 |

Chapitre 2

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| . Figure 1. <i>Drosophila melanogaster</i> (Sturtevant, 1921) (× 8)..... | 22 |
| . Fig3.oeuf de Drosophile..... | 23 |
| . Fig3. Larve asticot de drosophile au dernier stade (longueur : 3-4 mm)..... | 24 |
| . Fig4. Pupe de Drosophile..... | 24 |
| . Fig5. Imago à l'éclosion | 25 |
| . Figure 6. Le cycle de vie de <i>D.melanogaster</i> (Howard, 1900) (× 8) | 25 |
| . Figure 7 : Elevage de <i>D. melanogaster</i> (Royaume, 2008)..... | 26 |
| . Figure 8 : Surface épineuse de la bactérie..... | 27 |
| . Figure 9 : Coupe longitudinale de la bactérie..... | 27 |
| . Figure 10. Structure du spinosad (Horowitz & Ishaaya, 2003)..... | 27 |

Chapitre 3

- . **Figure 1.** Effets, *in vivo*, du spinosad (CI50 : 0.28 µg/insecte) administré par application topique, au dernier stade larvaire sur le contenu en (µg/mg) des vitellogénines (A) et des vitellines (B) au cours du premier cycle gonadotrophique chez les femelles de *D.melanogaster* : courbe de référence (droite étalon) exprimant l'absorbance obtenue à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).....**31**

- . **Figure 2.** Effets, *in vivo*, du spinosad, administré, par application topique (DI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) chez les adultes femelles de *D. melanogaster* au cours des premières 24h après l'émergence (m ± sd ; n= 5-8) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série.....**33**

- . **Figure 3.** Effets, *in vivo*, du spinosad, administré, par application topique (DI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellines (µg/mg) chez les adultes femelles de *D.melanogaster* au cours des premières 24h après l'émergence (m ± sd ; n = 5-8) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série.....**35**

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| . Tableau 1 : classification de <i>D.melanogaster</i> | 10 |
| Tableau 2. Dosage des vitellines et des vitellogénines chez <i>D. melanogaster</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage..... | 29 |
| . Tableau 3. Effets, <i>in vivo</i> , du spinosad, administré, par application topique (CI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) chez les adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> au cours des premières 24h après l'émergence (m ± sd ; n= 5-8) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série..... | 31 |
| . Tableau 4. Effets, <i>in vivo</i> , du spinosad, administré, par application topique (DI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellines (µg/mg) chez les adultes femelles de <i>D.melanogaster</i> au cours des premières 24h après l'émergence (m ± sd ; n = 5-8) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série..... | 32 |

Introduction générale

Les insectes qui constituent plus de 50% de la diversité de la planète (Wilson,1988) et près de 60% de celle de règne animale (Pavan,1986) prennent du plus en plus d'importance dans la recherche .L'Ordre des Diptères qui compte environ 80000 espèces et se place en quatrième rang après les Coléoptères , les Lépidoptères et les Hyménoptères ,occupe la première place , soit par le rôle de vecteur d'organismes pathogène (virus protozoaires ,helminthes) de certain de ses représentants , soit par la nuisance d'autres .

La drosophile est un insecte de quelques millimètres de long qui appartient à la grande famille des mouches. C'est un organisme modèle pour les recherches dans le domaine de la génétique (c'est-à-dire l'étude de la transmission des caractères de parents à enfants) et du développement. Plusieurs milliers de chercheurs dans le monde travaillent sur cette petite bête dans la nature mais aussi, et surtout, dans les éprouvettes des laboratoires.

Il existe différentes méthodes de lutte contre les ravageurs .la lutte biologique , cette technique repose sur l'exploitation des relations antagonistes qui existe entre les différentes organismes vivants .qui a pour but de protéger les cultures des organismes nuisible on utilise leurs ennemis naturels (auxiliaires prélevés dans la même zone que celle de ravageur) , ceux-ci vont se charger d'éliminer les nuisibles sans besoin d'avoir recours à des traitements chimiques, il existe aussi des microorganismes végétaux entomopathogènes principalement des champignons ;et la lutte chimique (Stronget *al.*, 2000) qui utilise différents types d'insecticides possédant chacun des caractéristiques physiques et chimiques propres ,car le taux de toxicité ,la dégradation , la biotransformation ou l'accumulation varient d'un insecticide à un autre(Stronget *al.*, 2000)Cependant , pour des raisons économiques et de facilité de mise en œuvre , la lutte chimique reste la méthode la plus employée en dépit des dangers pour l'homme et son environnement (Cassier *et al.* , 1997).

Les pesticides sont classés par des grandes familles selon un double classement ; soit par cible (herbicides, défoliants, bactéricides, fongicides, acaricides, insecticides...), soit par groupe chimique qui correspond à un classement technique à partir de la molécule principale utilisée. Les organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes et autres

insecticides de synthèse sont des produits persistants et leur bioaccumulation présente des conséquences irrémédiables sur la santé et l'environnement. L'usage de ces pesticides chimiques a souvent causé beaucoup plus de préoccupations qu'apporter de solutions définitives (Chandrashekar&Srinivasa, 2003). Selon Ouédraogo(2004), cette utilisation des pesticides de synthèse pose des problèmes majeurs suivants: l'accroissement de la résistance des insectes, la disparition des populations d'insectes, la pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques, la neutralisation de la vie du sol .

Les insecticides sont utilisés en traitement individuel, en agriculture et en lutte vectorielle ; ils provoquent la mort de l'insecte par contacte ou par ingestion.

L'acide borique, insecticide non organique très efficace, agit par ingestion ; son utilisation pour la lutte chimique contre les ravageurs a fait l'objet de divers travaux surtout sur le plan toxicologique (Fort *et al.*, 2000 ; Morakchi *et al.*, 2005 ; Habes *et al.*. 2006).

Les insecticides organiques de synthèse , (Strange et Khungsoyr, 1997)regroupent les,malathion organochlorés (DDT ,Les pyrèthénoïdes) , les organophosphorés (parathion,scharbon) et les carbamates comme la carbonyle ou encore plus récemment la benfuracarbe(Zink*et al.*, 1991; Siegfried et Scott., 1991; Morakchi*et al.*, 2005).

Les bio pesticides sont de plus en plus développés et occupent une place de choix (Deguine&Ferron, 2006). Ils se dégradent rapidement, diminuant ainsi le risque de pollution. De plus, l'utilisation des bio pesticides offre aux pays du sud la possibilité de produire des produits « bio »en respectant les normes de Limite Maximale de Résidu (LMR) requises aux produits agricoles exportés sur le marché Européen. En raison de ces avantages, on peut penser que le recours à ces molécules est une option valable.

Le Ghana et dans une moindre mesure le Bénin ont déjà acquis une certaine expérience en matière de l'utilisation des bio pesticides(Coulibaly *et al.*,2006).Parmi ces molécules, se trouvent les néonicotinoïdes, l'azadirachtine ou encore le spinosad.

Spinosad est un bio pesticide hautement compatible dans les systèmes de lutte intégrée, bien que le bio pesticide Spinosad soit le produit d'un vaste programme d'inspection des produits naturels mené par Eli Lilly and Co., il fut en fait découvert « par accident » en 1982 par un chercheur qui rapporta de vacances aux îles Vierges un échantillon de sol trouvé près d'une distillerie de rhum abandonnée. Il s'avéra que l'échantillon contenait une nouvelle

espèce d'actinomycète des sols (une sorte de bactérie Gram positif) appelé *Saccharopolyspora spinosa*. Le Spinosad est un mélange de spinosynes A et D, les deux métabolites les plus actifs produits par l'espèce (d'où le nom : *spinosynes A et D*). Le produit fut d'abord homologué en Corée en 1996, puis aux É.-U. en 1997.

Le Spinosad agit comme une neurotoxine et il est actif tant par contact que par ingestion, bien que l'ingestion soit jugée de 5 à 10 fois plus efficace. Ses effets sont rapides, ce qui est relativement inhabituel pour un produit biologique. Les insectes sont paralysés et cessent de se nourrir. En général, le Spinosad est efficace contre les chenilles, les mouches et les thrips ainsi que contre certaines espèces de coléoptères et de sautereaux, mais il n'agit pas sur les insectes suceurs ou les acariens.

Le spinosad, utilisé contre certains ravageurs des cultures depuis 2010 (INPV, communication personnelle) peut comme tout pesticide engendrer des mécanismes de résistance ; en effet, au moment où l'insecte entre en contact avec l'insecticide, ce dernier pénètre dans l'organisme et atteint, plus ou moins rapidement, au niveau cellulaire, les protéines et les enzymes cibles dont il entrave le fonctionnement normal (Feyereisen *et al.*, 1989). Chez les insectes la résistance aux insecticides est un phénomène qui se développe de façon inquiétante.

Les connaissances déjà anciennes sur les mécanismes de résistance et celles acquises très récemment par la biologie moléculaire laissent entrevoir des possibilités de gestion de la résistance. Ceci ne peut s'envisager qu'après avoir mis au point des outils pour détecter et diagnostiquer les différents types de résistance en cause. L'identification des mécanismes de résistance aux insecticides est primordiale pour le contrôle des insectes ravageurs.

L'étude de résistance aux insecticides s'appuie fortement sur des études de physio toxicité avec des analyses biochimiques et génétiques (Trent *et al.* 2011).

Aussi et dans le but de prévenir la résistance des organismes visés contre le spinosad, il est intéressant de mieux comprendre l'action toxique de cette molécule sur les différents compartiments de l'insecte. Le modèle expérimental, *Drosophila melanogaster* (Diptera), communément appelée mouche du vinaigre est une espèce de référence qui occupe une place centrale en recherche biologique. *D.melanogaster* est un modèle de choix du fait du séquençage de la quasi-totalité de son génome (Alberts *et al.*, 1999) et représente l'organisme

modèle le mieux étudié à l'heure actuelle, en particulier dans les domaines liés à la résistance ou à la génétique (Traqui&Demongot, 2003).

Dans ce travail, nous proposons d'évaluer les effets du spinosad sur un modèle biologique qui est *Drosophila melanogaster* (Diptère) ; en effet, cet insecte est un modèle de référence pour tous les travaux liés dans les études toxicologique ou sur les mécanismes de résistance du fait du séquençage de la quasi-totalité de son génome, L'évaluation du spinosad chez *D. melanogaster* a été réalisée, sur le contenu en vitellogénines et vitellines, éléments biochimiques essentiels au cours du processus de reproduction .

Chapitre 1 : Données bibliographiques

I-Rappels sur les insecticides

1. Insecticides inorganiques ou insecticides minéraux

Ce sont des insecticides ne contenant pas de carbone. Des matières minérales tels les métaux lourds et les composés d'arsenic ont été utilisés comme insecticides, bien qu'ils soient généralement toxiques pour un large éventail d'organismes et n'ont pas une action spécifique. Le composé à base de métaux tels l'arsenic, le cuivre, le zinc, le mercure, les oxydes de plomb et leurs sels ont le profil toxicologique acute et chronique associé aux métaux lourds.

1.1. Insecticides arsenicaux

Les propriétés toxiques de l'arsenic sont connues depuis longtemps pour tous les animaux, l'arsenic fournit les insecticides d'ingestion (Dajoz, 1986).

1.2. Insecticides fluorés

Les composés du fluor sont d'un usage dangereux en raison de leur solubilité dans l'eau qui facilite leur absorption par l'homme et les animaux (Dajoz, 1986).

1.3. Insecticides soufrés

Le soufre en poudre est un insecticide peu actif mais les bouillies sulfo-calciques sont d'emploi délicat et servent sous forme de pulvérisations (Dajoz, 1986).

1.4. L'acide cyanhydrique

Ce gaz très toxique, doit être appliqué en fumigations ; les applications sont par conséquent très limitées (Dajoz, 1986).

2. Insecticides végétaux

Ce sont les insecticides d'origine végétale. Beaucoup sont encore utilisés. Elles ont un grand intérêt du fait que ce sont des insecticides ou des toxines naturelles dérivées des plantes tel que : le tabac, le pyrethrum, le derris, l'hellébore, le quassia, le camphor, et le turpentine ; ces plantes sont les principales utilisées dans la production des insecticides (Ware, 2000). . Cette classe de molécule inclus la Pyréthrine, Nicotine et Derris.

3. Insecticides organiques de synthèse

C'est à partir de 1939 et pendant la guerre mondiale que ces produits ont été mis au point (Dajoz, 1986).

3.1. Insecticides chlorés

Ce sont des composés constitués d'une molécule organique avec l'ajoute de chlore. ils représentent les premières générations d'insecticides dont la découverte en 1939 , dits « pesticides de première génération » ce sont des substances destinées à repousser détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies des substances destinées à être utilisées comme régulateurs de croissance des plantes et de pullulation des population d'insectes .l'inconvénient de ce type d'insecticide ,c'est qu'ils sont très persistants. Certain études ont montré que lorsque ce pesticide a été utilisé, il est toujours actif après un certain nombre d'années parmi ces insecticides, nous avons le DDT, le Chlordane, le Lindane et le HCB.

3.2. Insecticides organophosphorés

Ce sont des composés constitués d'une molécule organique à laquelle on a ajouté du phosphore, ils appartiennent à la famille chimique des anticholinestérasiques, ces pesticides affectent le système nerveux en perturbant l'enzyme qui régule l'acétylcholine, un neurotransmetteur (Anonyme, 1986). Ils ont été développés au cours du 19ème siècle. Toute fois, ils ne sont pas généralement pas persistants dans l'environnement et peu bioaccumulables .ces substances dans la rèmance est nettement plus faible que celle des organochlorés .Il existe de nombreux composés utilisés comme insecticides (EX : parathion,malathion, ...).

3.3. Les carbamates

Les carbamates, substances de synthèse, sont dérivés de l'acide carbamique. Apparus plus tard que les organochlorés et les organophosphorés. Ces molécules sont efficaces contre un large éventail d'organismes nuisibles, modérément résiduelle et efficace à des températures plus élevées (Jeffrey, 1999), Il Yapein de carbamates utilisés comme insecticides (EX : carbaryl, methomyl, propoxur, ...)

3.4. Les pyréthriinoïdes :

Les pyréthriinoïdes ont été élaborés dans une version synthétique de pyréthrine, pesticide d'origine naturelle. C'est en 1974 qu'a été découverte le premier pyréthriinoïde photo stable (perméthrine). Ils se répartissent en deux catégories ; ceux qui sont photo stable et ceux qui ne sont pas photo stable et chimiquement stable. (EX : allethrine, fluméthrine, ...)

Cette famille d'insecticides se divise en deux groupes distincts :

- **Naturels** : sont des insecticides d'origine végétale (chrysanthemum cinerariaefolium). Ils sont très instables et rapidement dégradés, au contact de l'air, la lumière ou de la chaleur.
- **Synthétiques** : ont une structure et une action similaire aux substances naturelles. cependant, ils présentent l'avantage d'être photo stable et possèdent un pouvoir insecticide

3.5. Les organo-azotés

Principalement utilisés comme herbicides (EX : atrazine, simazine, ...)

3.6. Les cyclodiènes ou cycloïdes :

La plupart des cyclodiènes sont des insecticides persistants, stables dans le sol et relativement à la réaction des rayons ultraviolets du soleil. De ce fait, une grande quantité de ces insecticides sont utilisés, spécialement pour le traitement contre les termites et les insectes terricoles dont les larves se nourrissent des racines des plantes (Jeffrey, 1999). Généralement, on peut considérer les cycloïdes comme une sous-classe des organochlorés mais la mise en évidence de son mode d'action, permet de le considérer dans la classe des insecticides (Ware, 2000).

4. Définition des biopesticides :

Les bio pesticides , contraction de « pesticides 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 culture et 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 fabriqués 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).

5. Mode d'action des insecticides :

Les insecticides peuvent être regroupés selon le site ou le mode d'action de l'organisme indésirable sur lequel ils agissent. La plupart des insecticides contrôlent les insectes en interférant sur leur système nerveux ou en empêchant leur mue.

Les insecticides chimiques qui sont utilisés le plus fréquemment (organophosphorés, carbamates, organochlorés, pyréthroïdes, cyclodiènes) sont neuroactifs (Rivet, 1992), ils agissent sur le système nerveux des insectes, soit en inhibant l'acétylcholinestérase dans le cas d'organophosphorés et carbamates, soit en modifiant certaines propriétés de la transmission nerveuse dans le cas d'organochlorés, pyréthroïdes et etcyclodienes (Magninet *al.*, 1985).

L'action la mieux connue est celle qui affecte l'acétylcholinestérase, enzyme cible de l'action des organophosphorés et des carbamates. Le rôle normal de l'acétylcholinestérase (AChE) est d'hydrolyser l'acétylcholine, les carbamates et les organophosphorés se combinent avec l'AChE, mais le complexe AChE-insecticide est très stable.

Ils bloquent de manière irréversible (ou très lentement réversible) les sites cationiques des cholinestérases et de ce fait la réaction d'hydrolyse ne peut se produire. L'enzyme étant ainsi immobilisée par l'insecticide, elle ne peut plus accomplir son rôle vis-à-vis de l'acétylcholine (Magnin et al. 1985). L'acétylcholine non dégradée s'accumule, ce qui conduit à l'intoxication avec extraction continue des neurones et paralysie de l'arthropode. En fait, le mode d'action des carbamates est proche de celui des organophosphorés, mais à la différence des organophosphorés, leur blocage par carboxylation est réversible par hydrolyse.

En revanche, le mode d'action des autres insecticides cités est encore mal connu : ainsi pour les organochlorés et les pyréthroïdes, on pense qu'ils perturbent les échanges ioniques au moment de la conduction de l'influx nerveux (Narahash, 1983 cité par Magninet *al.* 1985).

Les organophosphorés, par exemple, sont métabolisés par le foie et transformés en composés hydrosolubles éliminés par voie urinaire, inhibent l'acétylcholinestérase par phosphorylation de son site actif, ce qui entraîne une accumulation de l'acétylcholine au niveau de trois sites :

- Fibres post-ganglionnaires parasympathiques
- Plaque motrice
- Cérébral

Les premiers signes cliniques d'une intoxication aux organophosphores n'apparaissent qu'après un certain seuil d'inhibition du cholinestérase.

Rappels sur L'acétylcholine

L'acétylcholine est le neurotransmetteur des synapses post-ganglionnaires des nerfs parasympathiques. Elle est formée à partir de la choline et d'un acide acétique activé (**acétylcoenzyme A**).Après sa libération dans la fente synaptique,l'acétylcholine sera hydrolysée très rapidement et inactivée par une enzyme spécifique l'acétylcholinestérase, présente dans la fente, et par des cholinestérases sériques moins spécifiques (butyryl-cholinestérase), en solution dans le sérum ou le liquide interstitiel.

2-Rappels sur Drosophiles

(du Grec *droso* : la rosée et *philos* : qui aime), est un insecte diptère connu sous le nom de mouche du vinaigre, elle a été décrite par Johann Wihelm Meigen en 1830, insecte de quelque millimètres de long qui appartient à la grande famille des mouches. C'est un organisme modèle pour les recherches dans le domaine de la génétique (l'étude de la transmission des caractères de parents à enfants) et du développement .plusieurs milliers de chercheurs dans le monde travaillent sur cette petite bête dans la nature mais aussi, et surtout, dans les éprouvettes des laboratoires. De par ses grandes similitudes génétiques avec l'homme, de nombreux Scientifiques l'utilisent aussi comme modèle pour certaines maladies humaines, comme la maladie de Parkinson ou celle de Huntington (Raven et johnson, 1999).les avantages de ce modèle sont nombreux : cette petite mouche, de 3 à 4 mm de longueur s'élever très facilement au laboratoire. Un animal profique, une femelle peut pondre de 200 à 300 œufs .le développement est très rapide, on peut obtenir une génération tous les 12 à 15 jours soit 26 à 28 générations par an. Les mutants sont facilement reconnaissables, les caractères mutés, aisément observables, sont soit la couleur du corps ou des yeux soit la forme des ailes, des yeux ou des soies. Son génome compact a été un des premiers génomes à être séquencés entièrement (Patterson *et al.*, 1943).Sa classification est la suivante :

Tableau 1 : classification de D.melanogaster.

| | |
|---------------|-----------------|
| Règne | <i>Animalia</i> |
| Embranchement | Arthropoda |
| Sous-embr. | Hexapoda |
| Classe | Insecta |
| Sous-classe | Pterygota |
| Infra-classe | Neoptera |
| Ordre | Diptera |
| Sous-ordre | Cyclorrhaphes |

| | |
|---------------------|---------------|
| Infra-ordre | Muscomorpha |
| Famille | Drosophilidae |
| Sous-famille | Drosophilinae |
| Genre | Drosophila |
| Sous-genre | Sophophora |
| Groupe | Melanogaster |

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830)

1. Caractéristiques morphologiques de la Drosophile (fig.1)

La drosophile est un insecte hygrophile (qui aime l'humidité) et luciole (qui aime la lumière) les Adultes mesurent 3mm de long ce qui nécessite de les observer sous une loupe binoculaire. Il existe un dimorphisme sexué. Pour différencier les mâles et les femelles, plusieurs caractères peuvent être considérés (Média, 2001). La Taille de L'adulte male est de 2 à 3mm, avec des yeux rouges et un corps de couleur brun-jaunâtre. Les adultes femelles sont un peu plus grosses, mesurent 3 ou 4 mm alors les femelles sont plus grandes que les males.

L'abdomen de la femelle (img.2) est de forme pointue, avec des segments terminaux de couleur claire. L'abdomen du male est plus arrondi, avec des segments terminaux très foncés.

- Organes sexuels

Lorsque la mouche est sur le dos (img. 3), on peut observer chez le mâle le pénis très coloré situé à l'extrémité de l'abdomen alors que la plaque vaginale située au même endroit chez la femelle n'est pas colorée.

- Peignes sexuels

C'est une petite touffe de soies noires (img.4), située au niveau du premier article du tarse de la patte antérieure et qui n'existe que chez les mâles.

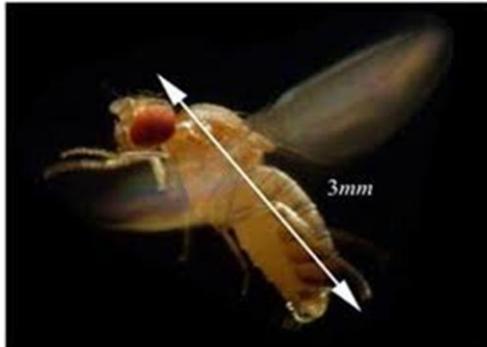


Image 1. *D.melanogaster* adulte(1) mâle (2) femelle (Média, 2001)



Image 2. Abdomen de drosophile (Média, 2001)

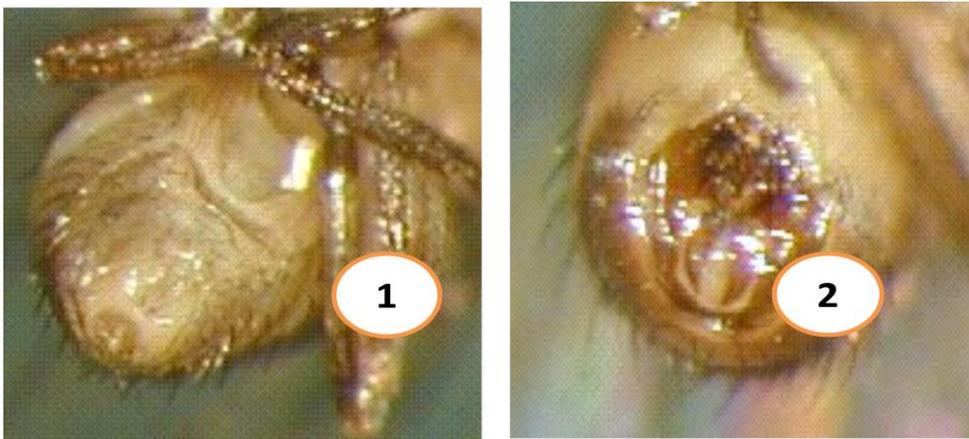


image 3. Organes sexuels des drosophiles : pénis Mâle(1) et plaque vaginale Femelle(2) (Média, 2001).

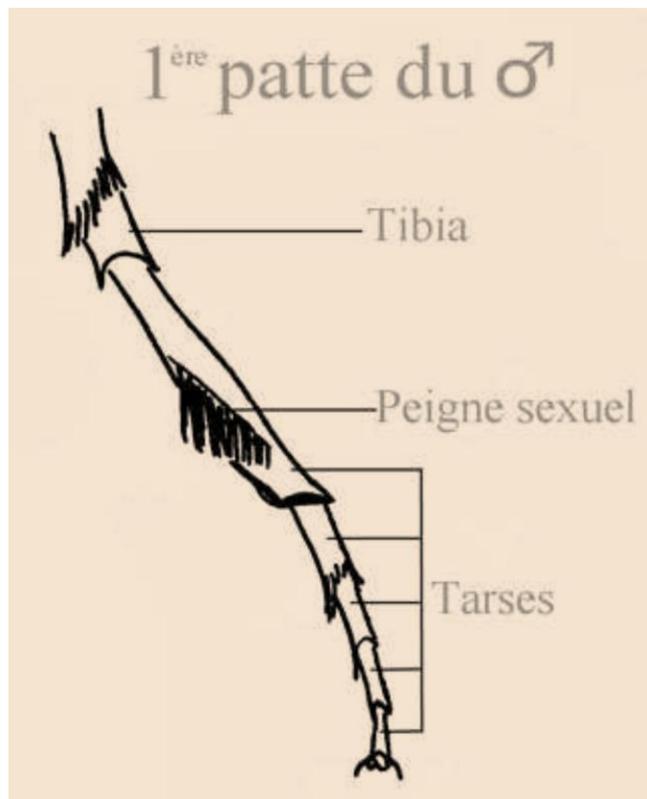


Figure 4. Peignes sexuels chez les drosophiles mâles (Média, 2001).

2. Mode de reproduction

- Période de reproduction: toute l'année.
- Cycle de vie : deux semaines à 25°C, quatre semaines à 18°C.
- Les femelles peuvent pondre jusqu'à 400 œufs.
- La larve sort de l'œuf après 24h, croît pendant cinq jours et mue deux fois (24h et 48h après l'éclosion).
- Les larves s'encapsulent dans le puparium où ils se métamorphosent en adulte en 5 jours (patterson *et al*, 1943).

3. Répartition géographique

Les drosophiles se trouvent dans le monde avec la répartition suivante : en Asie : inde, japon(1916), chine, Corée (1936), Birmanie, Russie et Thaïlande. En Amérique du nord : canada (Colombie-Britannique en 2009), Etats-unis : Hawaï (dans les année 80), Californie(2008), Oregon(2009), Washington(2009).En Amérique centrale : Costa Rica(1997) et équateur(1998).En Europe : Italie (septembre 2009), Espagne : catalogne(2009). France : alpes- maritime, corse, grade et var (ma i- juin 2010).

4. l'habitat

Elle vit dans les maisons, les caves, les fabriques de vinaigre et de confitures et est très attirée par le vinaigre et les fruits fermentés (Wolfgang & Werner, 1992) d'où son nom : « mouche-du-vinaigre ».

5. Plantes hôtes

Les femelles préfèrent pondre dans des fruits mûrs bien qu'elles peuvent aussi pondre sur des fruits verts ou trop mûrs (Biosecurity Australia , 2010).

Les plantes hôtes connues sont :

- *Prunus spp* (cerisier, abricotier, pêché, prunier)

- *Rubus sp* (framboisier, mûre...)

- *Vaccinium sp* (myrtille)

- *Fragaria sp* (fraisier)

- *Ficus carica sp* (figuier)

- *Actinidia sp* (kiwi)

- *Vitis vinifera sp* (raisin de table et de cuve)

- *Malus domestica sp* (pommier)

- *Solanum lycopersicum sp* (Tomate)

- *Actinidia spp.*

- *Diospyros kaki*

- *Pyrus pyrifolia sp* (EPPO reporting service pest and disease, 2010)

6. Alimentation :

Les adultes se nourrissent de fruits mûrs ou avariés, de végétaux et de champignons en décomposition, ainsi que de liquides fermentés (bière, vin, cidre, vinaigre). Ils s'alimentent aussi de nectar et d'autres solutions sucrées.

Les larves se développent sur divers matériaux sucrés ou fermentés, habituellement d'origine végétale, qui produisent des éthers et des esters. Ceci favorise la croissance des levures dont les larves se nourrissent. (Tracqui & Demongeot, 2003).

7. Rôle écologique :

Cette petite mouche sert de nourriture à plusieurs espèces d'animaux insectivores. Elle contribue à accélérer le processus de décomposition des végétaux sur lesquels elle pond ses œufs. (Ramade ,2003)

8. moyens de lutte

La lutte contre la Drosophile est une combinaison de mesures incluant la surveillance, la lutte culturale (mesures d'assainissement, récolte au moment opportun) et des traitements avec des insecticides homologués.(Jacquet *et al*,2002).

•La lutte biologique (culturale)

Les moyens de lutte culturale sont importants pour la maîtrise de ce ravageur.

- L'élimination des fruits tombés ou trop mûrs, la cueillette au moment opportun et l'éradication des hôtes sauvages permettent de réduire les populations. (Jacquet *et al*,2002)
- Le compostage ne constitue pas une solution fiable pour détruire les œufs et les larves dans les fruits. Il faut enterrer tous les fruits de rebut (à 30 cm et plus) ou les éliminer dans un contenant scellé. (Gillespie, 1988).
- Retirer les fruits non vendables du champ. Ne pas laisser les fruits déclassés exposés pendant plus d'une journée.



Image 5 .Chariot utilisé pour la récolte, dotée d'un petit panier pour recueillir les fruits non vendables.

•La lutte chimique

Quand on détecte les mouches dans les pièges et que les fruits sont à un stade sensible (dès qu'ils commencent à se colorer), il faut appliquer un insecticide.(Jacquet *et al*,2002). Il faut protéger les fruits dès qu'ils commencent à se colorer jusqu'à la fin de la cueillette. Il faudra peut-être une autre application selon l'activité résiduelle du produit.

9. Symptôme et dégât :

Les fruits attaqués sont reconnaissable par la présence de petites cicatrices à la surface du fruit (trous) engendrées par les piqûres d'oviposition. En se développant, la larve se nourrit de la pulpe, ce qui entraine un affaissement de l'épiderme autour du site de nutrition.(Chouibani *et al*,2003) Les plaies créées facilitent l'installation d'autres maladies et ravageurs (maladies cryptogamiques, bactéries...) qui contribueront à la détérioration du fruit. Les dégâts causés par une attaque de Drosophile peuvent provoquer une perte de la totalité de la production.(Verger *et al*,2005)



Image 6 : cerises infestées montrant des piqûres comme des trous d'épingle et des dommages directement sous la peau. On voit ici les larves et les pupes qui sont sorties du fruit. Crédit photo : V. Walton, Oregon State Université

10. Piégeage des drosophiles adultes :

Les producteurs et les dépisteurs peuvent surveiller la présence de la drosophile en plaçant des pièges appâtés dans les cultures vulnérables et en vérifiant leur contenu une ou deux fois par semaine (Keiding ,1977).La conception des pièges fait l'objet d'intenses recherches. On peut se procurer des pièges préfabriqués ou les faire soi-même (figure 12). Jusqu'à maintenant, l'expérience semble montrer que les pièges maison sont efficaces. Ces derniers doivent être munis de couverts pour empêcher la pluie d'y pénétrer et être suffisamment solides pour résister au vent. Les pièges peuvent être fabriqués avec des contenants en plastique transparent (250-750ml) munis de couvercle étanche, comme des contenants commerciaux de 500ml. Percer de nombreux petits trous de 3 à 4 mm de diamètre sur les côtés du contenant, ce qui empêchera les insectes plus gros d'y pénétrer tout en permettant aux mouches à vinaigre d'y entrer. Faire deux autres trous vis-à-vis l'un de l'autre de manière à ce que les pièges puissent être suspendus à l'aide d'attaches de jardin ou avec un mince fil flexible.

La recherche montre que l'efficacité des pièges augmente avec la surface des orifices de ventilation; par conséquent, plus il y a de trous ou de surface ouverte dans le piège, plus il sera efficace. Éviter toutefois de percer des trous sur tous les côtés du contenant pour qu'il ne soit pas trop difficile de verser le contenu du piège dans le contenant principal (Warlop **et al**, 2000).



image7. Piège maison utilisé en Ontario pour capturer des Drosophiles comportant de nombreux trous (de 3 mm). Du ruban rouge a été ajouté pour rendre le piège plus attrayant pour les insectes (des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph).

Le vinaigre de cidre est aussi un appât efficace pour les activités de surveillance générale. Il est peu coûteux et c'est facile de s'en procurer. On l'utilise dans le cadre de nombreux programmes régionaux de surveillance. Ajouter une goutte de savon à vaisselle pour éliminer la tension superficielle et pour s'assurer que les mouches se noient et ne s'échappent pas (Warlop *et al*, 2000).

Mettre les pièges en place dans les plantes hôtes sauvages et les zones de végétation lorsque les températures restent constamment supérieures à 10 °C (image.7). Deux à trois semaines avant que les cultures ne parviennent à maturité, placer des pièges additionnels dans les cultures. Les placer à l'ombre, dans la zone fructifère de la culture, en les attachant à des branches ou à des treillis ou au sol à l'aide de piquets (image.8).



Image 8. Piège mis en place dans des plantes hôtes sauvages (des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph).



Image 9. Piège attaché à un treillis dans des framboisiers. (Des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph)

Placer au moins deux pièges par site. Dans le cas de sites couvrant plus de deux hectares, installer un ou deux pièges pour chaque hectare additionnel.

Vider le contenu des pièges dans un contenant principal et remplacer les appâts chaque semaine.

La prochaine étape consiste à déterminer si les pièges contiennent des drosophiles. Alors que les mâles peuvent être identifiés avec un grossissement minimal, il faut un microscope pour identifier les femelles (figure 15) (Jacquet *et al*, 2002).

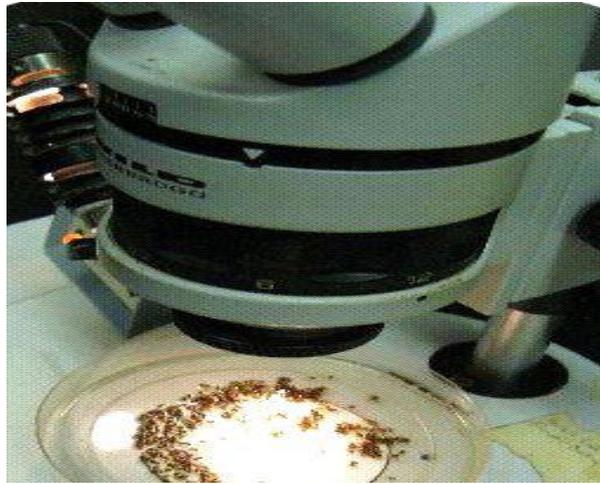


Figure 10. Utilisation d'un microscope pour identifier la Drosophile (des échantillons à la Clinique de diagnostic phytosanitaire de l'Université de Guelph)

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation du matériel biologique :

Drosophila melanogaster (Fig.1) est un insecte hygrophile, et holométabole à la métamorphose complète (Colombani *et al.*, 2006) ; cette mouche est de couleur brune rougeâtre avec des anneaux reversaux noirs à travers de l'abdomen, elle vit dans les maisons, les caves, les fabriques de vinaigre et de confitures et est très attirée par le vinaigre et les fruits fermentés (Wolfgang & Werner, 1992) d'où son nom " mouche du vinaigre ". Cet insecte présente un dimorphisme sexuel où le mâle est plus petit que la femelle ; sa taille varie de 2 à 3 mm.



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

D. melanogaster est caractérisée par une reproduction très rapide (Griffiths *et al.* 2002) ; cet insecte élevé au laboratoire, se reproduit toute l'année, sans interruption, avec une nouvelle génération tous les 10 jours à une température de 25°C donnant ainsi plus de 30 générations par an.

2.1.1. Cycle de vie de la drosophile

Le cycle de vie de la mouche drosophile se divise en quatre phases durant lesquelles les individus prennent des morphologies très différentes : l'œuf (stade embryonnaire), la larve (stade larvaire), la pupa (stade pupal) et l'imago (stade adulte). La durée de ces stades est variable d'après la température de culture.

Fécondation et ponte

Les femelles peuvent être fécondées dès la 8^{ème} heure après leur émergence. En général, une femelle n'est fécondée qu'une seule fois dans sa vie et utilise les spermatozoïdes stockés dans sa spermathèque. La ponte commence dès le deuxième jour de la vie adulte.

Œufs

La femelle pond des centaines d'œufs sur des fruits en putréfaction ou d'autres matières humides ou en fermentation (Tavernier & Lizeaux, 2002). Les œufs pondus sont à

peine visibles, de couleur blanchâtre, d'environ 0,5 mm de long et ont la forme d'un ballon de rugby.



Fig3.oeuf de Drosophile (Sturtevant, 1921)

Stade larvaire

Une trentaine d'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. La drosophile vit sous forme de larve durant 5 à 6 jours environ en passant par 3 stades larvaires, pendant lesquels elle mange, croit et mue (Compbel & Reece, 2004).

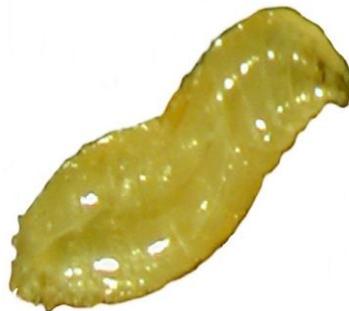


Fig3. Larve asticot de drosophile au dernier stade (longueur : 3-4 mm)

.Stade pupal :

Les périodes embryonnaire et larvaire se succèdent et conduisent à la formation d'une puppe. La taille de l'animal est déterminée par la taille de la larve à l'issue d'une période de forte croissance larvaire (Colombani *et al.* 2006) ; la larve rampe jusqu'à une portion sèche des aliments, ou à l'extérieur et après plusieurs jours passés sous forme de puppe, apparaît, enfin l'adulte (Compbel & Reece, 2006 ; Watson *et al.* 1994).



Fig4. Pupa de Drosophile

Stade adulte : Après 5 jours, la jeune drosophile adulte non encore pigmentée sort de la pupa et au bout de 8 heures la pigmentation est terminée et les ailes sont gonflées. Les adultes s'alimentent des fruits murs ou avariés, des végétaux et des champignons en décomposition ainsi que les liquides fermentés (Tracqui & Demongeot, 2003).



Fig5. Imago à l'éclosion : Noter les ailes non encore déployées

Les femelles sont fécondables (matures sexuellement) et s'accouplent environ 12 heures après être sorties de leur pupa. 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).

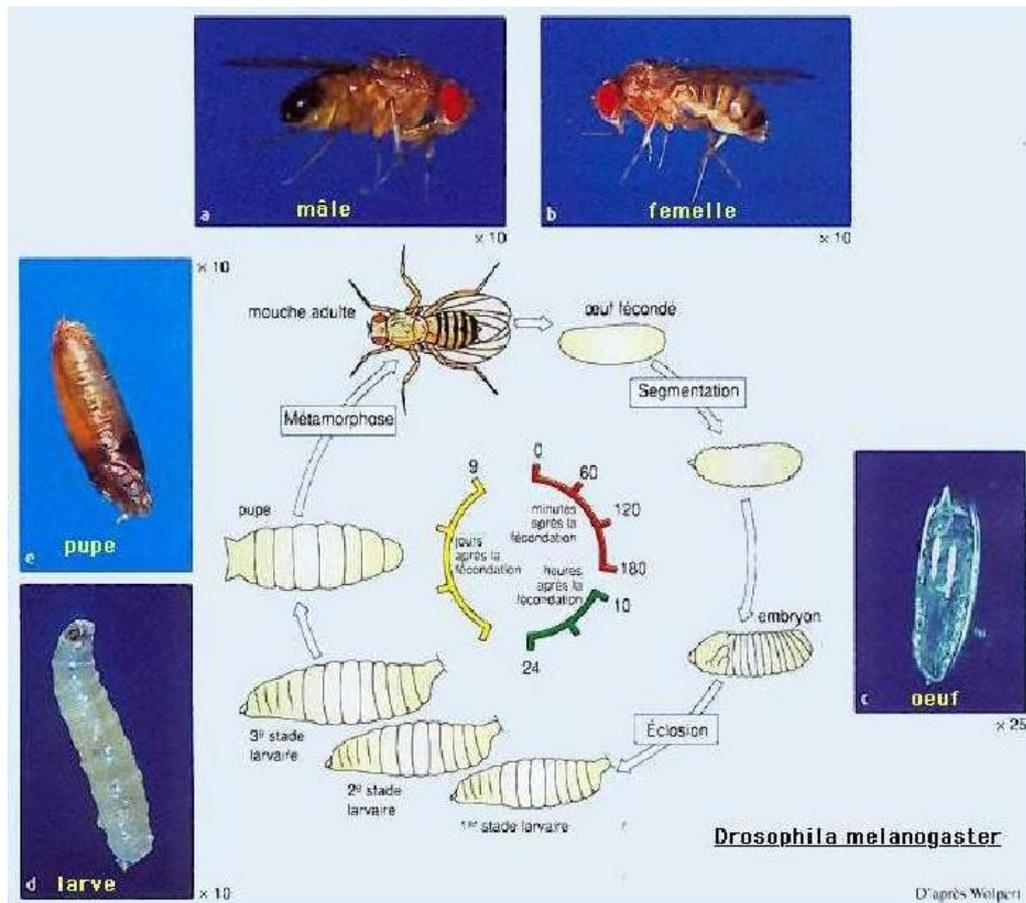


Figure 6. Le cycle de vie de *D.melanogaster* (Howard, 1900) (× 8)

2.1.2. Elevage au laboratoire :

Technique d'élevage de DROSOPHILA MELANOGASTER ; l'élevage des drosophiles en laboratoire est réalisé à une température de 25°C, une hygrométrie de 70% et une scotophase de 12 h (Fig.3). Le milieu nutritif artificiel préparé au niveau de notre laboratoire est un milieu gélosé à base de farine de maïs et de levure de bière. La recette à chaud préparée est composée essentiellement de 33,3 g semoule de maïs, 33,3 g levure de bière, 4,8 g d'agar-agar, et 20 ml d'antifongique (méthyl-hydroxy-4-benzoate à 10%). Les drosophiles sont élevées dans des flacons de plastique et bouchés par un tampon de mousse



Figure 7 : Elevage de *D. melanogaster* (Royaume, 2008).

2.2. Présentation de l'insecticide

Le spinosad est un dérivé de la fermentation aérobie d'une bactérie Actinomycète *Saccharopolyspora spinosa* (Fig. 4,5) que l'on trouve naturellement dans le sol (Morindin *et al*, 2005).

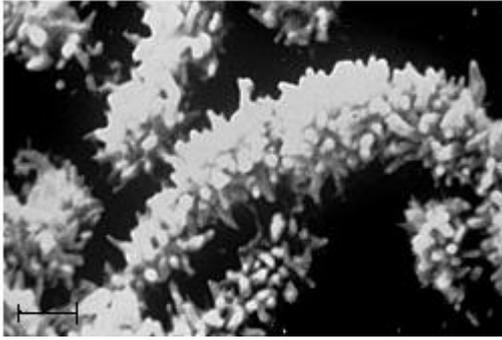


Figure 8 : Surface épineuse de la bactérie



Figure 9 : Coupe longitudinale de la bactérie

Le spinosad est un mélange de deux spinosynes, spinosyne A et spinosyne D (Fig.10). Le spinosad est le nom commun de (EZ)-1-(6-chloro-3-pyridylméthyl)-N-nitroimidazolidinylidèneamine sa formule chimique est $C_{41}H_{65}NO_{10}$ pour le spinosyne A et $C_{42}H_{67}NO_{10}$ pour le spinosyne D dont le poids moléculaire est respectivement de 731,98 g/mol et 745,98 g/mol (Mertz & Yao, 1990 ; Horowitz & Ishaaya, 2003).

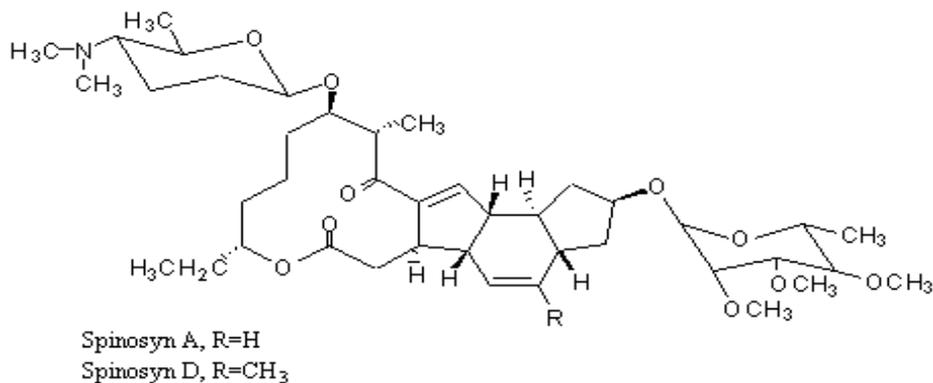


Figure 10. Structure du spinosad (Horowitz & Ishaaya, 2003)

2.3. Traitement

Le spinosad a été testé, *in vivo*, à une concentration de 0.28 µg 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 μ l). Le traitement est effectué sur les larves de la G0 seulement.

2.4. Echantillonnage

Les adultes femelles de *D. melanogaster* des séries témoins et traitées ont été disséqués sous loupe binoculaire à l'exuviation puis toutes les 6 heures jusqu'à 24 heures. Les échantillons biologiques, correspondant tout d'abord aux ovaires prélevés (dosage des vitellines) mais aussi au reste du corps (corps gras et hémolymphe pour le dosage des vitellogénines) sont déposés dans des tubes contenant un tampon (Tris-HCl) permettant l'extraction des vitellines et vitellogénines puis sont conservés au froid (-20°C) jusqu'au dosage.

2.5. Extraction et dosage des vitellines et vitellogénines

2.5.1. Extraction des vitellines et vitellogénines

L'extraction des vitellines et des vitellogénines est réalisée selon la méthode de Descamps, 1996 *in* Fabre et *al.* 1990. Les échantillons biologiques, conservés dans 500 μ l de tampon d'extraction¹ Tris-HCl-NaCl (pH 7,4), sont broyés aux ultrasons puis l'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 5000 tours/min pendant 10 minutes. Après centrifugation, trois couches distinctes sont visibles mais seule la couche intermédiaire contient les vitellogénines ou les vitellines (en fonction des échantillons). Celle-ci, récupérée à l'aide d'une seringue est ensuite déposée dans un tube Eppendorf puis tous les échantillons sont maintenus au froid (-20°C) jusqu'au dosage.

¹La préparation de la solution mère de Tris-HCl consiste à diluer 3,02g de Tris (0,5M) dans 300 ml d'eau distillée puis cette solution est ajustée à un PH de 7,4 en utilisant de l'HCl concentré ; le tout est complété avec 500 ml d'eau distillée.

Pour réaliser le tampon complet : diluer 2,9g de NaCl (0,5M) dans 10 ml de la solution mère de Tris-HCl et compléter à 100 ml d'eau distillée.

2.5.2. Dosage des vitellines et des vitellogénines

Les vitellines et vitellogénines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 (BBC) comme réactif² et l'albumine de sérum de bœuf (1mg/ml) comme standard. Le dosage des vitellines et vitellogénines chez *D. melanogaster* a été effectué dans une fraction aliquote de 100 µl. La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme (Tab.1).

²100 mg de BBC + 50ml d'éthanol puis agitation pendant 2 heures ; 100 ml d'acide orthophosphorique à 80% sont alors rajoutés et le tout est complété à 1000 ml avec l'eau distillée.

Tableau 2. Dosage des vitellines et des vitellogénines chez *D. melanogaster* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Quantité de BSA (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Réactif BBC (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

2.6. 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).

Résultats

1. Effets du spinosad sur les vitellogénines et les vitellines

Le spinosad a été utilisé *in vivo*, par application topique, le troisième stade larvaire de *Drosophila melanogaster* à la dose d'inhibition de la mue nymphale (CI50 : 0.28 µg/insecte). L'effet de cet insecticide a été évalué, chez les adultes femelles, sur le contenu en vitellogénines et vitellines à différents temps de la vitellogénèse au cours du premier cycle gonadotrophique (6, 12, 18 et 24 heures après exuviation). Les concentrations des vitellogénines et vitellines ont été quantifiées après extraction et à partir de la courbe de référence établie grâce aux densités optiques, obtenues après la réalisation de la gamme d'étalonnage (Tabs. 2A).

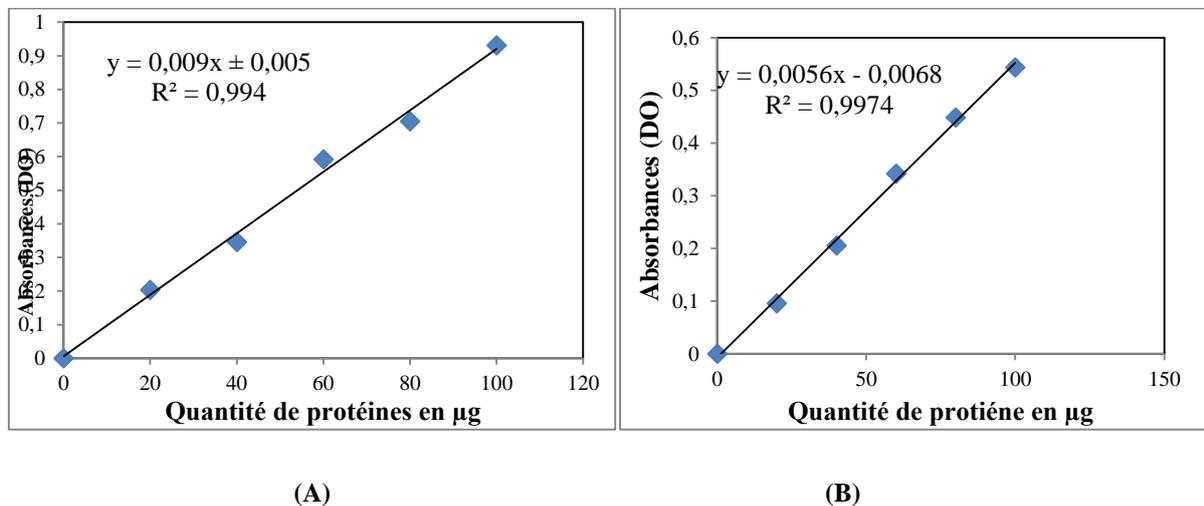


Figure 1. Effets, *in vivo*, du spinosad (CI50 : 0.28 µg/insecte) administré par application topique, au dernier stade larvaire sur le contenu en (µg/mg) des vitellogénines (A) et des vitellines (B) au cours du premier cycle gonadotrophique chez les femelles de *D.melanogaster* : courbe de référence (droite étalon) exprimant l'absorbance obtenue à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).

2. Effets du spinosad sur les vitellogénines et les vitellines ovariennes

Au cours de la maturité sexuelle, chez les femelles adultes de *D.melanogaster*, les résultats montrent une diminution dans les valeurs des vitellogénines à tous les temps testés (6 à 24 heures, On comparant, les séries témoins et traitées (Tab.1). De manière similaire, le contenu en vitellines, au cours du premier cycle de ponte des adultes femelles, semble être affecté de manière hautement significatif ($p < 0.0001$) par le traitement au spinosad ; en effet, les résultats, enregistrés, chez les séries traitées, montrent une réduction, comparativement aux séries témoins.(Tab 2.)

L'analyse de variance à un critère de classification confirme ces résultats et indique un effet temps et traitement très significatifs à hautement significatif ($p < 0.01$, $p < 0.001$).

Ainsi, le spinosad entraîne une diminution dans le contenu en vitellogénines aux différentes heures et avec une relation dose-réponse.

Tableau 3. Effets, *in vivo*, du spinosad, administré, par application topique (DI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) chez les adultes femelles de *D. melanogaster* au cours des premières 24h après l'émergence ($m \pm sd$; $n= 5-8$) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série.

| Age (heure) | Génération 0 | | Anova |
|-------------|------------------|------------------|------------|
| | Témoin | Traitée | |
| 6h | 59,16 ± 2,3 A | 41,61 ± 1,4 B | P=0.003** |
| 12 | 66,41 ± 2,3 A | 48,92 ± 2,9 B | P=0.003** |
| 18 | 61,01 ± 1,4 A | 43,65 ± 2,6 B | P=0.000*** |
| 24 | 66,37 ± 2,7 A | 49,72 ± 2,6 B | P=0.001** |

Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

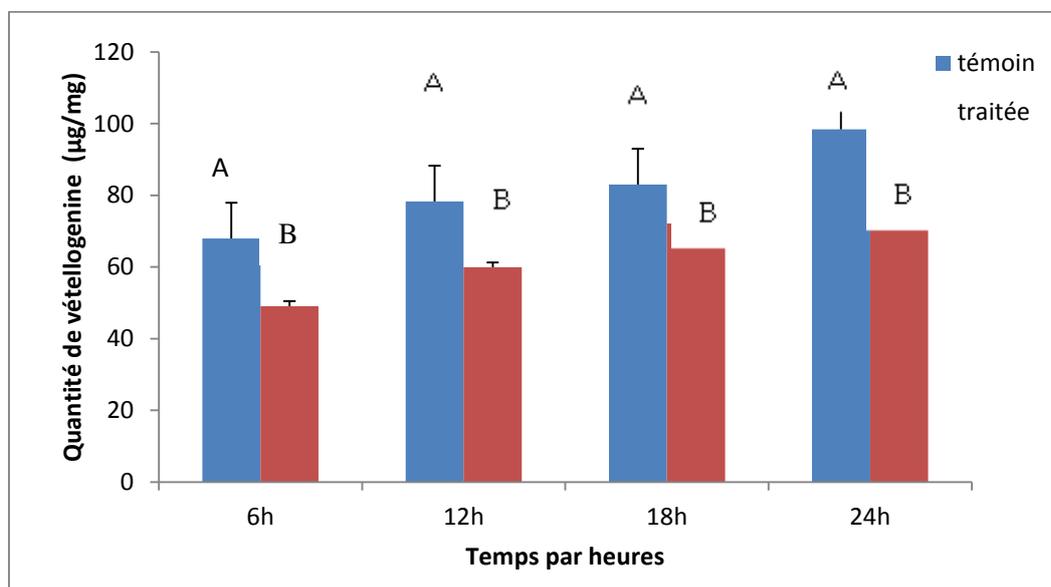


Figure 2. Effets, *in vivo*, du spinosad, administré, par application topique (DI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) chez les adultes femelles de *D. melanogaster* au cours des premières 24h après l'émergence ($m \pm sd$; $n= 5-8$) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série.

Tableau 4. Effets, *in vivo*, du spinosad, administré, par application topique (DI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellines (µg/mg) chez les adultes femelles de *D.melanogaster* au cours des premières 24h après l'émergence (m ± sd ; n = 5-8) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série.

| Age (heure) | Génération 0 | | Anova |
|-------------|----------------------|---------------------|------------|
| | témoin | traitée | |
| 6h | 67,90 ± 1,4 a | 49,04 ± 2,8 B | P=0.000*** |
| 12 | 78,26±0,60 a | 59,90 ± 2,9 B | P=0.000** |
| 18 | 82,99 ± 0,79 a | 72,14 ±2,3 b | P=0.000*** |
| 24 | 98,42 ± 1,3 a | 74,73 ± 2,0 B | P=0.000*** |

Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes (p < 0,05).

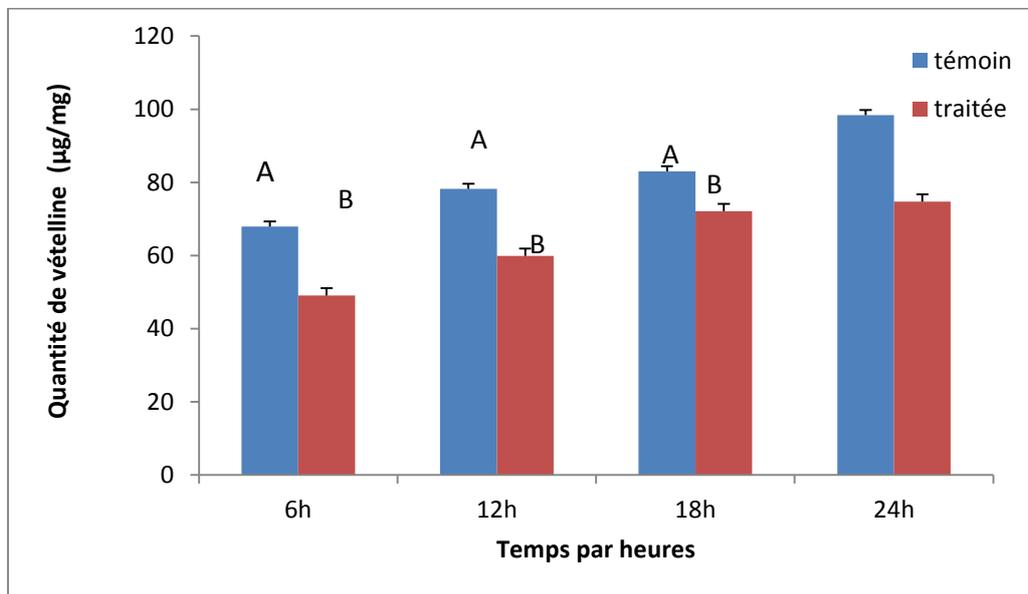


Figure 3. Effets, *in vivo*, du spinosad, administré, par application topique (DI50 : 0,28 µg) chez les larves de dernier stade, sur le contenu en vitellines (µg/mg) chez les adultes femelles de *D.melanogaster* au cours des premières 24h après l'émergence (m ± sd ; n = 5-8) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série.

Discussion

Le contrôle de la reproduction des insectes est un élément fondamental et d'importants travaux ont été menés dans le domaine de la physiologie et de l'endocrinologie (Berry, 1985); par ailleurs, toute étude de physio-toxicité peut y apporter une contribution significative.

Chez les insectes, l'ovaire est formé d'une succession linéaire d'ovocytes appelées ovarioles dont le nombre varie selon les espèces (Halffter et Lopez, 1977 ; Crowson, 1981) ; deux types sont distingués, les ovarioles panoïstiques comme chez *Blattella germanica* et les ovarioles meroïstiques comme chez *D. melanogaster*. Dans chaque ovariole, deux régions sont observées : le germarium et le vitellarium (Cassier et al. 1997). Le germarium est le siège de la multiplication des ovogonies qui donneront les ovocytes. Le vitellarium permet aux ovocytes, entourés par une assise de cellules folliculaires, d'accumuler des réserves (vitellus) puis d'acquérir, ensuite, les enveloppes protectrices, appelées enveloppe vitelline et chorion, secrétées par le follicule (Raikhel et Dhadialla, 1992). Au cours de l'ovogénèse, la phase d'accroissement où se produit l'accumulation de matériaux plastiques et énergétiques variés comme les lipides, glucides, protéines et sels minéraux correspond à la vitellogénèse. Ces différents métabolites, synthétisés principalement dans le corps gras, sont ensuite secrétés dans l'hémolymphe et/ou utilisés par divers tissus ; les lipides sont transportés *via* l'hémolymphe sous forme de lipoprotéines (Cassier et al. 1997). Les glucides représentent, en outre, l'élément énergétique essentiel de l'organisme.

Les vitellogénines, protéines exogènes, élaborées sous forme phospholipoglycoprotéines, dans le corps gras, sont secrétées dans l'hémolymphe, puis captées par l'ovocyte grâce à un processus d'endocytose sous l'effet d'un sesquiterpène l'Hormone Juvénile (HJ); elles sont ensuite stockées dans l'ovaire et prennent le nom de vitellines. Le déroulement de la vitellogénèse chez les insectes, dépendante du système endocrinien, est sous le contrôle principal de deux hormones, les ecdystéroïdes mais aussi l'HJ, citée précédemment (Wang et al. 2004, Bellés et Maestro, 2005). La synthèse de l'hormone juvénile est sous la dépendance de neurohormones céphaliques stimulatrices, les allatotropines et inhibitrices, les allatostatines *via* les corpora allata (Gade et Hoffman, 2005). La biosynthèse des ecdystéroïdes est assurée, principalement, par les glandes pro thoraciques sous l'effet d'une neurohormone, hormone prothoracicotropique (PTTH), encore appelée ecdysiotropine (Mc Brayer et al. 2007 ; Gilbert, 2008). L'ecdysone, prohormone, libérée dans l'hémolymphe, est convertie en hormone active, ou 20-hydroxyecdysone (20E), dans différents organes

périphériques tels que le corps gras et les tubes de Malpighi ; cette opération est possible grâce à une enzyme, l'ecdysone 20-monoxygénase mais aussi au cytochrome P450 qui joue un rôle important dans la synthèse des hormones stéroïdes (Smith, 1995 ; Gilbert *et al.*, 2002; Rewitz *et al.*, 2006 ; Gilbert et Rewitz, 2009) Cependant, d'autres tissus, dont l'ovaire, peuvent être le siège de production des ecdystéroïdes (Lafont *et al.*, 1997 ; Gilbert *et al.*, 1997, 2002). Par ailleurs, la synthèse des ecdystéroïdes ovariens est aussi stimulée par l'HJ et l'interaction entre les ecdystéroïdes et l'hormone juvénile a été largement citée dans la littérature (Gade *et al.* 1997).

Chez *D. melanogaster*, l'ovariole est de type méroïstique acrotrophique et la maturation des ovocytes dépend majoritairement de l' HJ (Postlethwait et Shirk, 1981 ; Bownes, 1986 ; Lasko, 1994). Le développement ovarien comprend 14 stades (Raikhel *et al.* 2005) et la vitellogénèse est divisée en 3 processus distincts qui sont la prévitellogénèse, la vitellogénèse et la post-vitellogénèse. **La prévitellogénèse** débutant du stade 1 au stade 7 correspond au dépôt des protéines dans l'ovocyte. **La vitellogénèse** qui démarre dès le stade 8 coïncide avec l'exuviation adulte et permet l'accumulation des réserves énergétiques et plastiques (Kozlova et Carl, 2000) et enfin **la post-vitellogénèse** qui s'étale du stade 9 à 10 et qui correspond à une augmentation importante dans la taille de l'ovocyte en raison de l'incorporation des protéines. Pendant la vitellogénèse, la croissance de l'ovocyte se fait par endocytose des protéines, synthétisées à partir de deux sources, le corps gras (vitellogénines) et les cellules épithéliales folliculaires qui entourent les ovocytes (Raikhel et Dhadialla, 1992; Izumi *et al.* 1994; Melo *et al.* 2000).

Les résultats obtenus montrent que le spinosad, administrée par application topique, au dernier stade larvaire, à la dose d'inhibition de la mue nymphale (CI50) chez

D. melanogaster affecte la vitellogénèse chez les adultes femelles ; en effet, l'évaluation des vitellogénines et vitellines ovariennes, montre une inhibition dans leur contenu, au cours des premières 24 heures, qui correspondent à la vitellogénèse proprement dite. Cette réduction dans le contenu en vitellogénines et vitellines ovariennes présente une relation dose-réponse et est observée à toutes les heures testées. Ceci est en conformité avec la littérature

Ou le spinosad, à mode d'action neurotoxique à le même effet chez *B. germanica* (Maiza *et al.*, 2011, 2013).

D'autres pesticides naturels l'indoxacarbe à action neurotoxique comme le spinosad peuvent également réduire la fécondité et la fertilité chez les insectes (Galvan *et al.* 2005 ; Zaluzniak et Nugegoda, 2006 ; Yin *et al.* 2008 ; Maïza *et al.* 2013).

il est noté que l'azadirachtine pesticide naturel peut affecter le processus de reproduction chez divers insectes *via* les vitellogénines et vitellines ovariennes (Mordue et al., 2005 ; Liu et al., 2012); cet antagoniste des ecdystéroïdes et de l'HJ inhibe la synthèse des vitellogénines et leur incorporation par l'ovocyte chez *Chrysoperla carnea* (Medina et al., 2004), *Labiduraria* (Sayahet et al., 1996) ou encore chez *Rhipicephalus sanguineus* (Denardiet al., 2011). L'azadirachtine entraîne, similairement, une diminution dans le contenu en protéines ovariennes chez *Blatta orientalis* suggérant une inhibition des vitellines et/ou de la captation des vitellogénines par l'ovaire (Tine et al. 2011).

Les mêmes effets sont observés avec les agonistes des ecdystéroïdes (Mordue et al. 2005). Par ailleurs, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le teflubenzuron, diminue la synthèse des vitellogénines et leur incorporation par les ovocytes chez *Locusta migratoria* (Acheuk et al. 2012).

Ces réductions dans la fécondité et fertilité sont aussi retrouvés, chez divers insectes, traités avec des agonistes des ecdystéroïdes, comme le méthoxyfénoside (Sun & Barrett, 1999 ; Pineda et al. 2007 ; Rodriguez-Enriquez et al. 2010 ; Soltani-Mazouni et al. 2012 ; Saber et al. 2013), l'halofénoside (Farinos et al. 1999) ou encore le tébufénoside (Smagghe et Degheele, 1992).

L'impact du spinosad sur la régulation endocrine, chez *D. melanogaster*, pourrait alors entraîner une perturbation de l'ovogénèse, de la vitellogénèse et de diverses étapes de la reproduction. L'inhibition de la reproduction pourrait, éventuellement, être expliquée par l'effet neurotoxique du spinosad *via* les neurohormones et hormones.

Conclusion et perspectives :

Les expérimentations ont été menées chez *D.melanogaster* en vue d'évaluer l'efficacité de du spinosad administré, *in vivo* par application topique, au troisième stade larvaire,

0.28 µg/insecte correspondant à la CI 50.

Le spinosad, évalué tout d'abord sur la vitellogénèse, au cours du premier cycle gonadotrophique des adultes femelles de *D. melanogaster* montre une inhibition du processus de vitellogénèse ; en effet, il est noté une diminution hautement significative dans le contenu en vitellogénines et vitellines ovariennes à toutes les heures testées (6, 12, 18, 24 heures). Par ailleurs, une relation dose-réponse est observée.

Les résultats obtenus chez *D. melanogaster*, après le traitement avec le spinosad montrent une perturbation dans le processus de l'ovogénèse et de vitellogénèse .Ceci peut être expliqué par l'action neurotoxique de ce pesticide naturel sur les principales hormones de la reproduction (hormone juvénile et ecdystéroïdes) ou encore, par son interférence avec d'autres neuropeptides intervenant dans la régulation endocrine. Le spinosad semble donc avoir un impact négatif sur le contrôle endocrine de la reproduction mais les interactions entre les diverses hormones et neurohormones restent à définir.

A l'avenir, l'effet du spinosad devrait être évalué sur d'autres paramètres de la reproduction comme l'étude histologique des ovaires, le potentiel reproducteur ou encore le suivi de la descendance sur plusieurs générations.

Résumé

Spinosad, pesticide d'origine végétal, a été administré, *in vivo*, par application topique (CI50 : 0.28 µg/insecte) au troisième stade larvaire de *D.melanogaster*. Les effets de l'insecticide ont été évalués sur le contenu en vitellogénines et vitellines ovariennes (extraction selon Fabre et *al.* 1990 et dosage selon Bradford, 1976), au cours des premières 24 heures, après l'émergence, correspondant au premier cycle gonadotrophique des adultes femelles.

Le spinosad, perturbe la vitellogénèse, chez *D.melanogaster*, en réduisant, de manière significative et comparativement aux témoins, le contenu en vitellogénines et vitellines ovariennes à 6, 12, 18 et 24 heures après émergence (premier cycle gonadotrophique) ; cette inhibition montre une relation dose-réponse.

Mots clés : *Drosophila melanogaster*–spinosad– Pesticides naturels – Reproduction

Summary

Spinoza, pesticide of vegetable origin, was administered, *invivo*, by topical application (IC₅₀: 0.28 mg /insect) at third larval stage of *D.melanogaster*. The effects of the insecticide have been evaluated on vitellogenins content and ovarian vitellines (extraction by Fabre et al., 1990 and dosage according to Bradford, 1976), during the first 24 hours after emergence, corresponding to the first gonadotropic cycle of female adults.

The Spinosad disrupts the vitellogenesis in *D.melanogaster*, reducing significantly and comparatively to witnesses, the vitellogenins content and ovarian vitellines at 6, 12, 18 and 24 hours after emergence (first gonadotrophic cycle); this inhibition shows a dose-response relationship.

ملخص

Spinosad

مبيدات من أصل نباتي كانت تدار في الجسم الحي بواسطة التطبيق الموضعي (CI 50 0.28) ميكرو غرام/ حشرة) ليرقات في الطور الثالث ل : *D.melanogaster* و جرى تقييم آثار المبيدات الحشرية *Vitelline Vitellogenins* (لإستخراج عن طريق فابر و آخرون 1990 و الجرعة وفقا لبرادفورد 1976) خلال 24 ساعة بعد ظهور الموافق لدورة التبييض الأولى للإناث البالغات *Spinosad* يعطل *vitelline* في *D.melanogaster* يحد وبشكل ملحوظ مقارنة مع الضوابط *Vitellogenins* و *Vitelline* في 6 12 18 24 ساعة بعد ظهور دورة التبييض الأولى يظهر هذا التنشيط علاقة بين الجرعة و الإستجابة.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbott W.S., 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
2. **Anonyme.1996.** spinosad guide .Dow Agrosience, 25p
3. **Anjum S. I., M. J. Yousf, S. Ayaz and B. S. Siddiqui.2010.** Toxicological evaluation of chlorpyrifos and neem extract (biosal b) against 3rd instars larvae of *Drosophila melanogaster*, *The Journal of Animal & Plant Sciences* 20(1): 2010, Pages: 9-12 ISSN: 1018-70819.
4. **Aribi N., Smaghe G., Lakbar S., Soltani-Mazouni N. & Soltani N., 2006.** Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm *Tenebrio molitor*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 84: 55-62.
5. **Bond J.G., Marina C.F., Williams T., 2004.** The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae.- *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 50-56.
6. **Casida JE.2009.** pest toxicology:the primary mechanisms of pesticide action, *Chem Res Toxicol* ; 22:609-619.
7. **Campbell N.; Reece.J, 2004.** *Biologie*. Adaptation et révision scientifique de Richard. Mathieu, 2e édition de Boeck. Pp1482.
8. **Campbell. N. A, Reece. J. B; Mathieu. R, 2006.** *Biologie*. Edition 2, De Boeck Université, p 1482.
9. **Cassier P., Lafont R., Descamps M., Porchet M. & Soyez D., 1997.** La reproduction des invertébrés: stratégies, modalités et régulation. *Edition Masson.*, 354 p.
10. **Cetin, H., Yanikoglu, A., Cilek, J.E., 2005.** Evaluation of the naturally derived insecticide spinosad against *Culex pipiens L.* (Diptera: Culicidae) larvae in septic tank water in Antalya, Turkey. *J. Vector Ecol*, 30:151–154.
11. **Chouibani M; Ouizbouben A et KAACKH; 2003:** protection intégrée des agrumes. Ed. ouvrage réalisé par la direction de la protection des végétaux, des contrôles techniques et de la répression des fraudes en coopération avec la GTZ (projet contrôle phytosanitaire). 13p.

- 12. Colombani. J, Biamchini. L; Layalle. S; Léopard. P, 2006.** Stéroïdes, insulín et croissance: Les mouches dopent. La recherche/stéroïdes, insulín and growth: The flies. Dope the research. *Revue: M/S: médecine sciences*, 22(3): 241-243.
- 13. Copping L.G. & Menn J.J., 2000.** Biopesticides. A review of their action, applications and efficacy. *Pest. Manag. Sci*, 56: 651-676.
- 14. Copping, L.G & Menn J.J., 2001.** Biopesticides: à review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci*, 56: 651–676.
- 15. Dajoz R., 1986.** Les insecticides. E d. Dunod. paris, 147 p.
- 16. Dhadialla T. S., Retnakaran A. & Smaghe G., 2005.** Insect growth- and development- disturbing insecticides, in: L.I. Gilbert, K. Latrou, S.S. Gill (Ed), *Compreh. Mol. Insect S, Elsevier- Pergamon, Oxford, UK*, vol. 6, PP. 55-115.
- 17. Fisher et Yates. 1957.** Statistical tables for biological agricultural and medical research .Ed., Olinir et Boyd. London, 6466.
- 18. Finney D.J., 1971.** *Probit Analysis* (3rd ed). Cambridge University Press, London.
- 19. Fort D. G., Stover E. L., Bantle J. A., Dumont J. N. & Finch R., 2000.** Evaluation of a reproductive toxicology assay using *Xenopus laevis*: boric acid, cadmium and ethylene glycol monomethyl ether. *J. App. Toxicol.*, 21: 41-52.
- 20. Fransco M.F & Guilhermino L. 2002.** Effects of dimithoate and beta-naphtoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish. Physiol. Biochem.*, 26, 149-156.
- 21. Gillespie, D.R. 1988** Greenhouse evaluations of a predatory mite, *hypoaspis* sp, 1 :34.
- 22. Gäde G., Hoffmann R. H. & Spring J. H., 1997.** Hormonal regulation in insects: Facts, Graps and future direction. *Physiol. R.*, 77(4): 963-1032.
- 23. Gupta, S. C., H. R. Siddique, Saxena, D. Kar and Chowdhuri ., 2005.** Comparative toxic potential of market formulation of two organophosphate pesticides in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacz) *J. Cell. Bio. and Toxic* 21(3/4):149-162
- 24. Habes D., Kilani-Morakchi S., Aribi N., Farine J.P. & Soltani N., 2006.** Boric acid toxicity of the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pest. Biochem. Physiol.* 84 : 17-24.
- 25. Horowitz A.R & Ishaaya I., 2004.** Biorational insecticides mechanisms, selectivity and importance in pest management. In: *Insect pest management- Field and Protected Crops*. Horowitz, A.R. and Ishaaya I. (Eds). Springer, Berlin, pp.1-28.
- 26. Jacquet V.F. Guéguen, R. Dutton, 2002.** intérêt du spinosad en viticulture pour lutter contre les lépidoptères, les thrips et la drosophile. *Annales. 6° CIRA, Montpellier*, 46. decembre 2002, 8p.

- 27. Jeffrey., 1999.insecticides.Chemistries and characteristios.blacksburg. virginis.18p.**
- 28. Jiang Y & Mulla M.S., 2009.** Laboratory and field evaluation of spinosad, a biorational natural product, against larvae of *Culex mosquitoes*. *J. Am Mosq Control Assoc.*, **25**(4), 456-66.
- 29. Kaakeh W. Bennett G. W., 1997.** Evaluation of trapping and vacuuming compared with low impact insecticide tractics for managing German cockroaches in residences. *J. Econ. Emomol.*, 90(4): 976-982.
- 30. Keiding J.,1977.**resistance in the housefly in denmark and elsewhere in Watsun DL,braown AWA.pesticide management and insecticide resistance.new York,academic press,page:261,302.
- 31. Kristensen ,M., Jespersen, J.B., 2004.**Susceptibility of spinosad in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) field populations, *J. Econ. Entomol.* 97:1042–1048.
- 32. Lee C.Y.,Hemingwa J.,Yap H.H & Chong N.L.,2000.** -Biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach, *Blattella germanica*, from Malaysia. *Med. Vet. Entomol.* **14**, 11-18.
- 33. Maiza A., Kilani-Morakchi S., Farine J.P., Smaghe G., Aribi N., Soltani N., 2004.** Hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb. *Comm. Appl. Biol. Ghent University.* **69/3.** 257.
- 34. Meigen J.H., 1830.** Systrmatische Beshreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten, Shulzische Buchhandlung, hamm, 6 : 401.
- 35. Mertz, F.P., Yao R.C., 1990.** Saccharopolyspora spinosa sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. *Inter. J. Sys. Bacter.*, 40: 34–39.
- 36. Magnin et al., 1985.Mécanismes** physiologiques de la résistance des insectes aux insecticides, 1985 Cah.O.S.T.O.M.,Sér.Ent.méd.ET parasitol.,Vol.,XX III(4) :273-280.
- 37. Milhoud et al., 1982.intérêt** des pyrétrines et pyrethrinoides de syntnèse en médecine vétérinaire.Rec.ned. 158(u) :397-405.
- 38. Morakchi S., Maiza A., Farine J. P., Aribi N. & Soltani N., 2005.** Effects of a neonicotinoid insecticide (acetamipride) on acetylcholinesterase activity and cuticular hydrocarbons profil in german cockroache. *Comm. Appl. Biol. Sci, University,* 70/4.
- 39. Narahash., 1983 cité par Magnin et al., 1985.mécanismes** physiologiques de la resistance des insectes aux insectisides, 1985 Cah.O.S.T.O.M. , Sér.Ent.ET parasitol.Vol.XX III(u) :273-280.
- 40. Patterson J., R. Wagner., L. Wharton., 1 avril 1943.** Le drosophilidés du Sud-Ouest. Austin, TX: The University of Texas Press.400p.

- 41. Penagos D.I., Cisneros J., Hernandez O & Williams T. 2005.** Lethal and sublethal effects of the naturally derived insecticide spinosad on parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, **15**(1), 81-95.
- 42. Petek Piner, Nevin Uner , 2012.** Organic Insecticide Spinosad Causes In Vivo Oxidative Effects in the Brain of *Oreochromis niloticus*. *Inc. Environ Toxicol* 00: 000–000, 2012.
- 43. Rao J. V. & Kavitha P., 2004.** Toxicity of azodrin on the morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia foetida*. *Environ. Res.* **96**: 323-327.
- 44. Ramade F., 2003:** *éléments d'écologie fondamentale*, 3^{ème} édition DUNOD, Paris , 690p.
- 45. Rivet., 1992.** les populations de culex pipiens (Diptera : Culicidae) vues au travers des gènes de résistance aux insecticides organophosphorés. Etude dans la région Rhône-Alpes. Thèse Doc. es-Sciences. Univ. Claude Bernard. Lyon 1, 142pp.
- 46. Salgado, V.L. 1998.** Studies on the mode of action of Spinosad: Insect symptoms and physiological lates. *Pest. Biochem. Physiol.*, **60**: 91–102.
- 47. Salgado, V.L., Sparks, T.C., 2005.** The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance, in: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill (Eds.), *Comp. Insect Mol. Sci. Control.*, **6** : 137–173.
- 48. Salgado, V.L. 1997.** the mode of action of spinosad and other insect control products, down to earth *52*: 3544.
- 49. Salgado V.L., Sheets J.J., Watson G.B & Schmidt A.L., 1998.** Studies on the mode of action of spinosad: the internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **60**, 103-110.
- 50. Semiz, G., Cetin H., Isik K., Yanikoglu A., 2006.** Effectiveness of a naturally derived insecticide, spinosad, against the pine processionary moth *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) under laboratory conditions. *Pest Manag. Sci.*, **62**: 452–455.
- 51. Shono ,T., Scott ,J.G., 2003.** Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1, *Pest. Biochem. Physiol.* **75** : 1–7.
- 52. Siegfried B. D. & Scott J. G., 1991.** Mechanisms responsible for propoxur resistance in German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pest. Set.*, **33**: 133-138.
- 53. Smagghe G., Medina P., Schuyesmans S., Tirry L., Vinuela E., 2000.** Insecticide resistant monitoring of tebufenozide for managing *Spodoptera exigua* (Hobner [1808]). *Bol. San. Veg. Plagas.*, **26**: 475-481.
- 54. Soltani N., Aribi N., Berghiche H., Lakbar C. & Smagghe G., 2002.** Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion in *Tenebrio molitor* pupa *in vivo* and *in vitro*. *Pest. Biochem and Physiol.*, **72**: 83-90.
- 55. Sparks T.C., Thompson G.D., Larson L.L., Kirst H.A., Jantzo K., Worden T.V., Hertlen M.B., Busacca J.D., 1995.** Biological characteristics of the spinosyns: a new and naturally

derived insect control agent, pp. 903-907. In: *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. National Cotton Council, San Antonio, Texas, USA.

56. Strange K. & Klungsoyr J., 1997. Organochlorine contaminants in fish and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Barents sea. *ICES J. Mar. Sci.*, 54: 318-332.

57. Strong C. A., Koehler P. G. Patterson R. S., 2000. Oral toxicity and repellency of borates to German cockroach (Dictyoptera : Blattellidae). *J. Econ. Entomol*, 86(5): 1458-1463.

58. Swaroop., 1957. Statistical methods for malaria eradication programs (World Health Organization) Geneva Switzerland

59. Swaroop S & Uemura K., 1966. Probit analysis (World Health Organisation). Geneva. Switzerland

60. Taïbi F., Smaghe G., Amrani L. & Soltani-Mazouni, N., 2003. Effect of ecdysone agonist, RH-0345, on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Com. Biochem. Physiol.*, 135 : 257-267.

61. Thompson, G.D., Busacca, J.D., Jantz, O.K., Kirst, H.A., Larson, L.L., Sparks, T.C., 1995. Spinosyns: an overview of new natural insect management systems. In: Proceedings Beltwide Cotton Conference. *National Cotton Council, Memphis, TN*, pp. 1039–1043.

62. 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.

63. Thompson G.D., Sparks T.C., 2002. Spinosad a green natural product for insect control, 823 (advancing sustainability through green chemistry and engineering), *ACS Symp* pp : 61–73.

64. Tracqui. P, Demongeot. J, 2003. Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines de la structure aux fonctions, EDP sciences Edition, 94-95.

65. Tavernir R., Lizeaux C. 2002. Sciences vie terre Term. S- Spec. Maisonneuve et Larose. Pp. 113, 116, 117.

66. Venkateswara rao J., 2006. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem. Physiol*, 143C, 492-498.

67. Verger P, Aulagnier M, Schvoebel V, et lang T. 2005. « Démarche épidémiologiques après une catastrophe » la documentation française, 266p.

68. Wang, W., Mo, J., Cheng, J., Zhuang, P., Tang, Z., 2006. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pest. Biochem. Physiol.* 84 : 180–187.

- 69. Wang D., GONG P., Li M., Qiu X., Wang K., 2009.** Sublethal effects of spinosad on survival, growth and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).- *Pest Management Science*, 65: 223-227.
- 70. Wanner, K. W., Helson, B. V., and Harris, B. J. 2000.** Laboratory and field evaluation of Spinosad against the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Pest Manag. Sci.* 56 : 855–860.
- 71. Ware, G.W. 1999, introduction** to insecticides; p.7274.
- 72. Warlop F, M. Thomas, L.Reynaud, 2000.**essai de lutte contr la mouche de la cerise en agriculture biologique, rapport final GRAB 2000, 3p.
- 73. Watson. J. D, 1928.** Michael Gilman, O. AND. Recombinant. De Boeck. Université, p. 390.
- 74. Wattiez C. & Beys B., 1999.** Pas de pesticides à la maison solution sans danger pour le contrôle de Bestioles indésirables. *Pest. Action. Network (Pan) Belgium. Yip*
- 75. Weems H., 1981: Mediterranean fruits.** *Pep. Agric. Cumer, Dir. Plant industry. entomol. Circ. Florida(230), 12p.*
- 76. Wei Y.A., Appel G., Moar W.J., Liun., 2001.** Pyrethroid resistance and cross resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L).- *Pest Management Science*, 57: 1055-1059.
- 77. Williams, T., Vale J., Vinuela E., 2003.** Is the naturally derived insecticide spinosad compatible with insect natural enemies. *Biocontrol Sci. Technol*, 13: 459–475.
- 78. Wolfgang Pierl & Werner Ring, 1992.** Guides des insectes, délaux et niestlé, Paris, pp 42-198.
- 79. Wyss, C.F., Young H.P., Shukla J., Roe R.M., 2003.** Biology and genetics of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad. *Crop Protect*, 22: 307–314.
- 80. Yasmin, N., M. F. Khan, M. Jehan, S. N. H. Naqi and R. Tabassum., 1995.** Toxicological studies of Trichlorfon and RBa-(Neem extract) against adults of *Drosophila melanogaster* Pakistan. *J. Entomol.* 10(1-2):65-68.
- 81. Zhao, J.Z., Li, Y.X., Collins, H.L., Gusukuma-Minuto, L., Mau, R.F.L., Thompson, G.D., Shelton, A.M., 2002.** Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J. Econ. Entomol*, 95 :430–436.
- 82. Zinkl J.G., Lockhart W.L., Kenny S.A. & Ward F. J., 1991.** The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In " Chemical in Agriculture" (P. Mineau, Ed), Vol. 2: 233-2.*