الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار- عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

**THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES**

**Spécialité: BIOLOGIE ANIMALE**

**Intitulé**

# Evaluation des effets du Spinosad chez un modèle fondamental de recherche *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): Toxicité, biomarqueurs enzymatiques, métabolisme et reproduction.

**Présentée par: M^lle CHAABANE Meriem**

**Membres de Jury:**

| | |
|---|---|
| **Présidente:** Pr. Wahida LOUCIF-AYAD | U. B.M.A Annaba |
| **Directeur de thèse:** Pr.Nadia ARIBI | U. B.M.A Annaba |
| **Co-Directeur:** Dr. Gaelle LeGoff | INRA, Antibes France |
| **Examinatrice:** Pr. Zaïna AMIRAT | USTHB. Alger |
| **Examinatrice:** Pr .Leila ALLAL-BENFEKIH | Université de Blida |
| **Examinatrice:** Dr. Karima SIFI | U. B.M.A Annaba |

**Année Universitaire: 2016-2017.**

**REMERCIEMENTS**

*Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude à mes parents.*

*Je remercie infiniment* ***Mme le Professeure*** **Wahida LOUCIF-AYAD***(UBMA) pour avoir accepté d'être présidente de jury. Qu'il me soit permis de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.*

*Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à madirectrice de thèse* ***Mme le Professeure Nadia ARIBI*** *(UBMA) pour l'excellent encadrement fourni, son soutien, sa disponibilité et sa patience malgré ses nombreuses tâches. Grâce à ses conseils judicieux et son enthousiasme motivant, j'ai pu réaliser ce travail et j'espère avoir été à la hauteur de ses attentes. Merci d'avoir en toutes occasions pris le temps de m'écouter et de me comprendre. Pour tout cela mais aussi pour votre humanisme, votre bonté et votre gentillesse.*

*Mes sincères gratitude et reconnaissance s'adresse à ma co directrice de thèse* ***Dr*** **Gaelle Le Goff,** *Chargée de recherche au sein de l'INRA, Sophia Antipolis, France pour sa disponibilité, son aide tout au long de ce travail et pour avoir bien voulu m'accueillir au sein de son laboratoire.*

*Mes remerciements sincères et respectueux vont également à* ***Mesdames les Professeures*** **Zaïna AMIRAT***(USTHB) et* ***Leïla ALLAL-BENFEKIH*** *(Université de Blida) pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'y consacrer leur temps ; leur présence dansce jury est un honneur.*

*Je suis très reconnaissante envers* ***Mme le Dr*** **Karima SIFI,** *Maître de Conférences (UBMA) pour avoir accepté de juger cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je tiens également à remercier* ***Monsieur le Professeur*** **Malik LAAMARI** *(Université de Batna) de nous honorer par sa présence.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à* ***Monsieur le ProfesseurNoureddine Soltani****, Directeur de Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (UBMA) pour avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.*

*Que toute l'équipe du laboratoire de Biologie Animale appliquée trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour leur soutien. En outre, je tiens, aussi à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse, et particulièrement* ***Mme le Professeure Samira Kilani-Morakchi****.*

*Ce travail qui est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai bénéficié d'aide d'encouragements et de soutien de toute ma famille, à qui je tiens à dire profondément et sincèrement merci.*

# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

**INTRODUCTION** ..... 1
**MATERIEL ET METHODES** ..... 11
1. Matériel biologique ..... 11
1.1. Présentation de *D.melanogaster* ..... 11
1.2. Cycle de vie de *D.melanogaster* ..... 12
1.3. Élevage en laboratoire ..... 13
2. Présentation de l'insecticide ..... 15
3. Traitement des insectes et tests de toxicité ..... 16
4. Extraction et dosage des métabolites ..... 17
4.1. Extraction des métabolites ..... 17
4.2. Dosage des métabolites ..... 17
*Dosage des protéines* ..... 17
*Dosage des glucides* ..... 18
*Dosage des lipides* ..... 19
5. Dosage de la catalase (CAT) ..... 20
6. Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) ..... 21
7. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs) ..... 22
8. Evaluation des vitellogenines ..... 24
9. Analyse statistique ..... 25
**RESULTATS** ..... 26
1. Evaluation de la toxicité du Spinosad chez *D.melanogaster* ..... 26
2. Effets du Spinosad sur les biomarqueurs enzymatiques ..... 29
2.1. Effets sur l'activité spécifique des GSTs chez la G0 et la G1 ..... 29
2.1.1. Effets chez les pupes de la G0 ..... 29
2.1.2. Effets chez les adultes de la G0 ..... 30
2.1.3. Effets chez les larves de la G1 ..... 30
2.1.4. Effets chez les pupes de la G1 ..... 31
2.1.5. Effets chez les adultes de la G1 ..... 31
2.1.6. Comparaison entre les deux générations ..... 32
2.2. Effets sur l'activité spécifique de la CAT pour la G0 et la G1 ..... 34

2.2.1. Effets chez les pupes de la G0 ..... 34
2.2.2. Effets chez les adultes de la G0 ..... 35
2.2.3. Effets chez les larves de la G1 ..... 36
2.2.4. Effets chez les pupes de la G1 ..... 36
2.2.5. Effets chez les adultes de la G1 ..... 37
2.2.6. Comparaison entre les deux générations ..... 38
2.3. Effets du Spinosad sur l'activité spécifique del'AChE chez la G0 et la G1. ..... 40
2.3.1. Effets chez les pupes de la G0 ..... 40
2.3.2. Effets chez les adultes de la G0 ..... 40
2.3.3. Effets chez les larves de la G1 ..... 41
2.3.4. Effets chez les pupes de la G1 ..... 42
2.3.5. Effets chez les adultes de la G1 ..... 42
2.3.6. Comparaison entre les deux générations ..... 43
3. Effets du Spinosad sur les métabolites dans le corps entier ..... 45
3.1 Effets sur les protéines chez la G0 et la G1 ..... 45
3.1.1. Effets chez les pupes de la G0 ..... 45
3.1.2. Effets chez les adultes de la G0 ..... 45
3.1.3. Effets chez les larves de la G1 ..... 46
3.1.4. Effets chez les pupes de la G1 ..... 46
3.1.5. Effets chez les adultes de la G1 ..... 47
3.1.6. Comparaison entre les deux générations ..... 48
3.2. Effets sur les glucides chez la G0 et la G1 ..... 50
3.2.1. Effets chez les pupes de la G0 ..... 50
3.2.2. Effets chez les adultes de la G0 ..... 50
3.2.3. Effets chez les larves de la G1 ..... 51
3.2.4. Effets chez les pupes de la G1 ..... 51
3.2.5. Effets chez les adultes de la G1 ..... 52
3.2.6. Comparaison entre les deux générations ..... 53
3.3. Effets sur les lipides chez la G0 et la G1 ..... 53
3.3.1. Effets chez les pupes de la G0 ..... 55
3.3.2. Effets chez les adultes de la G0 ..... 55
3.3.3. Effets chez les larves de la G1 ..... 55
3.3.4. Effets chez les pupes de la G1 ..... 56
3.3.5. Effets chez les adultes de la G1 ..... 57

3.3.6. Comparaison entre les deux générations ..... 58
4. Effets du Spinosad sur les vitéllogénines chez les adultes femelles……60
4.1. Effets du Spinosad sur les vitellogénines dans le corps gras.....60
4.1.1. Effets chez les adultes de la G0.....60
4.1. 2.Effets chez les adultes de la G1 ..... 61
4.1.3. Comparaison entre les deux générations ..... 62
4.2. Effets du Spinosad sur les vitellogénines dans les ovaires chez les adultes femelles ... 64
4.2.1. Effets chez les adultes de la G0..... 64
4.2.2. Effets chez les adultes de la G1..... 65
4.2.3. Comparaison entre les deux générations ..... 66
**DISCUSSION** ..... 69
1. Activité insecticide ..... 69
2. Effet du Spinosad sur les biomarqueurs enzymatiques ..... 70
3. Effets sur les métabolites..... 74
4. Effets sur les vitellogénines ..... 76
**CONCLUSION ET PERSPECTIVES** ..... 77
**RESUME**..... 80
**ABSTRACT** ..... 82
**الملخص** ..... 84
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**..... 85
**ANNEXES.**.....101

## Liste des Tableaux


| N° | Titre | Page |
|---|---|---|
| 1 | Dosage des protéines: réalisation de la gamme d'étalonnage. | 18 |
| 2 | Dosage des glucides: réalisation de la gamme d'étalonnage. | 19 |
| 3 | Dosage des lipides: réalisation de la gamme d'étalonnage. | 20 |
| 4 | Effets du Spinosad administré *in vivo,* par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster*: inhibition corrigée (%) de la mue nymphale (m ± sd; n = 3 répétitions de 30 individus chacune). | 27 |
| 5 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* sur l'inhibition de la mue nymphale (%): Analyse de la variance a un critère de classification | 27 |
| 6 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster:* Détermination des doses d'inhibition de la mue nymphale (DI en ng) et leurs intervalles de confiance à 95%. | 28 |
| 7 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | 29 |
| 8 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM /min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | 30 |
| 9 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | 30 |

| | | |
|---|---|---|
| **10** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **33** |
| **11** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM M/min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **32** |
| **12** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1): Analyse de la variance à deux critères de classification. | **33** |
| **13** | Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique, ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | **34** |
| **14** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués surl'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | **35** |
| **15** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués surl'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **36** |
| **16** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués surl'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **37** |
| **17** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **38** |
| **18** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1): Analyse de la variance à deux critères de classification. | **39** |
| **19** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3jours) de la G0 (m ± sd; n=4 à 6). | **40** |

| | | |
|---|---|---|
| **20** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM /min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | **41** |
| **21** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **41** |
| **22** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM /min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **42** |
| **23** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM /min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **43** |
| **24** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1):Analyse de la variance à deux critères de classification. | **44** |
| **25** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G0(m ± sd; n= 4 à 6). | **44** |
| **26** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | **46** |
| **27** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n = 4 à 6). | **46** |
| **28** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **47** |
| **29** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **48** |

| | | |
|---|---|---|
| 30 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ :288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines (µg/mg) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1):Analyse de la variance à deux critères declassification. | 49 |
| 31 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ :288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | 49 |
| 32 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4-6). | 50 |
| 33 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n = 4 à 6). | 50 |
| 34 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | 51 |
| 35 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n = 4 à 6). | 52 |
| 36 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides (µg/mg) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1) (n = 4 à 6). Analyse de la variance à deux critères de classification. | 54 |
| 37 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ : 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | 55 |
| 38 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ : 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | 56 |
| 39 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | 56 |
| 40 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | 57 |

| | | |
|---|---|---|
| **41** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n = 4 à 6). | **58** |
| **42** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ : 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides (µg/mg), chez les larves (L3), pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1):Analyse de la variance à deux critères de classification. | **59** |
| **43** | Effets du Spinosad administré *in vivo*par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines dans le corps gras (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | **61** |
| **44** | Effets du Spinosad administré *in vivo*par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines dans le corps gras (µg/mg) au cours des24 heures après l'émergence des adultes femelles de la G1(m ± sd; n= 4 à 6). | **62** |
| **45** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ : 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines dans le corps gras (µg/mg) chez les adultes femelles au cours de deux générations successives (G0 et G1):Analyse de la variance à deux critères de classification. | **63** |
| **46** | Effets du Spinosad administré *in vivo*par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* et évalués sur le contenu en vitéllogénines ovariennes (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6). | **65** |
| **47** | Effets du Spinosad administré *in viv,* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines ovariennes (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6). | **66** |
| **48** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ : 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines ovariennes (µg/mg), chez les adultes femelles au cours de deux générations successives (G0 et G1):Analyse de la variance à deux critères de classification | **67** |

## Liste des figures


| N° | Titre | Page |
|---|---|---|
| 1 | Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides (Raymond-Delpech *et al* ., 2005). | 10 |
| 2 | *Drosophila melanogaster* **A**: femelle; **B**: mâle; C: peignes sexuels | 11 |
| 3 | Le cycle de vie de *D.melanogaster* à 25°C (Jouandin, 2013). | 14 |
| 4 | Elevage de *D. melanogaster*au laboratoire. (Souche Canton S) | 15 |
| 5 | Structure chimique du Spinosad (Ishaaya& Horowitz, 1998) | 16 |
| 6 | Dosage des protéines dans le corps entier: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nmen fonction de la quantité de protéines (µg). | 18 |
| 7 | Dosage des glucidesdans le corps entier: droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose (µg). | 19 |
| 8 | Dosage des lipides dansle corps entier: droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table (µg). | 20 |
| 9 | Effets du Spinosad administré *in vivo*par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de*D.melanogaster* sur l'inhibition observée (%) de la mue nymphale (m ± sd; n = 3 répétitions de 30 individus chacune). | 26 |
| 10 | Effets du Spinosad administré *in vivo*par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster*: Inhibition corrigée (%) de la mue nymphale et classement des doses testées par le test HSD de Tukey($p<0,001$). | 28 |
| 11 | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n = 4-6). | 34 |

| | | |
|---|---|---|
| **12** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n = 4-6). | **39** |
| **13** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n = 4-6). | **44** |
| **14** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D. melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines (µg/mg) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n= 4-6). | **49** |
| **15** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides (µg/mg) chez les larves (L3) pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1)(m ± sd; n= 4 à 6). | **54** |
| **16** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides (µg/mg) chez les larves (L3) pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n= 4 à 6). | **59** |
| **17** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras (µg/mg) chez les adultes femelles au cours des 24 heures après l'émergence pour les deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n= 4 à 6). | **64** |
| **18** | Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitellogénines ovariennes (µg/mg) chez les adultes femelles au cours des 24 heures après l'émergence pour les deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n= 4 à 6). | **68** |

# INTRODUCTION

**INTRODUCTION**

En Agriculture et en absence de produits phytosanitaires, les pertes de récoltes causées par des organismes nuisibles (invertébrés, pathogènes, parasites, champignons) représentent l'équivalent de nourriture pour 1 milliard de personnes (Birch *et al*.,2011). Les ravageurs sont responsables de la majorité des pertes occasionnées (Kulkarni *et al*.,2009; Abhilash & Singh, 2009 ; Dimetry, 2014) mais les arthropodes et, principalement, les insectes sont considérés comme étant les plus importants (McKay *et al.,* 2013 ;White *et al.,* 2014; Govindarajan & Rajeswary, 2015). Parmi cette classe d'invertébrés, se trouvent également de nombreux vecteurs d'agents pathogènes à l'origine de diverses maladies chez l'animal dont l'Homme (El Joubari *et al.* ,2015; Tia *et al* 2016). Par conséquent, la gestion de ces nuisances est primordiale, non seulement, pour la protection de la santé humaine mais aussi pour satisfaire les besoins alimentaires d'une population mondiale sans cesse grandissante (selon l'ONU, 2016, la population mondiale est passée de 7 milliards en 2011 à 7,4 milliards en 2016 et un chiffre de 7,5 milliards est prévu en 2017). Des moyens importants sont déployés à l'échelle mondiale mais la lutte chimique reste, encore, le moyen le plus largement adopté pour contenir les différents fléaux à un seuil raisonnable (Casida & Durkin, 2013; Noureen *et al.,*2016). L'utilisation des pesticides synthétiques a connu un développement important et différents éléments ont favorisé cet essor: l'accroissement démographique de la population humaine (obligation d'augmenter la productivité agricole) l'affaiblissement des terres cultivées (épidémies dans les cultures), l'apparition du machinisme agricole ainsi que les progrès importants dans le domaine de la chimie organique de synthèse.

Le véritable essor des pesticides de synthèse débute au XXe siècle avec un développement considérable des insecticides organiques qui sont majoritairement des composés organochlorés et dont le plus tristement célèbre est le DDTou dichlorodiphényltrichloroéthane. Cette molécule, très efficace dans la lutte contre le

paludisme, a été préparée pour la première fois en 1874 par Zeidler mais ses propriétés insecticides furent découvertes en 1939 par Müller et Weissman. L'activité insecticide de l'hexachlorocyclohexane (HCH) et du lindane a été découverte en 1942 (Casida, 1998), puis d'autres composés organochlorés sont apparus par la suite (l'aldrine, la dieldrine et l'endosulfan). En parallèle de ces composés chlorés se sont également développés, sur le marché, les composés organophosphorés (OP), composés moins dangereux pour l'environnement (Fulton et Key 2001). Le premier d'entre eux fut découvert en 1937 par Schrader puis un grand nombre d'autres (OP) ont été découverts en phosphorylant un motif moléculaire commun; parmi ceux-ci, on peut citer le parathion, le malathion ou encore le diazinon (Ciba-Geigy, 1952). Les carbamates synthétiques, nouvelle famille de pesticide développée dès 1947, sont représentés par le carbaryl ou l'aldicarbe (Cohen *et al*., 1984). Ce sont essentiellement des dérivés synthétiques d'un alcaloïde principal des légumineuses (physostigmine ou sérine). Les pyréthrinoïdes sont apparus au début des années 1970 (perméthrine en 1973 et la deltaméthrine en 1974) et présentaient l'avantage de ne nécessiter que très peu de matière active par rapport aux précédents (Zaim *et al*., 2000).

La majorité de ces insecticides agissent au niveau du système nerveux de l'insecte et en perturbent le fonctionnement. Bien qu'ils n'aient pas tous la même cible, les symptômes sont souvent similaires et peuvent être décrits en 4 étapes: excitation, convulsions, paralysie puis la mort (Shafert *et al*., 2005). Le DDT et les pyréthrinoïdes ont pour cible le canal sodium voltage dépendant qui permet la transmission du potentiel d'action. En se fixant au canal, ils en empêchent la fermeture (Lombet, 1988), causant ainsi une activation persistante des canaux sodium et retardant donc le mécanisme d'inactivation normal dû au voltage (Soderlund, 1997). Les organophosphorés et les carbamates inhibent quant à eux l'acétylcholinestérase qui permet l'arrêt de la transmission de l'influx nerveux (Rao, 2006).

L'emploi de ces pesticides conventionnels a engendré, non seulement, des effets dramatiques sur la biodiversité et les écosystèmes mais aussi une importante pollution de l'environnement (Gagné et *al*., 1999; Long, 2000; Comoretto & Chiron, 2005; Kohler & Triebskorn, 2013; Gupta & Milatovic, 2014; Duchet *et al.,*2015; Kanwer *et al.,*2016; Begum *et al*., 2017). En outre, la forte persistance des résidus chimiques accroit cet impact non seulement dans les divers écosystèmes mais aussi dans la chaîne alimentaire (Yuan *et al*., 2016; Begum *et al*., 2017); ainsi, l'Homme souffre de diverses affections et maladies (respiratoires, immunitaires, cancers, autisme, hyperactivité..etc) suite à des désordres dans le développement des organes et/ou dans la physiologie de diverses fonctions de l'organisme (Nicopoulo-Stamati *et al*., 2016; Vrijheid *et al.,* 2016; Fujiwara *et al*., 2016; Begum *et al*., 2017). Par ailleurs, la santé reproductive se trouve, également, altérée du fait que la majorité de ces molécules agissent aussi comme perturbateurs endocriniens (Zlatnik, 2016). Parallèlement à ces effets délétères, une perte d'efficacité est à noter du fait de l'acquisition d'une résistance des insectes vis-à-vis des pesticides de différents groupes (Sparck & Nauen, 2015; Pan *et al*., 2017).

L'utilisation des organochlorés a été fortement réduite dans certaines parties du monde dès 1970 et plusieurs de ces composés ont été retirés du marché des pesticides comme le DDT interdit en 1972 (Hellou *et al*., 2013). Cependant, beaucoup de molécules synthétiques sont encore maintenues (Cantrell *et al.,* 2012; Casida & Durkin, 2013) du fait de leur grande efficacité dans la gestion des organismes visés (Bruce, 2010).

Des molécules synthétiques à moindre impact environnemental, alternative aux pesticides conventionnels, ont pu être développées puis commercialisées par des firmes phytosanitaires. Cesmoléculessont représentées par les perturbateurs de développement des insectes (insects growth distruptors ou IGDs) apparus dès 1967 et anciennement connus sous le nom de régulateurs de croissance (Dhadialla *et al.,* 2005, 2010; Pener & Dadhialla, 2012).

Parmi ces composés se trouvent les agonistes et antagonistes de l'hormone juvénile ou HJ (méthoprène, fénoxycarbe), des ecdystéroïdes (avec les bisacylhydrazines: le premier a été découvert en 1983 par Hsu en 1991 et l'un des derniers, le méthoxyfenozide par Le en 1996) mais aussi les inhibiteurs de la synthèse de la chitine composé majeur de la cuticule (Dhadialla *et al.,* 2005, 2010; Pener&Dadhialla, 2012). Ces composés présentent l'avantage, comparativement à d'autres pesticides, d'être faiblement voire moins toxiquespour les mammifères, les oiseaux, les poissons ainsi que pour un certain nombre d'insectes auxiliaires (Dhadialla, 1998). Ils agissent spécifiquement *via* les récepteurs des deux principales hormones du développement (HJ et les ecdystéroïdes) et *via* la synthèse de la chitine (Ishaaya, 1990; Dhadialla *et al.,* 2005, 2010;Sabry & Gehan, 2016).

Entre les années 1970 et 1980, des recherches basées sur la structure de la nicotine ont permis le développement d'une nouvelle famille d'insecticides, les néonicotinoïdes (Jeschke et Nauen, 2005; Bonmatin *et al*., 2015). Ce sont des analogues synthétiques de la nicotine, alcaloïde naturel extrait des feuilles de tabac, utilisée depuis des siècles comme insecticide (Seifert, 2005; Jeschke*et al.,* 2011). La commercialisation de l'imidaclopride débute en 1994 et il sera suivi par d'autres substances comme le thiaclopride, le nitenpyrame ou encore le clothianidine. Les néonicotinoïdes très efficaces contres divers insectes dominent actuellement le marché des insecticides (Seifert, 2014; Pisa *et al.,* 2015). Ces molécules agissent, par contact et ingestion, sur le système nerveux des insectes *via* les récepteurs nicotiniques de l'acetylcholine ou nAChRs (Ghanim & Ishaaya, 2010; Seifert, 2014; Shivanandappa & Rajashekar, 2014).

Parallèlement à ces développements, un regain d'intérêt pour l'utilisation de composés naturels a réapparu. En effet, vers 1850, les fermiers et paysans utilisaient déjà les insecticides inorganiques comme l'arsenic et l'acide borique mais ce type de molécules naturelles permettait juste un contrôle marginal. D'autres produits d'origine botaniques arrivèrent par la

suite comme la nicotine, la roténone et le pyrèthre. C'est en 1977 avec l'endotoxine de *Bacillus thuringiensis* (Bt) à activité insecticide (Goldberg, 1977) que l'appellation biopesticides est apparue; en effet, les molécules d'origine naturelle se définissent, au sens large, comme provenant d'organismes vivants ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures. Actuellement, ils sont classés en trois grandes catégories selon leur origine (microbienne, végétale ou animale) et présentent de nombreux avantages (Deravek*et al*., 2014).Ils 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 beaucoup moins nocifs que leurs homologues chimiques. Les biopesticides sont l'objet d'un intérêt croissant de la part des exploitants, notamment dans le cadre de stratégies de lutte intégrée (Deravek *et al*., 2014). Leur apparition sur le marché de pesticides s'est faite grâce à l'essor de la biotechnologie et à la mise en place du processus du développement durable (Sporleder & Lacey, 2013). Selon, l'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA), 192 biopesticides actifs ont pu être enregistré sur le marché mondial (Cantrell *et al.,* 2012; Villaverde *et al*., 2014; Mkenda *et al*., 2015; Olson, 2015)

Parmi ces molécules, à risque environnemental réduit du fait de leur biodégradation rapide, se trouvent deux molécules fortement recommandées dans la lutte intégrée: l'Azadirachtine ou encore le Spinosad (Shelton *et al*., 2004). L'Azadirachtine, substance naturelle dérivée du Neem ou *Azadirachta indica* Juss (Miliaceae) agit comme un antagoniste de l'hormone juvénile et des ecdystéroïdes et perturbe donc tous les processus physiologiques (développement et reproduction) où ces deux hormones interviennent (Mordue *et al*., 2005, 2010; Morgan, 2009; Boulahbel *et al.*, 2015; Bendjazia *et al*., 2016). L'azadirachtine semble agir, également, sur le système nerveux central chez *Drosophila melanogaster* (Qiao *et al.,* 2014) et sur l'expression des gènes chez la même espèce (Lai *et al.,* 2014) mais aussi chez

*Plodia interpunctella* (Lynn *et al.,* 2012). Différents effets de l'azadirachtine ont été cités mais le mécanisme d'action de ce pesticide reste encore à établir (Wang *et al.,* 2014).

Le Spinosad, lactone macrocyclique, provient de la fermentation d'une bactérie Actinomycète *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz & Yao, 1990); il est composé de deux métabolites biologiquement actifs les spinosynes A et D. Ce pesticide, neurotoxique, présente un mode d'action unique, car il agit à la fois sur les nAChRs (Salgado, 1997; Kirst, 2010 ; Rinkevich & Scott, 2012) et sur les récepteurs gabaergiques ou GABARs (Ishaaya, 2001; Salgado & Sparks, 2005; Osorio *et al.,* 2008). Le Spinosad se lie aux nAChRs (Fig. 1) mais à des sites distincts sur le récepteur par rapport aux néonicotinoides (Blacquière *et al.,* 2012 ; Rinkevich et Scott, 2012; Somers *et al*., 2017). Ce pesticide agit par contact ou ingestion et est très efficace contre de nombreux insectes nuisibles particulièrement, les Lépidoptères (Sheikh, 2015; Bhatta *et al*., 2016 , Reddy & Antwi, 2016), les Diptères (Su *et al.,* 2014; Andreazza *et al* .,2016; Nozad-Bonab *et al*., 2017) ou encore les Thysanoptères (Vanisree *et al*., 2017). Le Spinosad présente, comparativement aux insecticides synthétiques classiques, une faible toxicité pour l'Homme, les Mammifères et les invertébrés aquatiques (Liu *et al.,* 2000; Sarfraz *et al.,* 2005; Kirst, 2010 ; Biondi *et al.,* 2012; Cabrera-Marin *et al.*, 2016). Si la littérature note cette faible toxicité chez des organismes non visés (Duchet *et al*.,2015; Carvalho *et al*., 2013) néanmoins, aucune génotoxicité n'est observée chez les Mammifères (Saxena & Kesari, 2016). Par ailleurs, la biodégradation rapide du Spinosad (Huan *et al*., 2015;Dasenaki *et al*., 2016;Adak & Mukherjee, 2016) contribue à la préservation de l'environnement (Sarfraz *et al.,* 2005; Dua, 2009). Le Spinosad a été homologué pour être utilisé sur plus de 100 cultures et sa relative compatibilité avec de nombreux ennemis naturels (Legwaila *et al*., 2013; Cabrera-Marin, 2016; Pereira *et al.,* 2016; Ramos *et al*., 2017; de Araujo, 2017; Liburd *et al*., 2017) permet son utilisation dans un programme de gestion des

espèces nuisibles. Le Spinosad est, en outre, recommandé pour lutter contre les vecteurs d'agents pathogènes comme *Aedes aegypti* (dos Santos Dias *et al*., 2017).

Les pesticides naturels induisent, cependant, des mécanismes de résistance (Pan *et al.,* 2017; Li *et al*., 2017) à l'instar des insecticides comme les néonicotinoides (Abbas *et al.,* 2015; Kavi *etal.,* 2014 ; Matsuura & Nakamura, 2014; Somers *et al*., 2017) ou encore les IGDs (Khan *et al*., 2016). Ces processus peuvent être comportementaux (comportement différent de l'insecteen présence de l'insecticide), physiologiques (modifications au niveau de la cuticule ou modifications du métabolisme) ou encore par des modifications au niveau des cibles de l'insecticide (Zimmer *et al.,* 2016). Cependant, si aucune resistance n'est encore notée pour l'Azadirachtine (Mordue *et al.,* 2005; Wang *et al.,*2014), différents mécanismes après traitement au Spinosad ont été cités. Ainsi, chez *Tuta absoluta*, il a été mis en évidenceune résistance métabolique (Reyes *et al.,*2012) et une modification au niveau des nAChRs,site cible du Spinosad (Silva *et al*., 2016). Chez *D. melanogaster*, des modifications au niveau des sous-unités α6 des nAChRs, ont été également démontrées (Perry *et al*., 2015, Zimmer *et al*.,2016). Par ailleurs, Hojland et Kristensen(2017) ont noté que la résistance au Spinosad chez *Musca domestica* n'était pas liée à l'altération d'un seul gène mais à la modification de l'expression différentielle des gènes codant pour les enzymes métaboliques de détoxication.

En Algérie, le Spinosad est utilisée depuis 2010 dans la lutte contre le ravageur des tomates *T. absoluta*. Cependant, si une lutte raisonnée n'est pas adoptée, cet insecticide à risque réduit pour l'Homme et l'environnement peut devenir inefficace suite à l'apparition d'une résistance chez l'insecte cible. Par conséquent, la question qui se pose est de savoir comment utiliser le Spinosad dans le cadre d'une lutte intégrée en évitant l'installation de la résistance. Ainsi, il s'avère nécessaire de mieux comprendre l'induction ou la mise en place de ce processus afin de prévoir une stratégie de rotation du spinosad permettant de retarder ou de réduire, chez l'insecte, l'expression de la résistance. Dans cette optique, il convient donc,

tout d'abord, d'établir la possible rémanence du Spinosad en mettant en évidence les effets différés du spinosad qui restent encore méconnus.

Les effets différés du spinosad seront précisés chez *D. melanogaster,* modèle biologique de référence dans les études de toxicologie. Le choix de *D. melanogaster* peut aussi se justifier par le fait que ce modèle correspond à une espèce non visée; en outre, des travaux récents montrent que le spinosad pourrait être une alternative à la gestion de *Drosophila suzukii* Matsumara, 1931 (Andreazza *et al.,* 2016) espèce invasive, originaire d'Asie. Cette espèce cause des pertes estimées à des millions de dollars dans les zones envahies qui sont l'Europe, l'Amérique du Sud, les États-Unis et le Canada (Asplen *et al.,* 2015). Les plantes attaquées sont très variées et incluent les fruits à noyaux (cerise, abricot, pêche …etc), les petits fruits rouges (fraise, framboise…etc), mais aussi la figue, la tomate et le raisin (Orhan *et al*., 2016; Leach *et al.,* 2016).

La recherche de la rémanence du Spinosad chez *D.melanogaster* implique la mise en évidence des effets différés du pesticide sur les stades qui suivent le traitement mais aussi sur les générations suivantes. Aussi, l'objectif de ce travail est d'évaluer, après traitement des larves de dernier stade de *D.melanogaster*, les effets différés du spinosad à différents stades de développement (larves, pupes et adultes) et ce, au cours de deux générations successives: la génération parent (G0) et la première génération (G1). La physiotoxicité du pesticide a été évaluée sur tous les points suivantset qui constituent les différentes parties de cette thèse :

**1. Biomarqueurs enzymatiques**: La compréhension des altérations enzymatiques, induites par l'exposition aux pesticides, peut contribuer à orienter les organismes décideurs, vers un choix raisonné des molécules (Frasco & Guilhermino, 2002; Konus 2015). En effet, les altérations enzymatiques sont d'excellents indicateurs d'impact du pesticide et peuvent mettre en évidence l'importance du stress toxique. Ainsi, les activités spécifiques d'une sélection d'enzymes clés ont été précisées:les Glutathion S-transférases (GSTs) et la Catalase

(CAT) de par leur rôle respectif dans l'induction du mécanisme de détoxication (Yalcin *et al*., 2015) et du stress oxydatif (Livingstone, 2001,Chakrabarti *et al* .,2015**,** Yalcin, 2015; Konus 2015). L'Acéthylcholinesterase ou AChE, site non cible du Spinosad, a été également évaluée de par les résultats différents qui sont notés dans la littérature (Rabea*et al*., 2009; Maïza *et al*., 2013; Benchaabane *et al*., 2016).

**2. Principaux métabolites corporels**: Les principaux métabolites (glucides, lipides et protéines) sont synthétisés dans les corps gras, connus comme étant des sites de réserves d'énergie et de régulation nutritionnelle (Zhang &Yongmei, 2014). Ces métabolites sont souvent utilisés comme marqueurs dans l'évaluation de la «Fitness» des organismes; en effet, les variations dans les réserves d'énergie indiquent une altération fonctionnelle et la sensibilité de l'insecte à l'insecticide (Piri *et al*., 2014).

**3. Vitellogénines:** La variabilité dans les réserves énergétiques peut induire un impact sur le processus de reproduction et notamment sur la vitellogénèse (Thompson, 1991) et les vitellogenines constituent un excellent paramètre de reprotoxicité. L'évaluation des vitellogénines chez *D.melanogaster* s'effectuera dans les deux sites de synthèse connus: corps gras et ovaires (Swevers *et al.,* 2005).

**4. Toxicité:** Une étude de toxicité a été réalisée, au préalable, afin de déterminer les différentes doses létales (DL) du Spinosad et de préciser la dose à tester pour les différentes expérimentations sus-citées.

Par conséquent, les résultats de cette partie seront présentés en premier.

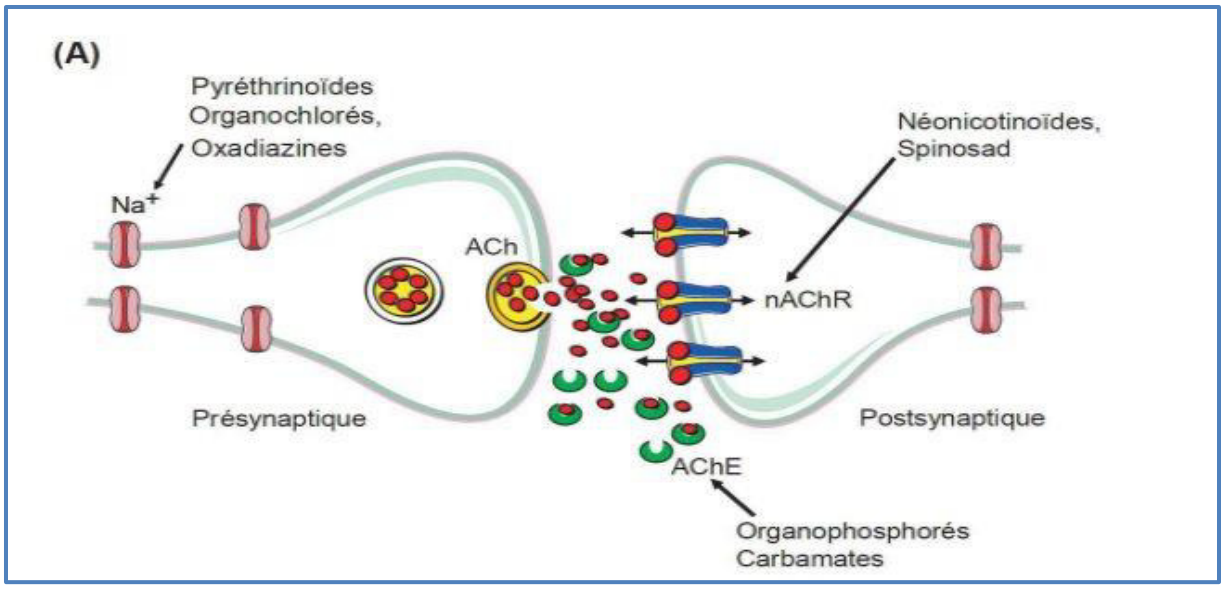


**Figure 1**. Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides (Raymond-Delpech *et al* ., 2005).

ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase; nAChR:récepteurs cholinergiques de type nicotinique ; Na : canal sodium

# MATERIEL
# &
# METHODES

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Présentation du matériel biologique

*Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) est un insecte Diptère Brachycère, hygrophile et lucicole, appartenant à la famille des Drosophilidae. *D. melanogaster* est une petite mouche jaune brunâtre mesurant environ 3 ou 4 mm de long, ailes incluses (Fig.2). L'abdomen, plutôt court, est rayé de bandes sombres et un dimorphisme sexuel (Parvathi *et al.*, 2009) permet de différencier les mâles et les femelles. L'extrémité abdominale est foncée et arrondie chez le mâle mais plus claire et pointue chez la femelle (Fig. 2 A, 2 B). Le mâle se distingue aussi par sa plus petite taille et par la présence de« peignes sexuels ». (Fig.2 C) sur ses pattes avant.

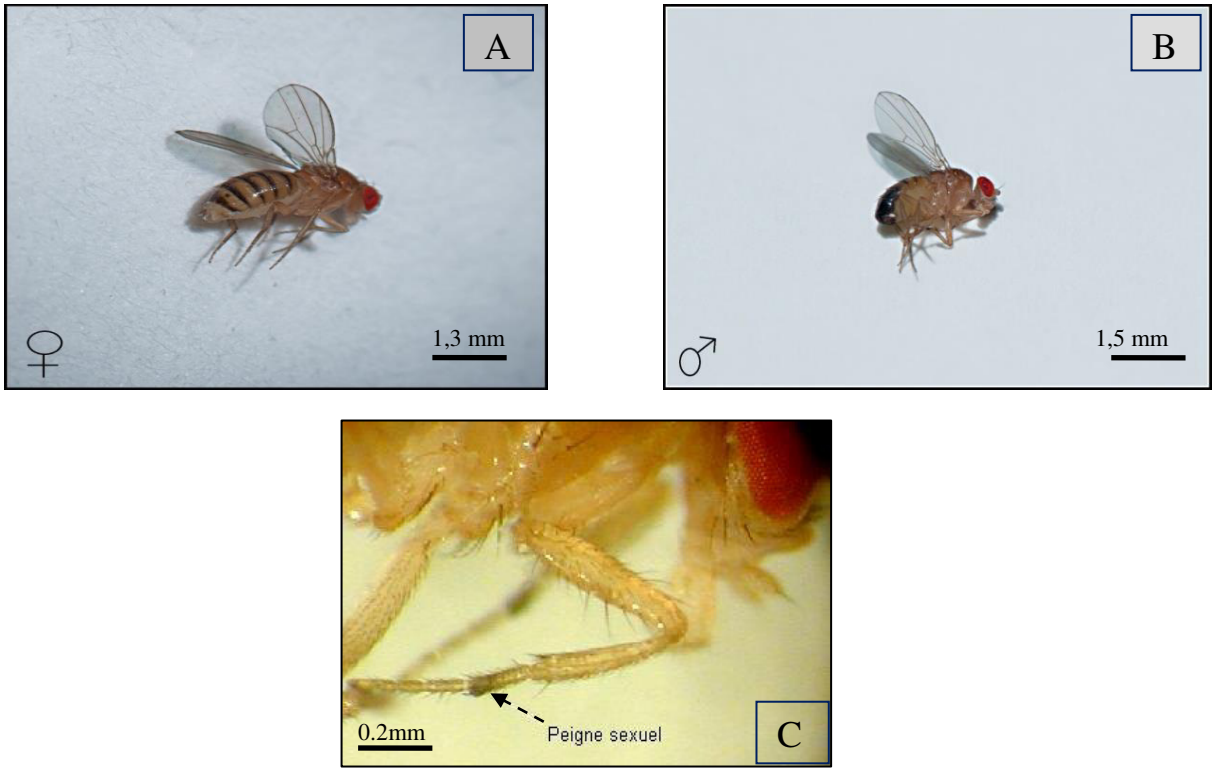


**Figure 2.** *Drosophila melanogaster*:**A**: femelle; **B**: mâle; **C**: peignes sexuels.
**Photo C**:www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/images/drospatf.

### 1.2. Cycle de vie de *D. melanogaster*

*D. melanogaster* se reproduit très rapidement et sans interruption. 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 comprend 4 stades (Fig. 3).

**Stade oeufs:** la femelle pond de 200 à 300 oeufs (Goudey-Perrière & Perrière, 1974), allongés et blanchâtres (25 à 35 par jour), présentant une forme semblable à un ballon de rugby (0,5 mm de long environ). Les oeufs sont déposés sur des fruits ou autres matières humides en fermentation (Tavernier & Lizeaux, 2002).

**Stade larvaire** : une trentaine d'heures après la ponte, les œufs donnent 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 environ et comprend 3 stades: L1 (24h) L2 (24h) et L3 (48h). A la fin de ce dernier stade, l'empupement débute; en effet, les larves cessent de s'alimenter et sortent du milieu nutritif.L'animal voit sa taille se réduire par le jeu de la contraction des muscles longitudinaux et de la cuticule elle-même conduisant à un raccourcissement de la plupart des segments prothoraciques et à l'invagination de la tête (Fraenkel & Bhaskaran, 1973). Dans le même temps, le diamètre de l'animal augmente. Parallèlement à cela, l'animal secrète la glue (sorte de colle) synthétisée par les glandes salivaires qui va lui permettre de se fixer solidement au milieu. La cuticule de l'animal se durcit pour former le puparium en forme de tonneau à la surface lisse qui va passer d'une couleur blanche à une coloration brunâtre (Zdarek&Fraenkel, 1972). La drosophile se trouve alors dans **le stade prépupal** et va subir de très importantes modifications morphologiques.

**Stade pupal**: Le stade pupal ou stade pupe phanérocéphalique débute environ 12 heures après l'empupement et après éversion de la tête (le sac imaginal de la tête est éverté tandis que les pièces buccales de la larve sont expulsées). A ce moment, les pattes mais aussi les ailes

vont terminer leur complète extension. La période pupale dure 3 jours et demi environ et à son terme, toutes les structures larvaires sont détruites et les structures adultes élaborées (Quinn *et al.,* 2012).

**Stade adulte** : l'adulte apparait avec un corps non encore pigmenté mais au bout de 6 à 8 heures la pigmentation est achevée et les ailes sont gonflées. Les adultes sont alors sexuellement matures. Les femelles sont fécondables et s'accouplent environ 12 heures après l'émergence (Bouharmont*et al.,* 2007). Elles stockent le sperme des mâles auxquels elles se sont accouplées pour pouvoir l'utiliser ultérieurement et commencent à pondre dès 24 heures après l'émergence (Tavernier & Lizeaux, 2002).

### 1.3 Elevage au laboratoire

L'élevage de drosophiles s'effectue, en laboratoire, depuis le début du vingtième siècle, suite aux travaux pionniers de Sturtevant (1913) qui a établi la première cartographie génétique. L'élevage de *D. melanogaster* (souche Canton S*) est réalisé, en laboratoire (Fig.4), 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 defarine de maïs et de levure de bière. Il est composé essentiellement de 33,3 g semoule demaïs, 33,3 g de levure de bière, 4,8 g d'agar-agar, et 20 ml d'antifongique (methyl-hydroxy-4-benzoate à 10%). Les drosophiles sont élevées dans des flacons en plastique qui sont fermés à leur extrémité par un tampon de mousse.

**La souche de D. melanogaster a été fournie gracieusement en 2006 par Mme C. Wicker-Thomas, Laboratoire Evolution, Génomes, Comportements, Ecologie, UMR 9191, CNRS, IRD, Université Paris-Sud et Université Paris-Saclay,).*

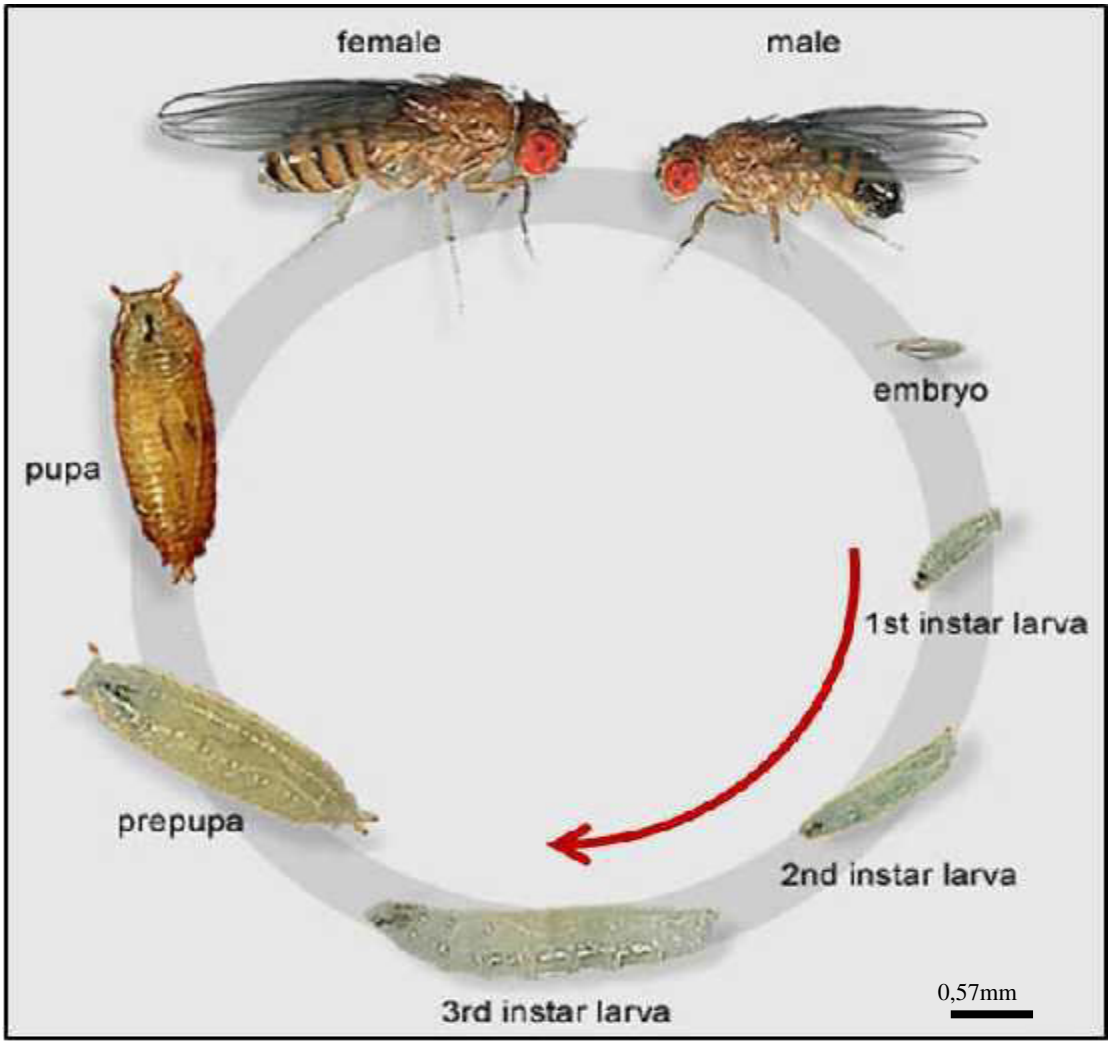


**Figure 3.** Le cycle de vie de *D. melanogaster* à 25°C (Jouandin, 2013).

**Figure 4.** Elevage de *D. melanogaster*au laboratoire. (Souche Canton S)

## 2. Présentation de l'insecticide

Le Spinosad découvert dans la nature, est issu de la fermentation d'une bactérie, *Saccharopolyspora spinosa*.

Le Spinosad est composé de deux Spinosynes(Fig.5), la Spinosyne A ($C_{41}$ $H_{65}$ $NO_{10}$) avec un poids moléculaire de 731,98 g/mol) et la Spinosyne D ($C_{42}$ $H_{67}$ $NO_{10}$) avec un poids moléculaire de 746,0 g/mol).

La formulation utilisée est Success 480 SC qui est commercialisée par Dow Agro Sciences, Indianapolis, USA (SC: suspension concentrée à 480g/l « Tracer »). D'autres formulations ont été développées, commercialisées et évaluées (Souza *et al*., 2017).

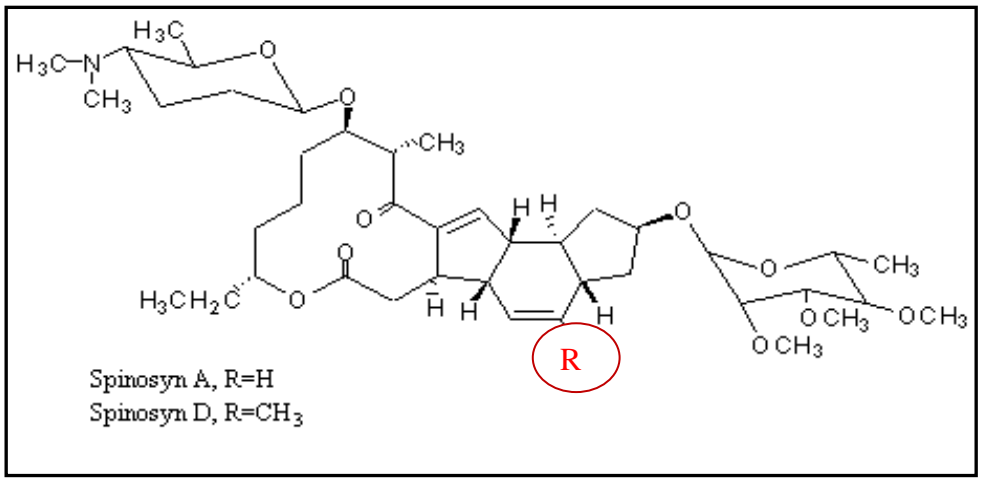


**Figure 5.** Structure chimique du Spinosad (Ishaaya& Horowitz, 1998)

## 3. Traitement des insectes et tests de toxicité

La formulation commerciale du Spinosad a été utilisée, par application topique sur des larves du dernier stade de *D.melanogaster.* Le Spinosad a été dilué dans l'acétone et après un screening préalable, différentes doses de 30, 60, 120, 240, 2400, 6000 ng ont été testées.L'essai pour chaque dose est conduit en utilisant 3 réplications comportant chacune 30 insectes. Une quantité de 1µl par insecte (Di Prisco *et al.,* 2013) est appliquée sur les larves des séries traitées mais les témoins reçoivent seulement le solvant. Cette série d'expérience a été menée afin de caractériser la toxicité du Spinosad à l'égard de *D.melanogaster* en déterminant les doses correspondant à une inhibition de 50 et 90% de la mue nymphale nommées ensuite $DI_{50}$ et $DI_{90}$ respectivement.

Les pourcentages d'inhibition observée pour les séries témoins et traitées, ont été obtenus à partir des mues nymphales incomplètes, des larves mortes ou bloquées dans leur exuvie. Ces valeurs sont ensuite corrigées selon Abott (1925) afin d'éliminer la mortalité naturelle et / ou l'inhibition de la mue nymphale. Les pourcentages d'inhibition corrigées, après transformation angulaire (Fisher et Yates, 1957) subissent une analyse de variance suivie du test HSD de Tukey afin d'établir l'effet du pesticide puis le classement des doses.

Enfin la régression non linéaire, exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose, a permis d'estimer, les doses d'inhibition $DI_{50}$ et $DI_{90}$ avec leurs intervalles de confiance (95% FL).

Pour toutes les expérimentations, le traitement a été réalisé à la $DI_{50}$ d'inhibition de la mue nymphale. L'échantillonnage a été réalisé sur les individus ayant survécu au traitement des larves et a été menée sur deux générations successives: la génération parent (G0) et sa descendance génération 1 (ou G1) à différents stades de développement.

## 4. Extraction et dosage des métabolites

### 4.1. Extraction des métabolites

L'extraction des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al*. (1966) à partir des corps entiers des larves, pupes et adultes desséries témoins et traitées de la G0 et la G1 de *D.melanogaster*. Les échantillons prélevés à différents âges pour chaque stade de développement sont conservés dans 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20% jusqu'au dosage.Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes (100 µl) et les teneurs dans les différents métabolites ont été quantifiées par des droites de régression déterminées à partir des courbes de références.

### 4.2. Dosage des métabolites

***Dosage des protéines***

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de coomassie[1] (G250) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA).comme standard (1mg/ml)(Tab.1).La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm (Fig. 6).

1- 100 mg de BBC + 50 ml d'éthanol + Agitation pendant deux heures + 100 ml d'acide ortho-phosphorique à 80% + eau distillée q.s.p. 1000 ml.

**Tableau 1.** Dosage des protéines: réalisation de la gamme d'étalonnage

| BSA (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Quantité d'albumine (µg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Réactif BBC (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

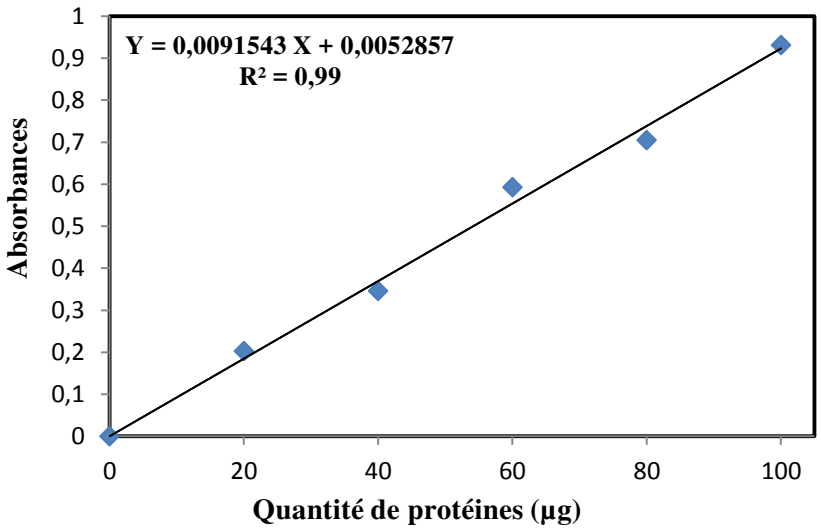


**Figure 6.** Dosage des protéines du corps: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité de protéines (µg).

***Dosage des glucides***

Le dosage des glucides a été réalisé selon Duchateau et Florkin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone[1] comme réactif et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard (Tab.2). La lecture des absorbances est réalisée à 620 nm (Fig.7).

1-150 mg d'anthrone + 75 ml d'acide sulfurique + 25 ml d'eau distillée

**Tableau 2.** Dosage des glucides: réalisation de la gamme d'étalonnage

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Glucose (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Quantité de glucose (µg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Anthrone (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

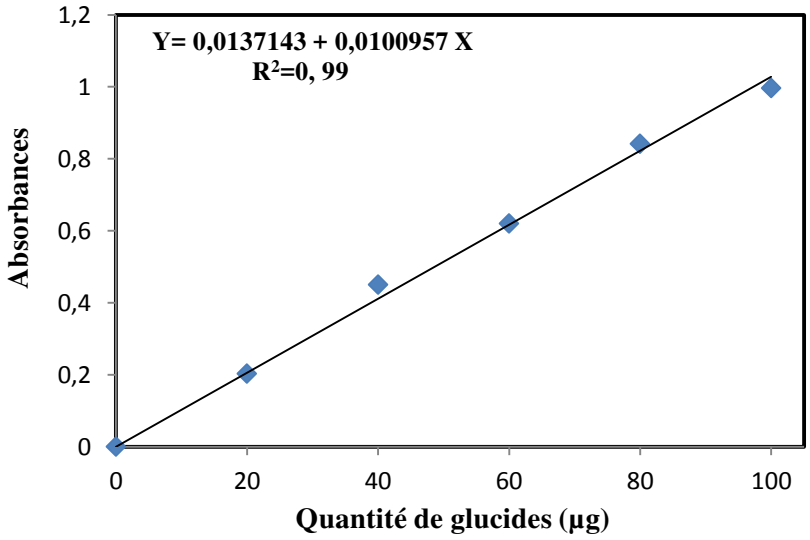


**Figure 7.** Dosage des glucides: droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose (µg).

***Dosage des lipides***

Les lipides ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy*et al.,* (1972) utilisant la vanilline[1] comme réactif et une solution mère de lipides[2] (2,5mg/ml) comme standard (Tab. 3). Les absorbances sont lues, après 30 minutes d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm (Fig.8).

1- 0,38 g de vanilline + 55 ml d'eau distillée + 195 ml d'acide ortho-phosphorique à 85%

2- 25 mg d'huile de table + 10 ml de solvant éther/chloroforme (V/V).

**Tableau 3.** Dosage des lipides: réalisation de la gamme d'étalonnage**.**

| Solution mère de lipides (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Quantité de lipides (µg) | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Solvant Ether-chloroforme (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Vanilline (ml) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

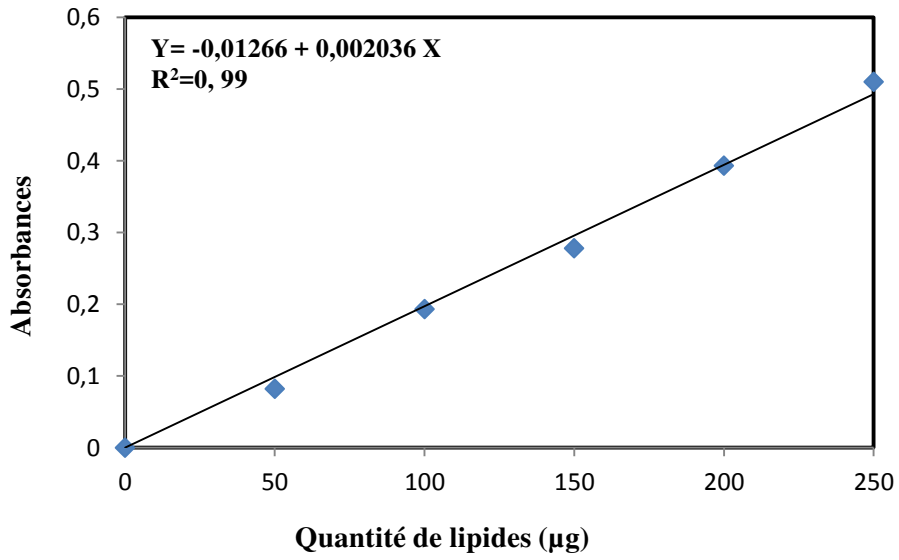


**Figure 8.** Dosage des lipides du corps: droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table (µg).

## 5. Dosage de la catalase (CAT)

Le dosage de la catalase (CAT), réalisé selon la méthode de Claiborne (1985), a permis l'évaluation de l'activité spécifique de cette enzyme. Cette méthode est basée sur la mesure spectrophotométrique de la réduction de l'eau oxygénée ($H_2O_2$) en une molécule d'oxygène ($O_2$) et deux molécules d'eau ($H_2O$) en présence de la CAT à une longueur d'onde UV de 240 nm. Les séries témoins et traitées de *D.melanogaster*, échantillonnées à différents âges pour

tous les stades de développement, sont homogénéisés dans 1ml de tampon phosphate[1] (0,1 M, pH7, 4) à l'aide d'un broyeur à ultrasons. L'homogénat, ainsi obtenu, est centrifugé (15,000 tours /min, pendant 10 min) puis le surnageant récupéré servira au dosage de la catalase. Le dosage s'effectue, à température ambiante, sur une fraction aliquote de 50 µl de surnageant à laquelle on ajoute 750 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) et 200 µl $H_2O_2$ (500 mM) préparé extemporanément [1,42 ml eau oxygénée à 30 volumes, 25 ml tampon phosphate (100 mM pH 7,4)]. Après agitation, la lecture est effectuée au spectrophotomètre (dans une cuve en quartz). La lecture des absorbances est effectuée après 15 secondes toutes les 5 secondes pendant 30 secondes à une longueur d'onde UV de 240 nm contre un blanc réalisé avec 800 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) et 200 µl de $H_2O_2$. L'activité décroit rapidement, il est donc important de mettre toujours le même temps entre le pipetage du surnageant et le moment où la cuve est placée dans spectrophotomètre.

L'activité spécifique de la CAT est déterminée d'après la formule suivante:

$$\textbf{CAT (mMoles/min/mg protéines)} = \frac{\textbf{Lmax – Lmin}}{\textbf{0.04}} \textbf{/ mg protéines}$$

Dans nos résultats, l'activité spécifique est exprimée en µMol/min/mg de protéines.

**L max**: Densité optique maximale enregistrée

**L min**: Densité optique minimale enregistrée

**0.040 $cm^{-1}$. $mMole^{-1}$** : coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée (à 240 nm).

**Mg de protéines:** La quantité de protéines totales préalablement déterminée, par un dosage selon la technique de Bradford (1976) explicitée plus haut.

1- 16,11 g Na2 HPO4 (a) dilue dans 500ml d'eau distillée. 1,38 g NaHPO4 (b) dilue dans 500ml d'eau distillée.
Mélanger 404 ml de la solution a avec 95,5 ml de la solution b

## 6. Dosage de l'acétylcholinestérase(AChE)

Le dosage de l'activité de l'AChE a été mené selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) qui consiste à fournir à l'enzyme (AChE) un substrat artificiel, l'acétylthiocholine[1](ASCh) qui

sera hydrolysé en acide acétique et thiocholine (SCh). Cette dernière en présence de DTNB[2] (acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoique) donne un produit jaune le TNB (acide 5-thio-2 nitrobenzoïque) que l'on dose à une longueur d'onde de 412nm.

Les têtes de *D.melanogaster* (pool de trois têtes) des séries témoins et traitées sont homogénéisées dans 1 ml de solution détergente [3]. L'homogénat est centrifugé à une vitesse de 5000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant est récupéré pour servir comme source d'enzyme. Le dosage de l'activité de l'AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 µl auquel on ajoute 100 µl de DTNB préparé extemporanément. Après 3 à 5 minutes de repos nécessaire pour épuiser la réaction spontanée, 100 µl de substrat acétylthiocholine sont ajoutés. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 minutes pendant 20 minutes à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc de gamme où 100 µl de la solution détergente remplacent la source d'enzyme.

L'activité spécifique est déterminée selon la formule suivante

$$\textbf{AChE (M/min/mg de protéines)} = \frac{\Delta\ \textbf{DO/mn}}{\textbf{1,36 x } 10^{4}} \ \textbf{X}\ \frac{\textbf{Vt}}{\textbf{Vs}}\ \textbf{/ mg de protéines}$$

Dans nos résultats, l'activité spécifique est exprimée en µM/min/mg de protéines.

**Δ DO :** pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.
**1,36 x 104 (M-1 cm-1):** coefficient d'extinction molaire du DTNB.
**Vt:** volume total de la cuve : 1,3 ml [0,1 ml homogénat + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 ml d'acétylthiocholine].
**Vs :** volume du surnageant dans la cuve: 0,1 ml.
**Mg de protéines:** La quantité de protéines totales préalablement déterminée par un dosage selon la technique de Bradford (1976) explicitée plus haut.

1- 23,6 mg acéthylthiocholine + 1 ml eau distillée.
2- 39,6 mg DTNB + 15 mg $CO_3HNa$ dans 10 ml tampon Tris (0,1 M, pH 7).
3- solution détergente: 38,03 mg d'EGTA + triton X 100% + 5,845g Nacl + tampon tris (10 mM;pH 7) 80ml

## 7. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs)

Le dosage des GSTs est réalisé selon Habig *et al.* (1974). Il consiste à fournir aux GSTs des substrats artificiels en général la GSH (Glutathion réduit, 5 mM) et le CDNB (1choloro 2-4-Dinitrobenzoique, 1mM). La réaction de conjugaison entraine la formation d'une molécule nouvelle, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm.Les insectes décapités sont homogénéisés dans 1ml de tampon phosphate de sodium [1] (0,1M, pH 6) à l'aide d'unbroyeur à ultrasons. L'homogénat obtenu est centrifugé (1300 tours/min pendant 30 min) et le surnageant récupéré servira au dosage enzymatique des GSTs. Le protocole de dosage est réalisé comme suit: A une fraction aliquote du surnageant (0,2 ml) est ajouté 1,2 ml du mélange[2]CDNB-GSHdans un tampon phosphate (0,1M; pH6). La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions (0,2 ml d'eau distillée remplaçant le surnageant); les densités optiques sont mesurées toutes les minutes pendant 5 minutes à 340 nm dans un spectrophotomètre contre un blanc contenant 0,2 ml d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant. L'activité spécifique des GSTs est déterminée d'après la formule suivante:

$$\textbf{GSTs (mMol/ min / mg)} = \frac{\Delta\ \textbf{DO}}{\textbf{9,6}} \times \frac{\textbf{Vt}}{\textbf{Vs}} \textbf{ / mg de protéines}$$

Dans nos résultats, l'activité spécifique est exprimée en µMol/min/mg de protéines.

**Δ DO**: Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.
**Vt**: Volume totale de la cuve: 1,4 ml [1,2 ml du mélange CDNB/GSH + 0,2ml dusurnageant].
**9,6mMol-1 Cm-1**: coefficient d'extinction molaire du CDNB (à 340 nm).
**Vs**: volume du surnageant dans la cuve: 0,2 ml.
**Mg de protéines:** La quantité de protéines totales préalablement déterminée par un dosage selon la technique de Bradford (1976) explicitée plus haut.

1-17,805g Na2 HPO4 (**a**) diluée dans 500ml d'eau distillée 6,39g NaHPO4 (**b**) dilué dans 500ml d'eau distillée.
61,5 ml de la solution a et 438,5 ml de la solution b et ajouter 21,3925 g de saccharose.
2-4,052 mg de CDNB avec la solution **a** et 30,73 mg de GSH + 0,8 ml d'éthanol et 20 ml de tampon phosphate

## 8. Evaluation des vitellogénines

Les adultes femelles de *D. melanogaster,* provenant des séries témoins et traitées au Spinosad ($Dl_{50}$), sont échantillonnés à différents temps (6, 12, 18 et 24 heures) au cours du premier cycle gonadotrophique. Le corps gras et les ovaires, prélevés sous loupe binoculaire, sont préalablement pesés puis déposés dans des tubes contenant un tampon (Tris-HCl-NaCl) permettant l'extraction des vitellogenines. La conservation se fait à -20°C jusqu'au dosage. L'extraction des vitellogenines dans le corps gras et les ovaires est réalisée selon la méthode de Postlethwait *et al.* (1980) et Fabre et *al.* (1990). Les échantillons biologiques, conservés dans 500 µl de tampon d'extraction Tris-HCl-NaCl[1] (pH 7,4; 0,5 M), sont broyés aux ultrasons puis l'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 5000 trs/min pendant 10minutes. La fraction obtenue est récupérée puis déposée dans un tube eppendorf. Les échantillons sont ensuite conservés au froid (-20°C) jusqu'au dosage. Les vitellogénines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de boeuf (1mg/ml) comme standard. Le dosage des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires 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.

1 - 3,02 g Tris (0.5 M) dans 300 ml d'eau distillée et ajuster à ph 7,4 avec HCL (a).
2.9 g de NaCL (0.5 M) dans 10 ml de la solution (a) et compléter a 100 ml d'eau distillée.

## 9. Analyse statistique

Tous les résultats sont représentés par les moyennes (m) suivies de l'écart type (s.d) du nombre de répétitions (n). La condition de normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées par les tests respectifs de Shapiro Wilk et de Bartlett. Les données de toxicité ont été analysées en utilisant la régression non linéaire et l'activité insecticide du traitement a été évaluée sur la base des concentrations dose-réponse. La qualité de l'ajustement du modèle de courbe a été évaluée sur la base des valeurs de $R^2$. Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse de variance suivie d'un test HSD de Tukey (Honest Significative Difference) pour le classement des doses. Pour tous les paramètres testés, les différences significatives entre les séries témoins et traitées, pour chaque âge et chaque stade de la même génération ont été déterminées en utilisant le test "t"de Student. Ce test a également été utilisé pour comparer les valeurs pour un même âge entre les deux générations. Les différences significatives entre les générations ont été ensuite été confirmées par l'analyse de variance à 2 critères de classification (ANOVA). Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant Graph Pad Prism la version 6.01 pour le logiciel Windows (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com).

# *RESULTATS*

# RESULTATS

## 1. Evaluation de la toxicité du Spinosad chez *D.melanogaster*

L'application topique du Spinosad, à différentes doses (30, 60, 120, 240, 2400, 6000 ng), chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster*, induit une inhibition de la mue nymphale (Fig.9). Les résultats révèlent, chez les séries témoins, un pourcentage d'inhibition naturelle de l'ordre de 8,30 ± 1,70 qui augmente en fonction de la dose de Spinosad chez les séries traitées. En effet, pour cette série, les pourcentages de l'inhibition observée de la mue nymphale varient de 16,66 ± 5,77 à la dose la plus faible à 96,66 ± 0,57 à la dose la plus élevée.

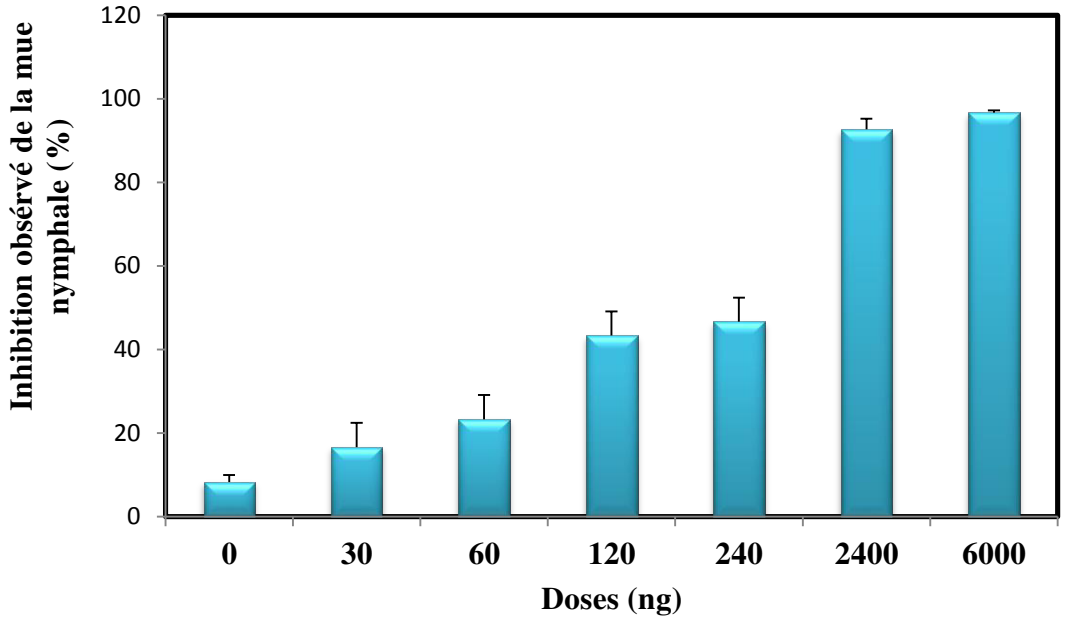


**Figure 9.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* sur l'inhibition observée (%) de la mue nymphale (m ± sd; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

Les pourcentages de l'inhibition corrigée de la mue nymphale **(Tab.4)** correspondant à l'effet seul du pesticide (soustraction de l'effet de l'inhibition naturelle) ont été ensuite précisés; ces valeurs sont de l'ordre de 10,37 ± 0,64 à la dose la plus faible (30 ng) puis augmentent, graduellement pour atteindre une valeur de 95,05 ± 1,41 à la dose la plus élevée (6000 ng).

**Tableau 4.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster*: inhibition corrigée (%) de la mue nymphale (m ± sd; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

| Répétitions | 30 | 60 | 120 | 240 | 2400 | 6000 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **R1** | 11,11 | 14,11 | 40 | 50 | 90 | 96,66 |
| **R2** | 10 | 22,22 | 33,33 | 33,33 | 88 | 94,50 |
| **R3** | 10 | 10 | 37,50 | 44,44 | 87 | 94 |
| **m ± sd** | **10,37 ± 0,64** | **14,44 ±6,76** | **36,94 ± 3,37** | **42,59 ± 8,49** | **88,33 ± 1,53** | **95,05 ± 1,41** |

L'analyse statistique des résultats, présentée dans le **tableau 5,** révèle une différence hautement significative (p <0,001) démontrant une toxicité du Spinosad avec une relation dose réponse. En effet, le classement des doses réalisé, grâce au test HSD de Tukey, révèle l'existence de 3 groupes présentant des effets différents du pesticide sur l'inhibition de la mue nymphale. La **figure 10** met en évidence le classement des doses en fonction de leur toxicité.

**Tableau 5.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* sur l'inhibition de la mue nymphale (%): Analyse de la variance à un critère de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Traitement** | 9387,10 | 5 | 1877,40 | 76,15 | **p < 0,001***** |
| **Erreur résiduelle** | 295,90 | 12 | 24,70 | - | - |
| **Total** | 9682,90 | 17 | - | - | - |

*** : 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.

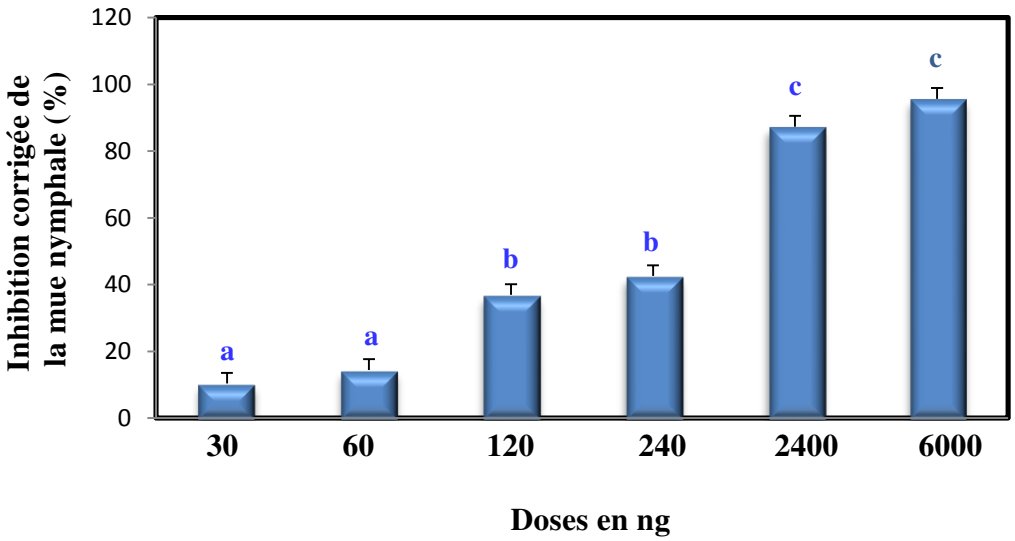


**Figure 10.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique à différentes doses (ng) chez les larves de dernier stade de *D. melanogaster* : Inhibition corrigée (%) de la mue nymphale et classement des doses testées par le test HSD de Tukey ($p<0,001$).

La détermination des doses d'inhibition 50 et 90 ($DI_{50}$ et $DI_{90}$) a ensuite été effectuée grâce à une régression non linéaire. Cette analyse a permis, grâce à la courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose du Spinosad, de préciser un coefficient de détermination élevé ($R^2=0,98$) qui révèlent une liaison très forte entre le pourcentage d'inhibition corrigé et la dose.

Les $DI_{50}$ et $DI_{90}$ déterminées avec leur intervalle de confiance, présentées dans le **tableau 6** sont de l'ordre de 288,50 et 2963 ng respectivement.

**Tableau 6.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster:* Détermination des doses d'inhibition de la mue nymphale (DI en ng) et leurs intervalles de confiance à 95%.

| | **$DI_{50}$** | **$DI_{90}$** | **Hill Slope** | **$R^2$** |
|---|---|---|---|---|
| **Spinosad** | 288,50 [204,30 - 407,50] | 2963 [1227 - 7156] | 0,94 [0,66- 1,21] | 0,98 |

## 2. Effets du Spinosad sur les biomarqueurs enzymatiques

Le Spinosad administré *in vivo*, par application topique, ($DI_{50}$: 288, 50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* a été évalué sur l'activité spécifique des GSTs, de la CATet de l'AChE au cours des différents stades de développement chez les deux générations successives. Les résultats sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéines (µM/min/mg de protéines).

### 2.1. Effets sur l'activité spécifique des GSTs chez la G0 et la G1

#### 2.1.1. Effets chez les pupes de la G0

Le Spinosad, appliqué chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster*, entraîne une augmentation de l'activité spécifique des GSTs **(Tab.7)** chez les séries traitées comparativement aux séries témoins; cette augmentation est observée chez les pupes nouvellement exuviées ($t_6$ = 7,34; p = 0,002) et celles âgées de 3 jours ($t_6$ = 5,36; p = 0,003). Le Spinosad semble donc induire un processus de détoxication dès 24 heures. Il est noté, également, une différence significative entre les âges aussi bien pour la série témoin que pour la série traitée (p = 0,001).

**Tableau 7.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| **Pupes (jours)** | **Génération 0** | |
|---|---|---|
| | **Témoins** | **Traités** |
| **0** | 67,39 ± 2,40 **a** **A** | 106,70 ± 4,80 **b** **A** |
| **3** | 40,96 ± 2,60 **a** **B** | 62,60 ± 3,10 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %)

### 2.1.2. Effets chez les adultes de la G0

L'activité spécifique des GSTs montre des différences significatives chez les adultes de *D.melanogaster* après traitement des larves au Spinosad **(Tab.8)**. Les valeurs des GSTs augmentent, comparativement à la série témoin, le jour de l'exuviation (jour 0; $t_6$ = 4,38; p = 0,012) mais aussi au jour 7 de la vie adulte ($t_6$ = 3,27; p = 0,031). Par ailleurs, la comparaison entre les âges pour une même série indique une diminution dans les valeurs des GSTs chez les séries traitées (p =0,007) mais aussi chez les séries témoins (p = 0,011).

**Tableau 8.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique, ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM /min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 76,71 ± 3,30 **a** **A** | 94,91 ± 2,74 **b** **A** |
| **7** | 60,24 ± 1,60 **a** **B** | 72,75 ± 3,50 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.1.3. Effets chez les larves de la G1

L'activité spécifique des GSTs, chez les larves de la génération 1 de *D. melanogaster* après traitement des larves de la génération parent **(Tab.9)**, révèle une augmentation significative comparativement aux témoins (L3: $t_6$ = 3,95; p = 0,011).

**Tableau 9.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Larves (stade) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| **L3** | **Témoins** | **Traités** |
| | 41,18 ± 2,00 **a** | 55,52 ± 3,00 **b** |

### 2.1.4. Effets chez les pupes de la G1

Après traitement au Spinosad des larves de la génération parent de *D. melanogaster*, l'activité spécifique des GSTs présente également une augmentation chez les pupes de la G1. Cette hausse, très significative comparativement aux témoins **(Tab.10)** est retrouvée pour les deux âges évalués (jour 0: $t_6 = 26,56$; $p < 0,001$; jour 3: $t_6 = 9,77$; $p < 0,001$). Au cours du stade pupal, une diminution de l'activité des GSTs est notée entre les âges (0 et 3 jours) chez les séries témoins ($p = 0,001$) mais aussi traitées ($p < 0,001$).

**Tableau 10.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 66,60 ± 2,40 **a** **A** | 121,30 ± 5,90 **b** **A** |
| **3** | 40,73 ± 2,50 **a** **B** | 79,07 ± 3,00 **b** **B** |

●Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries ((p<5 %).

### 2.1.5. Effets chez les adultes de la G1

Les adultes de *D.melanogaster* de la G1, traités au Spinosad à la génération parent (G0), montrent des valeurs de l'activité spécifique des GSTs qui sont significativement différentes par rapport aux témoins **(Tab.11)**. Le processus de détoxication qui débute dès 24 heures après traitement est retrouvé chez les adultes à la génération suivante. Ainsi, les résultats obtenus indiquent une augmentation significative des GSTs le jour de l'exuviation adulte ($t_6 = 3,79$; $p = 0,019$) mais aussi au jour 7 après la mue imaginale ($t_6 = 2,79$; $p = 0,038$).

Il est noté, entre les âges, une diminution dans les valeurs des GSTs chez les séries traitées (p = 0,021) et témoins (p= 0,022).

**Tableau 11.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM M/min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| **Adultes (jours)** | **Génération 1** | |
|---|---|---|
| | **Témoins** | **Traités** |
| **0** | 75,86 ± 3,10 **a** **A** | 100,30 ± 5,70 **b** **A** |
| **7** | 62,27 ± 2,80 **a** **B** | 76,61 ± 4,30 **b** **B** |

●Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.1.6. Effets sur les GSTs: comparaison entre les deux générations

Après traitement au Spinosad, au cours du dernier stade larvaire de *D.melanogaster,* l'activité spécifique des GSTs augmente de manière très significative comparativement aux témoins; cette augmentation, observée dès l'exuviation pupale à la G0, est notée à tous les stades de développement et à tous les âges testés au cours des deux générations successives. La comparaison des moyennes pour un même âge entre les deux générations montre que l'induction de l'enzyme de détoxication, est plus importante à la G1 comparativement à la G0.

L'analyse de la variance à deux critères de classification **(Tab.12)** confirme ces résultats pour chaque stade ($F_{3,\ 48}$ = 117,62;p < 0,001) mais révèle également des différences hautement significatives pour l'effet génération ($F_{3,\ 48}$ = 128,95; p < 0,001), et l'interaction génération-stade ($F_{9,\ 48}$ = 13,34; p <0,001)**(Fig.11)**.

**Ces résultats révèlent donc un nouvel élément qui est l'effet différé du Spinosad au niveau de la descendance démontrée par la persistance du stress toxique et le maintien du processus de détoxication.**

**Tableau 12.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives G0 et G1: Analyse de la variance à deux critères de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 16126,60 | 3 | 5375,50 | 128,95 | **p< 0,001*** |
| **Stade** | 14709,60 | 3 | 4903,20 | 117,62 | **p< 0,001*** |
| **Interaction** | 5006,20 | 9 | 556,20 | 13,34 | **p< 0,001*** |
| **Erreur résiduelle** | 2000,90 | 48 | 41,70 | | |

*** : 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.

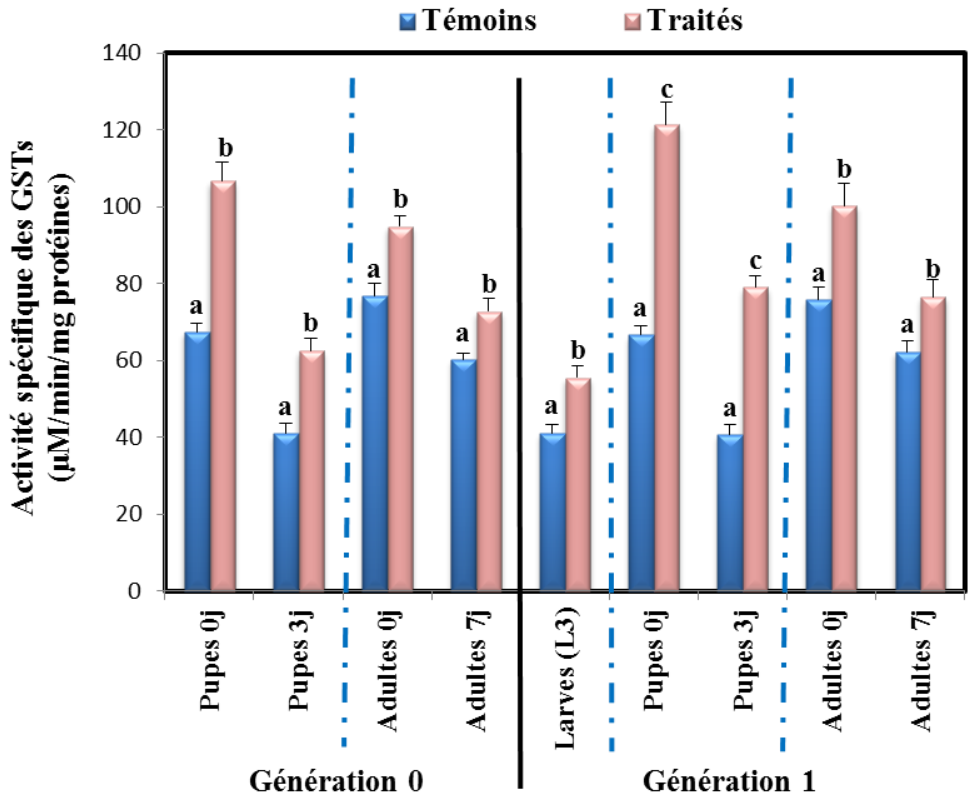


**Figure 11.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* et évalués sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3), pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives (G0 et G1) (m ± sd; n = 4 à 6). Les lettres en minuscules correspondent à l'analyse statistique pour un même âge entre les deux générations.

## 2.2. Effets sur l'activité spécifique de la CAT chez la G0 et la G1

### 2.2.1. Effets chez les pupes de la G0

Chez *D.melanogaster*, la catalase présente une activité spécifique qui augmente significativement chez les pupes traitées au Spinosad comparativement aux témoins **(Tab.13)**. Le Spinosad induit une augmentation de cette enzyme du stress oxydatif chez les pupes, le jour de l'exuviation (jour 0: $t_6$=3,3; p = 0,039) mais aussi au jour 3 du stade pupal ($t_6$= 24,50; p < 0,001). Entre les âges, il est observé également une différence très significative chez la série témoin (p = 0,001) et chez la série traitée (p = 0,003).

**Tableau 13.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 0,45 ± 0,02 **a** **A** | 0,78 ± 0,17 **b** **A** |
| **3** | 0,73 ± 0,01 **a** **B** | 1,57 ± 0,06 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.2.2. Effets chez les adultes de la G0

Les résultats obtenus, chez les adultes de *D.melanogaster,* indiquent une augmentation très significative de l'activité spécifique de la CAT entre les séries témoins et celles traitées au Spinosad **(Tab.14).** Ce résultat est observé le jour de l'émergence des adultes ($t_6$ =4,90; p = 0,008) mais aussi au jour 7 ($t_6$ = 7,83; p = 0,001). Par ailleurs, entre les deux âges évalués, les valeurs de l'activité spécifique de la CAT ne présentent aucune différence significative aussi bien chez les séries témoins (p = 0,509) que chez les séries traitées (p = 0,398).

**Tableau 14.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 0,88 ± 0,02 **a** **A** | 1,32 ± 0,08 **b** **A** |
| **7** | 0,91 ± 0,03 **a** **A** | 1,24 ± 0,01**b** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges ; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.2.3. Effets chez les larves de la G1

Le Spinosad, appliqué chez les larves du dernier stade de*D.melanogaster* de la génération parent, entraine une augmentation significative ($t_6$ =3,87; p = 0,031) de l'activité spécifique de la CAT chez les larves de la génération suivante **(Tab.15).**

**Tableau 15.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Larves (stade) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| **L3** | Témoins | Traités |
| | 0,58 ± 0,02 **a** | 0,88 ± 0,07 **b** |

### 2.2.4. Effets chez les pupes de la G1

Les résultats obtenus révèlent un stress oxydatif chez les pupes de la G1 **(Tab.16),** démontré par l'évaluation de l'activité spécifique de la CAT, qui augmente de manière significative chez les individus traités au Spinosad comparativement à ceux de la série témoin. Les valeurs de l'activité spécifique de la CAT, sont significativement plus

importantes chez les pupes nouvellement exuviées ($t_6$ = 7,01; p = 0,006) et chez celles âgées de 3 jours ($t_6$ =4,83; p = 0,008). L'analyse statistique, effectuée entre les âges d'un même stade, révèle une différence significative chez les séries témoins (p <0,001) mais aucune différence chez les traitées (p=0,339).

**Tableau 16.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| **Pupes (jours)** | **Génération 1** | |
|---|---|---|
| | **Témoins** | **Traités** |
| **0** | 0,43 ± 0,01 **a** **A** | 1,10 ± 0,02 **b** **A** |
| **3** | 0,72 ± 0,01 **a** **B** | 1,45 ± 0,15 **b** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.2.5. Effets chez les adultes de la G1

Le **tableau 17** présente les valeurs de l'activité spécifique de la CAT chez les adultes de la G1. Les résultats montrent, entre les séries témoins et celles traitées, des valeurs comparables le jour de l'émergence ($t_6$ = 2,46; p = 0,090) et le jour 7 suivant ($t_6$ = 1,09; p = 0,354). Le stress oxydatif, précisé dans à la génération parent mais aussi dans stades précédents (larves et pupes) n'est plus noté chez les adultes de la G1. La comparaison entre les âges ne révèle aucune différence significative entre 0 et 7 jours aussi bien chez les séries traitées (p = 0,687) que chez les témoins (p = 0,062).

**Tableau 17.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| 0 | 0,90 ± 0,01 **a** **A** | 1,06 ± 0,06 **a** **A** |
| 7 | 0,99 ± 0,29 **a** **A** | 1,11 ± 0,11**a** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.2.6. Effets sur la CAT: comparaison entre les deux générations

Chez *D.melanogaster*, la CAT, enzyme du stress oxydatif, présente une activité spécifique qui augmente significativement, chez les séries traitées comparativement aux témoins chez les deux générations successives **(Fig.12)**. Le profil de cette enzyme, en parfaite synergie avec celui des GSTs, révèle un stress oxydatif dès l'exuviation des pupes de la G0 à la fin du stade pupal de la génération suivante (G1). Ainsi, chez les adultes de la G1 aux jours 0 et 7, le stress oxydatif n'est plus observé et les séries traitées au Spinosad retrouvent des valeurs comparables aux témoins. La comparaison des moyennes pour un même âge entre les deux générations montre que le stress oxydatif est plus important à la G0 comparativement à la G1. L'analyse de la variance à deux critères de classification confirme ce résultat **(Tab.18).** En effet, des différences significatives sont notées pour les critères génération ($F_{3, 48}$ = 54,24, p <0,001), stade ($F_{3, 48}$ = 21,25;p <0,001) mais aussi pour l'interaction génération-stade ($F_{9, 48}$ = 7,79, p <0,001).

**L'induction de l'activité spécifique de la CAT, notée aussi avec un effet différé, est un mécanisme constituant la première étape de défense contre le stress oxydant induit par le Spinosad.**

**Tableau 18.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D .melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives G0 et G1: Analyse de la variance à deux critères de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 3,68342 | 3 | 1,22 | 54,24 | **p< 0,001***** |
| **Stade** | 1,44428 | 3 | 0,48 | 21,25 | **p< 0,001***** |
| **Interaction** | 1,5870 | 9 | 0,17 | 7,79 | **p< 0,001***** |
| **Erreur résiduelle** | 1,0865 | 48 | 0,02 | | |

*** : 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

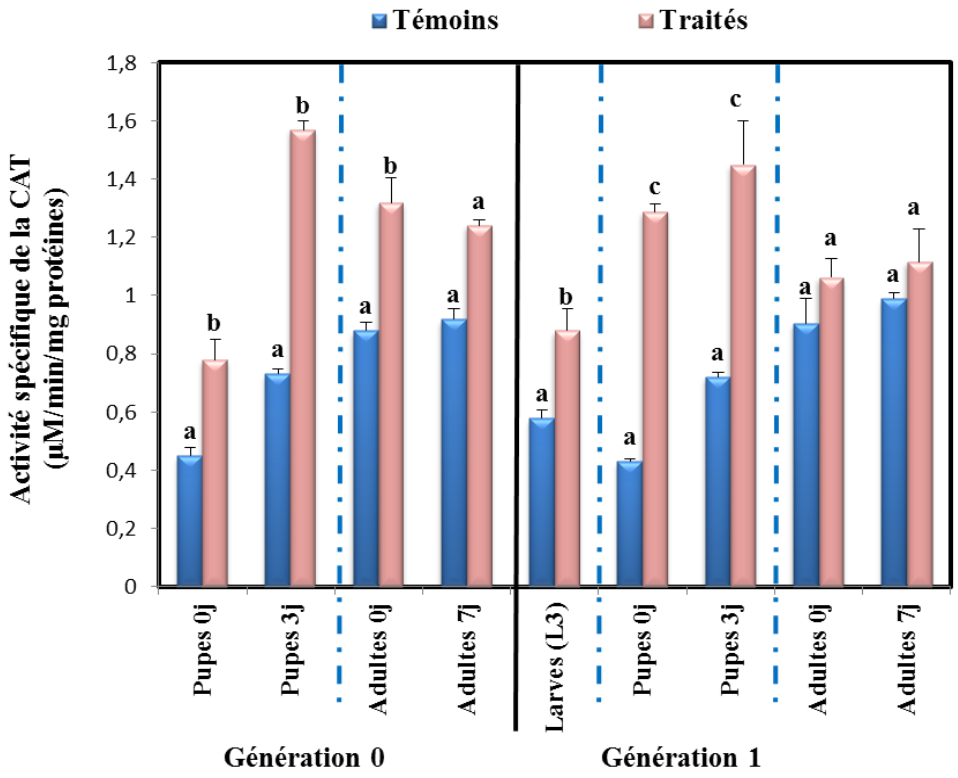


**Figure 12.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de la CAT (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3) pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives G0 et G1 (m ± sd; n = 4 à 6). Les lettres en minuscules correspondent à l'analyse statistique pour un même âge entre les deux générations.

## 2.3. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE chez la G0 et la G1

### 2.3.1. Effets chez les pupes de la G0

Les valeurs de l'activité spécifique de l'AChE, chez les pupes de *D.melanogater* traitées au Spinosad au cours du dernier stade larvaire, ne révèlent aucune différence significative par rapport aux témoins **(Tab.19)**; en effet, des valeurs comparables sont retrouvées chez les pupes nouvellement exuviées ($p = 0,386$) mais aussi chezcelles âgées de 3 jours ($p = 0,900$).

L'analyse statistique effectuée pour chaque série montre une augmentation très significative entre les âges testés chez les séries témoins ($p = 0,001$) et celles traitées ($p < 0,001$).

**Tableau 19.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3jours) de la G0 (m ± sd; n=4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 7,25 ± 0,81 **a** **A** | 6,35 ± 0,43 **a** **A** |
| **3** | 18,46 ± 0,21 **a** **B** | 18,39 ± 0,48 **a** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %)

### 2.3.2. Effets chez les adultes de la G0

Les résultats obtenus révèlent un effet du Spinosad chez les adultes de *D.melanogaster* après traitement des larves du dernier stade **(Tab.20);**en effet et, comparativement à la série témoin, l'activité spécifique de l'AChE diminue de manière significative chez les adultes nouvellement exuviés (0 j: $t_6 = 3,29$; $p = 0,022$) et ceux âgés de 7 jours ($t_6 = 3,04$ ; $p = 0,039$).

En outre, l'analyse statistique effectuée entre les deux âges du même stade montre une diminution significative chez les séries témoins et traitées (p=0,002).

**Tableau 20.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM /min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 69,78 ± 3,40 **a** **A** | 55,30 ± 2,90 **b** **A** |
| **7** | 30,43 ± 2,10 **a** **B** | 26,50 ± 1,10 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.3.3. Effets chez les larves de la G1

L'analyse statistique des résultats chez les larves de la G1, révèle que le Spinosad induit une diminution significative de l'activité spécifique de l'AChE ($t_6$ = 2,96;p = 0,032) après traitement des larves de la génération parent ou G0 **(Tab.21).**

**Tableau 21.**Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Larves (stade) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| **L3** | **Témoins** | **Traités** |
| | 4,48 ± 0,4 **a** | 2,55 ± 0,4 **b** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.3.4. Effets chez les pupes de la G1

Les valeurs de l'activité spécifique l'AChE, chez les pupes de la G1, sont significativement plus basses chez les séries traitées par rapport aux témoins **(Tab.22)**; cette inhibition est notée chez les pupes nouvellement exuviées ($t_6$ = 4,35; p = 0,007) et celles âgées de 3 jours ($t_6$= 5,04; p = 0,015).

En outre, la comparaison des moyennes effectuée entre les deux âges pour une même série révèle une augmentation très significative chez les séries témoins (p <0,001) et traitées (p = 0,002).

**Tableau 22.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM /min/mg de protéines) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| **Pupes (jours)** | **Génération 1** | |
|---|---|---|
| | **Témoins** | **Traités** |
| **0** | 7,21 ± 0,50 **a** **A** | 4,24 ± 0,40 **b** **A** |
| **3** | 18,59 ± 0,10 **a** **B** | 15,94 ± 0,40 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %)

### 2.3.5. Effets chez les adultes de la G1

Chez les adultes de la G1 issus des larves traitées de la G0, les activités spécifiques de l'AChE, révèlent une baisse significative dans les valeurs obtenues, par rapport aux séries témoins **(Tab.23)**. Cette inhibition de l'AChE, est notée à l'émergence des adultes ($t_6$ = 8,89; p = 0,001) mais aussi au jour 7 ($t_6$ = 3,16; p = 0, 025).

Par ailleurs, les valeurs de l'activité spécifique de l'AChE, entre les âges, indiquent une diminution aussi bien chez les témoins (p< 0,001) que chez les traités (p = 0,026).

**Tableau 23.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM /min/mg de protéines) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 70,49 ± 1,60 **a** **A** | 37,28 ± 3,40 **b** **A** |
| **7** | 29,00 ± 1,70 **a** **B** | 22,42 ± 1,20 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 2.3.6. Effets sur l'AChE: comparaison entre les deux générations

Les valeurs de l'activité spécifique de l'AChE chez *D.melanogaster* sont significativement plus basses chez les séries traitées par rapport aux témoins; cette inhibition de l'AChE, notée dès l'émergence des adultes de la G0, se retrouve à tous les stades de développement de la génération suivante ou G1 (chez les larves les pupes et les adultes le jour de l'émergence). La comparaison des moyennes pour un même âge entre les deux générations montre que l'inhibition de l'acétylcholinestérase est plus importante en G1 par rapport à la G0 **(Fig.13)**. Des différences significatives sont notées, après l'analyse de varaince, pour les critères génération ($F_{3, 48}$ =21,76; p <0,001), stade ($F_{3, 48}$ = 288,50; p < 0,001) et interaction génération-stade ($F_{9, 48}$ = 11,43; p <0,001) **(Tab.24)**.

**L'inhibition de l'AChE plus drastique en G1 semble être en faveur d'une action indirecte de ce pesticide sur ce site non cible. Les résultats obtenus sur les deux générations tendent à appuyer la toxicité différée du Spinosad.**

**Tableau 24.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) chez les larves (L3), pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives G0 et G1: Analyse de la variance à deux critères de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 1689,10 | 3 | 563,00 | 21,76 | **p< 0,001*** ** |
| **Stade** | 22390,40 | 3 | 7463,50 | 288,50 | **p< 0,001*** ** |
| **Interaction** | 2662,40 | 9 | 295,80 | 11,43 | **p< 0,001*** ** |
| **Erreur résiduelle** | 1241,80 | 48 | 25,90 | | |

*** : 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.

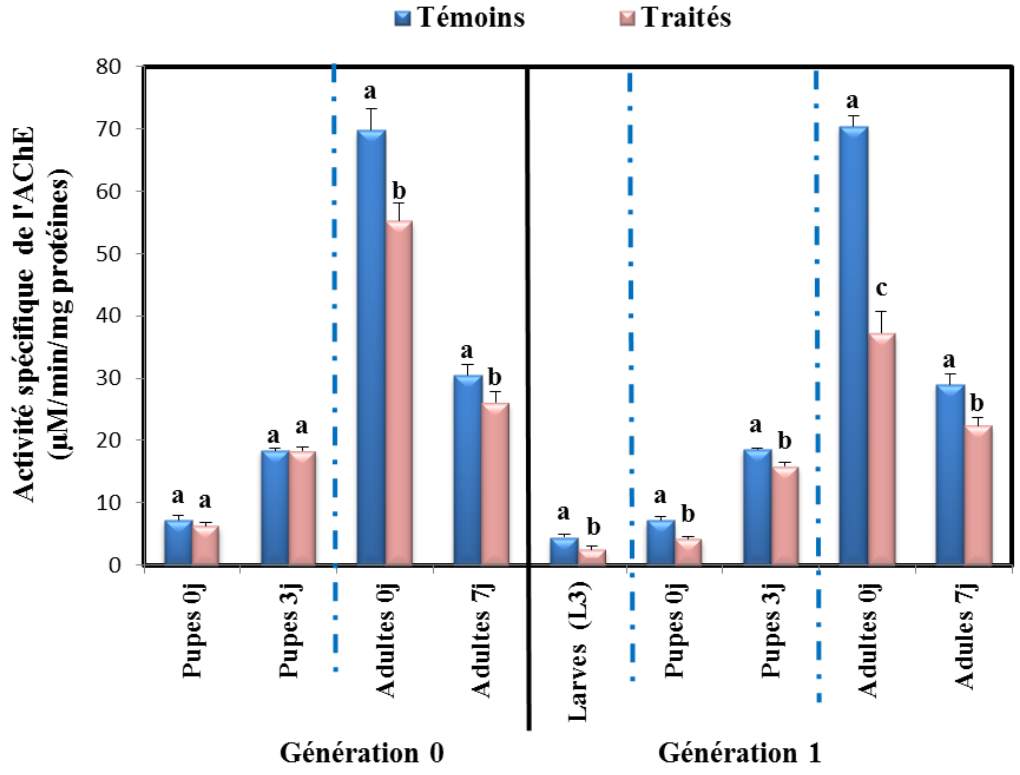


**Figure 13.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique, ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines), chez les larves (L3), pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7jours) au cours de deux générations successives G0 et G1 (m ± sd; n = 4 à 6). Les lettres en minuscules correspondent à l'analyse statistique pour un même âge entre les deux générations.

## 3. Effets du Spinosad sur les métabolites dans le corps entier

L'étude biochimique a permis de déterminer chez *D.melanogaster*au cours des différents stades et pour les deux générations, les contenus corporels (corps entier) des principaux métabolites (protéines, glucides, lipides) chez les séries témoins et traitées au Spinosad ($DI_{50}$: 288,50 ng).

### 3.1 Effets sur les protéines chez la G0 et la G1

#### 3.1.1. Effets chez les pupes de la G0

Le Spinosad, appliqué chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster*, entraîne une diminution dans le contenu en protéines **(Tab. 25)**; cet effet est noté chez les pupes nouvellement exuviées ($t_6$ = 2,87;p =0,035) et celles âgées de 3 jours ($t_6$ = 2,86 ;p = 0,020).

Les résultats obtenus après analyse statistique, effectuée pour une même série, révèlent des différences significatives entre les deux âges testés chez les séries témoins (p=0,005) et traitées (p = 0,001).

**Tableau 25.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique, ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal de la G0 (0 et 3 jours) (m ± sd; n= 4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 15,31 ±1,37 **a** **A** | 10,59 ± 0,93 **b** **A** |
| **3** | 4,95 ± 0,35 **a** **B** | 2,50 ± 0,29 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.1.2. Effets chez les adultes de la G0

Chez les adultes de la G0, le Spinosad induit une diminution significative chez les séries traitées par rapport aux séries témoins **(Tab. 26)**. Les valeurs dans le contenu en protéines sont plus basses chez les adultes le jour de l'émergence ($t_6$= 3,23;p = 0,023) mais aussi au jour 7 ($t_6$= 3,69;p = 0,034).

Une augmentation est également observée entre les âges chez les séries témoins (p < 0,001) et traitées (p=0,010).

**Tableau 26.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique (DI $_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| 0 | 15,91±0,53 **a** **A** | 12,78 ±0,81 **b** **A** |
| 7 | 22,57 ± 0,30 **a** **B** | 18,30 ± 1,10 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges ; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.1.3. Effets chez les larves de la G1

Les résultats obtenus chez les larves de la G1 de *D.melanogaster* ne révèlent aucune diminution significative (p= 0,157) dans le contenu en protéines comparativement aux témoins **(Tab. 27).**

**Tableau 27.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n = 4 à 6).

| Larves (stade) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| L3 | Témoins | Traités |
| | 7,93 ± 0,32 **a** | 6,71 ± 0,63 **a** |

### 3.1.4. Effets chez les pupes de la G1

Les pupes de la G1, provenant des larves de *D.melanogaster* traitées au Spinosad à la G0, ne présentent aucune diminution dans les valeurs du contenu en protéines corporelles par rapport aux témoins **(Tab. 28).** Ce résultat est observé pour les deux âges du stade pupal (jour 0 : p = 0,334 ; jour 3:p = 0,406).

Les analyses statistiques effectuées entre les deux âges pour une même série indiquent une baisse dans le contenu en protéines chez les séries témoins (p < 0,001) mais aussi chez les séries traitées (p=0,002)

**Tableau 28.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique ($DI_{50}$:288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal de la G1 (0 et 3 jours) (m ± sd; n= 4 à 6).

| Pupe (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 15,20±1,18 **a** **A** | 13,61 ±1,29 **a** **A** |
| **3** | 4,04 ± 0,51**a** **B** | 3,76± 0,56 **a** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.1.5. Effets chez les adultes de la G1

Les adultes de la G1, traités au Spinosad au cours du dernier stade larvaire de la G0, ne montrent aucune différence dans le contenu en protéines comparativement aux séries témoins **(Tab.29)** le jour de l'exuviation (p =0,060) mais aussi au jour 7 après l'émergence (p = 0,495). Par ailleurs, les valeurs du contenu en protéines entre les âges révèlent une augmentation significative chez les séries témoins (p = 0,022) mais aussi chez les traitées (p = 0,001).

**Tableau 29.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique (DI $_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adule (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 15,98± 0,71 **a** **A** | 13,91 ± 0,35 **a** **A** |
| **7** | 21,81± 0,83 **a** **B** | 22,53 ± 1,00 **a** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.1.6. Effets sur les protéines : comparaison entre les deux générations

Le Spinosad, appliqué chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster*, entraîne une diminution dans le contenu en protéines chez les pupes (0 et 3 jours) et les adultes (0 et 7 jours) de la même génération (G0). Cependant, l'effet du Spinosad sur les protéines n'est pas retrouvé chez la génération suivante ou G1 **(Fig. 14).** La comparaison des moyennes pour un même âge entre les deux générations montre que la baisse du contenu en protéinesestretrouvée à la G0 seulement.

L'analyse de la variance, effectuée entre les séries témoins et traitées **(Tab. 30)** révèle un effet génération ($F_{3, 48}$ = 9,02; p < 0,001), un effet stade ($F_{3,48}$ = 235,09;p < 0,001) mais aucun effet sur l'interaction génération-stade ($F_{9,48}$ = 0, 85 ; p =0,578). La diminution est surtout notée au cours de la G0.

**Par conséquent, un retour vers des normes physiologiques est observé dans le contenu en protéines en G1 chez *D.melanogaster* après traitement au Spinosad des larves de dernier stade de la génération parent.**

**Tableau 30.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines (µg/mg) chez les larves (L3), pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives G0 et G1:Analyse de la variance à deux critères declassification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 90,58 | 3 | 30,19 | 9,02 | **p< 0,001*** ** |
| **Stade** | 2361,97 | 3 | 787,32 | 235,09 | **p< 0,001*** ** |
| **Interaction** | 25,51 | 9 | 2,83 | 0,85 | **p = 0,578** |
| **Erreur résiduelle** | 160,75 | 48 | 3,35 | - | - |

*** : 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.

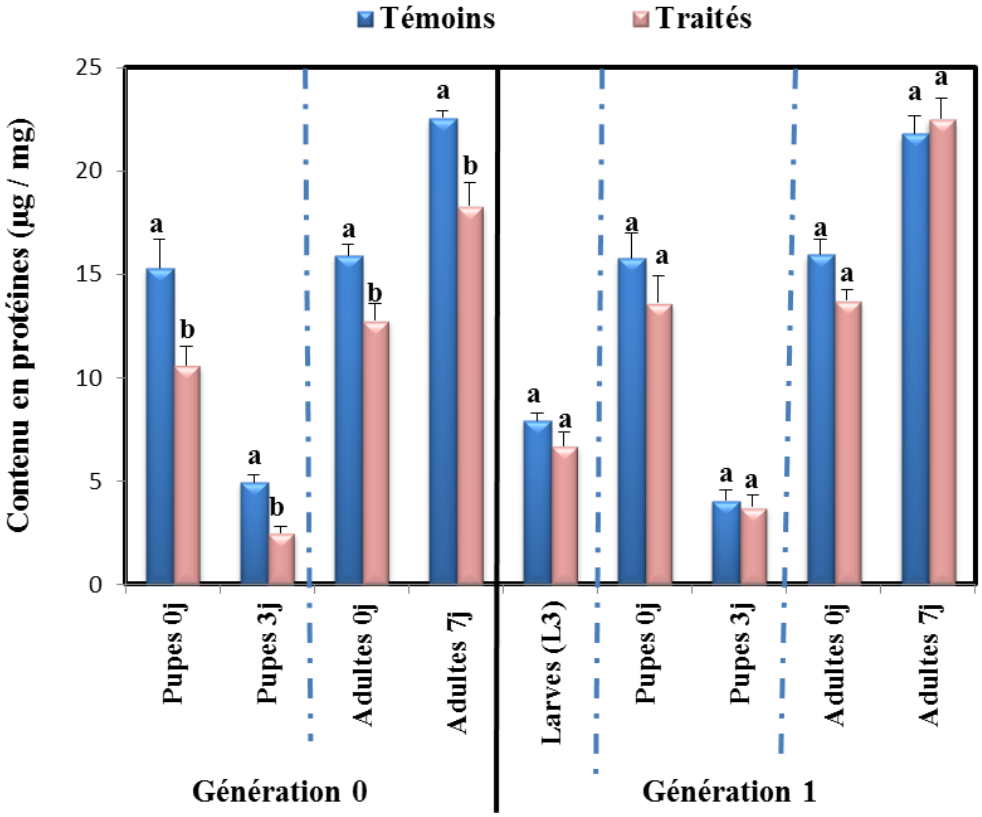


**Figure 14.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$ :288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en protéines (µg/mg) chez les larves (L3), pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives G0 et G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

## 3.2. Effets sur les glucides chez la G0 et la G1

### 3.2.1. Effets chez les pupes de la G0

Le Spinosad, appliqué chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster*, induit une diminution dans le contenu en glucides chez les pupes âgées de 0 et 3 jours (jour 0: $t_6$ = 10,46; p < 0,001; jour 3:$t_6$=4,55; p = 0,006) comparativement aux témoins **(Tab.31)**. L'analyse statistique effectuée entre les âges pour une même série ne révèle aucune baisse dans le contenu en glucides chez les séries témoins (p = 0,096) mais une diminution significative chez les séries traitées (p = 0,041).

**Tableau 31.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal (0 et 3 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 54,15± 1,10 **a** **A** | 27,76 ± 2,30 **b** **A** |
| **3** | 48,81 ± 2,20 **a** **A** | 35,73± 1,90 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.2.2. Effets chez les adultes de la G0

Le Spinosad induit, chez les adultes de la G0, une diminution hautement significative dans le contenu en glucides chez les séries traitées comparativement aux témoins **(Tab.32)**. Cet impact est noté au jour 0 ($t_6$ = 11,83; p < 0,001) mais aussi au jour 7 ($t_6$ = 3,61 ; p = 0,015).

Entre les deux âges testés, les valeurs dans le contenu en glucides montrent une baisse chez les séries témoins (p = 0,001) mais restent comparables chez les séries traitées (p = 0,882).

**Tableau 32.**Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4-6).

| Adultes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| 0 | 43,40 ± 1,30 **a** **A** | 25,47 ±0,50 **b** **A** |
| 7 | 30,56 ± 1,20 **a** **B** | 25,14± 0,93 **b** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.2.3. Effets chez les larves de la G1

L'analyse statistique des valeurs obtenues dans le contenu en glucides chez les larves de la G1, après traitement des larves de la G0, montre que le Spinosad induit encore une diminution de ce contenu chez les séries traitées par rapport aux séries témoins ($t_6$ = 3,60; p = 0,016) **(Tab.33).**

**Tableau 33.** Effets du Spinosad, administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n = 4 à 6).

| Larves (stade) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| L3 | Témoins | Traités |
| | 48,66 ± 2,30 **a** | 36,28 ± 2,60 **b** |

### 3.2.4. Effets chez les pupes de la G1

Les résultats obtenus indiquent que le Spinosad induit toujours une diminution significative dans le contenu en glucides chez les pupes de la G1, après traitement des larves de dernier stade de la G0 **(Tab.34)**. Cet impact observé chez les pupes nouvellement exuviées ou jour 0 du stade pupal ($t_6$ = 9,04; p =0,003) est aussi noté au jour 3 ($t_6$ = 2,71; p = 0,042).

La comparaison entre les âges pour une même série chez les témoins (p=0,126) mais aussi chez les traitées (p = 0, 378) ne révèle aucune différence.

**Tableau 34.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique, (DI $_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal de la G1 (0 et 3 jours) (m ± sdn= 4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 53,84 ± 1,30 **a** **A** | 39,92±1,50 **b** **A** |
| **3** | 49,08 ± 2,20 **a** **A** | 41,99 ±1,40 **b** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.2.5. Effets chez les adultes de la G1

Chez les adultes de la G1, la diminution significative dans le contenu en glucides est retrouvée, chez les séries traitées comparativement aux témoins; cet effet est noté le jour de l'émergence et au jour 7 suivant (0 j : $t_6$ = 10,58 ; p< 0,001; 7 j $t_6$ = 3,71 ; p = 0,014). Ainsi, le Spinosad appliqué chez les larves de dernier stade de la génération parent de *D. melanogaster* induit encore un effet sur le contenu en glucides chez les adultes de la génération suivante **(Tab. 35)**.

Par ailleurs, les analyses statistiques, effectuées entre les deux âges pour une même série, indiquent une diminution dans le contenu en glucides chez les séries témoins (p < 0,001) mais non chez les séries traitées (p = 0,211).

**Tableau 35.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G1 (m ± sd; n = 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 42,90 ± 0,90 **a** **A** | 27,94± 1,20 **b** **A** |
| **7** | 30,60 ± 1,10 **a** **B** | 25,93 ± 0,70 **b** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.2.6. Effets sur les glucides: comparaison entre les deux générations

Le contenu en glucides corporels, après traitement au Spinosad, baisse significativement, par rapport aux témoins, du stade pupal de la G0 au stade adulte de la G1. La diminution semble plus importante en G0. La comparaison des moyennes pour un même âge entre les deux générations montre que le contenu en glucides est plus important à la G0 comparativement à la G1. L'analyse statistique confirme ces résultats et révèle un effet génération ($F_{3,48}$ = 34,58; p < 0,001), un effet stade ($F_{3,48}$ = 41,31; p < 0,001) mais l'interaction génération-stade est à la limite du seuil de significativité ($F_{9,48}$ = 2,07;p = 0,051) **(Tab. 36)**.

**Les différences significatives observées en G1 indiquent, pour le contenu en glucides, un effet différé du Spinosad mais également une tendance vers un retour aux valeurs de base (Fig. 15).**

**Tableau 36.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique, (DI $_{50}$: 288,50ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides (µg/mg), chez les larves (L3), pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives G0 et G1: Analyse de la variance à deux critères de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 2436,40 | 3 | 812,13 | 34,58 | **p< 0,001*** ** |
| **Stade** | 2910,34 | 3 | 970,11 | 41,31 | **p< 0,001*** ** |
| **Interaction** | 437,38 | 9 | 48,60 | 2,07 | **p = 0,051** |
| **Erreur résiduelle** | 1127,35 | 48 | 23,49 | - | - |

*** : 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.

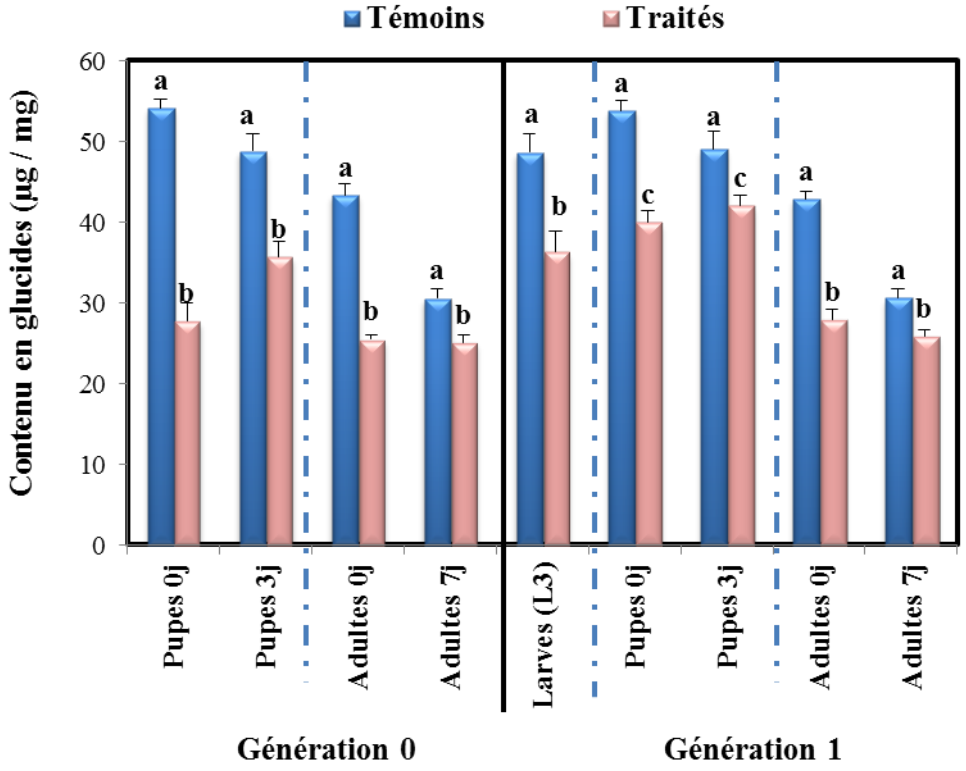


**Figure 15.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique, (DI $_{50}$:288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en glucides (µg/mg), chez les larves (jour 5), pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives G0 et G1 (m ± sd; n= 4 à 6). Les lettres en minuscules correspondent à l'analyse statistique pour un même âge entre les deux générations.

## 3.3. Effets sur les lipides chez la G0 et la G1

### 3.3.1. Effets chez les pupes de la G0

Le Spinosad, appliqué chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster,* n'entraîne aucune diminution dans le contenu en lipides chez les pupes nouvellement exuviées (p=0,538) et âgées de 3 jours (p = 0,913). Les analyses statistiques, effectuées entre les âges d'une même série, indiquent une diminution dans le contenu en lipides aussi bien chez les séries témoins que celles traitées (p < 0,001) **(Tab. 37).**

**Tableau 37.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal de la G0 (0 et 3jours) (m ± sd; n= 4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 80,79 ±1,50 **a** **A** | 81,89 ± 1,20 **a** **A** |
| **3** | 42,30 ± 2,60 **a** **B** | 42,67 ± 1,90 **a** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.3.2. Effets chez les adultes de la G0

Chez les adultes nouvellement émergés, les résultats obtenus indiquent que le Spinosad n'induit aucun effet (p = 0,964) dans le contenu en lipides **(Tab.38)**; cette absence d'effet est également noté au jour 7 (p = 0,705).

La comparaison des valeurs dans le contenu en lipides entre les âges pour une même série, ne montre aucune baisse significative chez les séries témoins (p = 0,306) et celles traitées (p = 0,634).

**Tableau 38.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte (0 et 7 jours) de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 170,84 ±1,60 **a** **A** | 170,20 ± 2,40 **a** **A** |
| **7** | 164,51 ± 4,90 **a** **A** | 167,30 ± 5,00 **a** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.3.3. Effets chez les larves de la G1

Après traitement au Spinosad des larves du dernier stade de *D.melanogaster*,les larves de la G1montre une différence significative, comparativement aux témoins **(Tab. 39)**; en effet, le Spinosad induit une baisse dans le contenu en lipides du corps des larves de la G1, contrairement aux individus (pupes et adultes) de la G0 ($t_6$ = 2,82 ; p = 0,037).

**Tableau 39.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade larvaire (L3) de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Larves (stade) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| **L3** | **Témoins** | **Traités** |
| | 82,07 ± 4,50 **a** | 66,98 ± 2,90 **b** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges ; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.3.4. Effets chez les pupes de la G1

Les résultats obtenus et présentés dans le **tableau 40** indiquent que le Spinosad induit encore un effet sur les lipides chez les pupes aux jours 0 ($t_6$ = 2,64 ; p = 0,046) et 3 du stade pupal ($t_6$ = 3,18 ; p = 0,033). En outre, une diminution dans le contenu en lipides est notée entre les âges chez les témoins et chez les traitées (p < 0,001).

**Tableau 40.** Effets du Spinosad, administré *in vivo* par application topique, ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade pupal de la G1 (0 et 3 jours) (m ± sd; n= 4 à 6).

| Pupes (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 80,20 ± 1,7 **a** **A** | 73,21 ± 2,20 **b** **A** |
| **3** | 41,85± 2,00 **a** **B** | 34,84 ±0,87 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.3.5. Effets chez les adultes de la G1

Le Spinosad, appliqué chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster,* n'entraîne plus aucun effet dans le contenu en lipides chez les adultes nouvellement exuviés (p=0,245) mais aussi chez ceux âgés de 7 jours (p = 0,928) **(Tab.41)**. Entre les âges et pour une même série, les valeurs dans le contenu en lipides ne sont pas différentes chez les séries témoins (p =0,252) et traitées (p = 0,108).

**Tableau 41.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides dans le corps entier (µg /mg) au cours du stade adulte de la G1 (0 et 7 jours) (m ± sd; n = 4 à 6).

| Adultes (jours) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **0** | 170,61 ± 0,79 **a** **A** | 174,93 ± 2,90 **a** **A** |
| **7** | 160,60 ± 7,00 **a** **A** | 161,40 ± 5,90 **a** **A** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 3.3.6. Effets sur les lipides : Comparaison entre les deux générations

Pour les pupes et adultes de la G0 ainsi que pour les adultes de la G1, le contenu en lipides chez *D.melanogaster* demeure similaire entre les individus témoins et traités (p > 0,05). L'analyse de la variance effectuée **(Tab.42)** ne révèle aucun effet sur les facteurs génération ($F_{3,48}$ = 0,88; p = 0,460) et interaction génération-stade ($F_{9,48}$ = 0,43 ;p = 0,911); cependant, un effet stade est noté ($F_{3,48}$ = 1509,75; p < 0,001). Par ailleurs, seules les larves et les pupes de la G1 présentent une diminution dans le contenu en lipides **(Fig.16)** après comparaison des moyennes pour un même âge entre les deux générations.

**Ainsi, le Spinosad présente un effet différé sur les lipides aux stades immatures de la G1.**

**Tableau 42.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides (µg/mg) chez les larves (L3, pupes (0 et 3 jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives G0 et G1: Analyse de la variance à deux critères de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 25 | 3 | 38 | 0,88 | **p = 0,460** |
| **Stade** | 197515 | 3 | 65838 | 1509,75 | **p< 0,001*** ** |
| **Interaction** | 280 | 9 | 31 | 0,71 | **p = 0,694** |
| **Erreur résiduelle** | 2093 | 48 | 44 | - | - |

*** : 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.

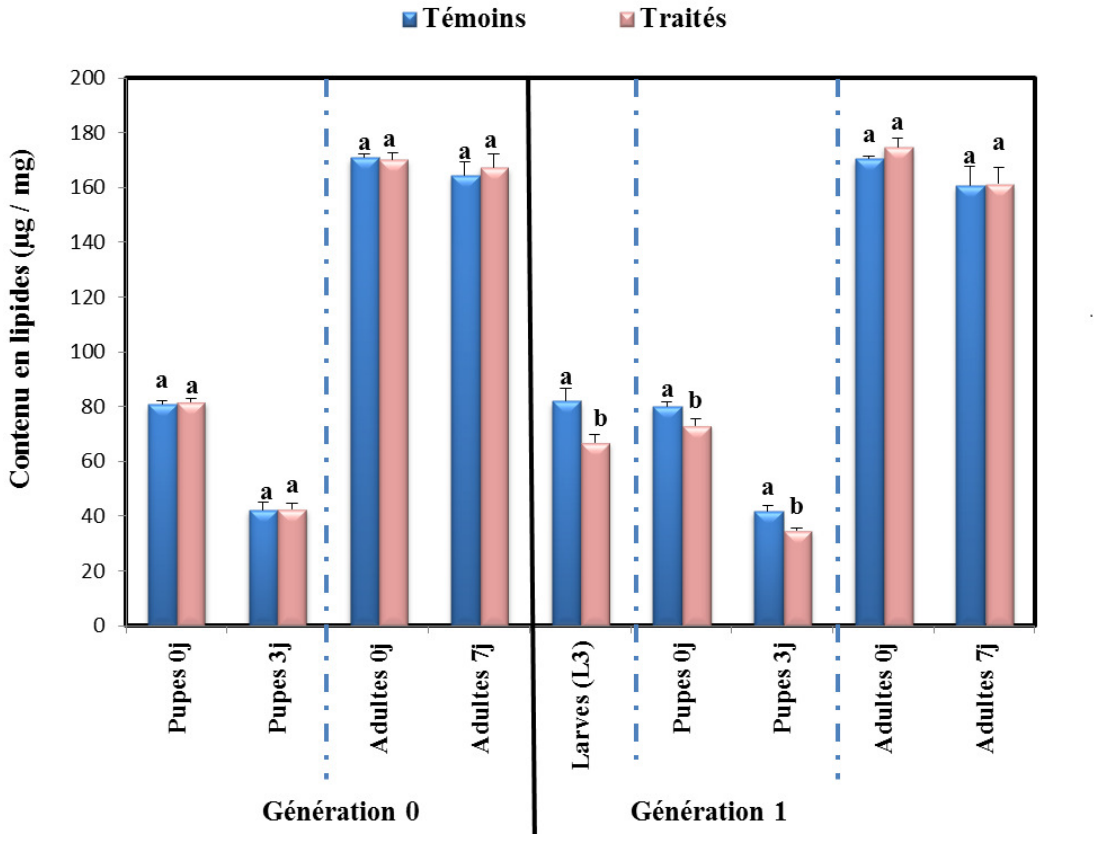


**Figure 16.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$:288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en lipides (µg/mg) chez les larves (L3) pupes (0 et 3jours) et adultes (0 et 7 jours) au cours de deux générations successives G0 et G1 (m ± sd; n= 4 à 6). Les lettres en minuscules correspondent à l'analyse statistique pour un même âge entre les deux générations.

# 4. Effets du Spinosad sur les vitellogénines chez les adultes femelles

## 4.1. Effets du Spinosad sur les vitellogénines dans le corps gras

### 4.1.1. Effet chez les adultes de la G0

Le Spinosad, administré par application topique chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster,* a été évalué sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras chez les femelles adultes. L'évaluation de ce contenu a été réalisée à différents temps de la vitellogénèse qui sont 6, 12, 18 et 24 heures après exuviation. La comparaison, entre les séries témoins et traitées **(Fig.17),** montre une diminution hautement significative dans le contenu en vitellogénines au cours de ce premier cycle gonadotrophique. La baisse en vitellogénines est notée à tous les temps testés, 6 ($t_6$ = 10,83 ; $p < 0,001$), 12 ($t_6$ = 25,90 ; $p < 0,001$), 18 ($t_6$ = 5,56 ; p = 0,011) et 24 heures ($t_{6=}$15,85 ; p< 0,001) après l'exuviation adulte. Le traitement au Spinosad montre un effet marqué sur le contenu en vitellogénines.

Chez les séries témoins, les valeurs dans les vitellogénines augmentent significativement à 12 (p = 0,008) et 24 heures (p = 0,019) mais restent comparables entre 12 et 18 heures (p=0,315). Chez les séries traitées au Spinosad, une augmentation dans les valeurs est observée seulement 12 heures après l'exuviation;les valeurs restent ensuite comparables jusqu'à 24 heures.

**Tableau 43.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster* (G0)et évalués sur le contenu en vitéllogénines dans le corps gras (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Temps (heures) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| 6 | 59,50 ±1,90 **a** **A** | 41,61± 2,70 **b** **A** |
| 12 | 65,70 ± 0,57 **a** **B** | 48,90 ± 2,90 **b** **B** |
| 18 | 64,29 ± 1,77 **a** **B** | 48,84 ± 2,80 **b** **B** |
| 24 | 67,62 ± 1,19 **a** **C** | 49,72 ± 1,90 **b** **B** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 4.1.2. Effets chez les adultes de la G1

Chez la génération 1, les adultes femelles de *D. melanogaster* provenant de la génération parent traitée, montrent une diminution dans le contenu en vitellogénines par rapport aux témoins **(Tab. 44)**. Ceci est noté à 6 ($t_6$ = 8,95; p = 0,001), 12 ($t_6$ = 9,21; p = 0,001), 18 ($t_6$ =14,46;p< 0,001) et 24 heures ($t_6$ =13,44;p < 0,001) après émergence des femelles.

Les analyses statistiques effectuées révèlent chez les séries témoins, une augmentation significative à 12 (p = 0,041) et à 24 heures (p = 0,040). Des valeurs similaires sont notées entre 12 et 18 heures (p = 0,759). Chez les séries traitées, une hausse dans les valeurs des vittélogénines est observée à 12 (p = 0,005) et 24 heures. Les résultats montrent que le

Spinosad présente également un effet différé dans le contenu dans les vitellogénines synthétisées par le corps gras.

**Tableau 44.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D. melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines dans le corps gras (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Temps (heure) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **06** | 59,34± 2,20 **a** **A** | 42,41± 2,60 **b** **A** |
| **12** | 64,23±1,29 **a** **B** | 50,93 ± 2,47 **b** **B** |
| **18** | 64,38 ± 1,28 **a** **B** | 48,39 ±1,60 **b** **B** |
| **24** | 66,16 ± 0,92 **a** **B** | 55,62 ±1,20 **b** **C** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 4.1.3. Effets sur les vitéllogénines: comparaison entre les deux générations

Le Spinosad induit chez la G0 une diminution dans le contenu en vitéllogénines chez les adultes femelles à 6, 12 ,18 et 24 heures. Cette réduction est retrouvée également à la génération suivante et ce à toutes les heures testées. L'analyse statistique montre que la réduction des vitellogénines induite par le Spinosad est plus importante à la G0 par rapport à la G1 **(Fig. 17)**. L'analyse de variance indique des différences pour les critères génération ($F_{3,}$

$_{48}$ = 232,09; p <0,001) stade ($F_{3, 48}$ =39,33 ; p <0,001) et interaction génération stade ($F_{9, 48}$ =2,29; p = 0,031) **(Tab. 45)**.

**Le traitement au Spinosad affecte donc les vitellogénines chez les deux générations successives de *D.melanogaster*; par conséquent l'effet différé est aussi noté pour ce paramètre.**

**Tableau 45.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines dans le corps gras (µg/mg) chez les adultes femelles au cours de deux générations successives G0 et G1: Analyse de la variance à deux critères de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 3818,39 | 3 | 1272,80 | 232,09 | **p< 0,001*** |
| **Stade** | 647,09 | 3 | 215,70 | 39,33 | **p< 0,001*** |
| **Interaction** | 113,11 | 9 | 12,57 | 2,29 | **p = 0,031*** |
| **Erreur résiduelle** | 263,24 | 48 | 5,48 | | |

*** :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.

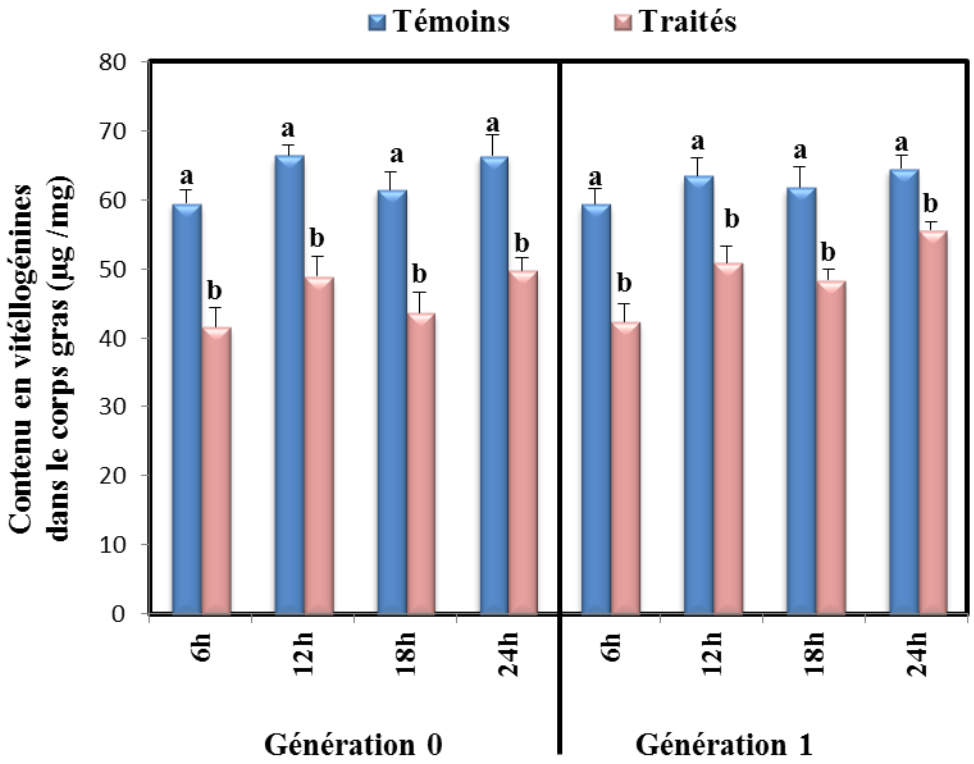


**Figure 17.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras (µg/mg) chez les adultes femelles au cours des deux générations successives G0 et G1 (m ± sd; n= 4 à 6). Les lettres en minuscules correspondent à l'analyse statistique pour un même âge entre les deux générations.

## 4.2. Effet du spinosad sur les vitéllogénines dans les ovaires

### 4.2.1. Effets chez les adultes de la G0

Après traitement au Spinosad des larves de dernier stade de *D. melanogaster*, le contenu en vitellogénines dans les ovaires chez les adultes femelles de la G0 baisse significativement, par rapport aux séries témoins au cours des 24 heures après l'exuviation; cette diminution est notée à 6 ($t_6$ = 5,60; p = 0,005), 12 ($t_6$ = 6,02; p = 0,009), 18 ($t_6$ = 5,92; p = 0,002) et 24 heures ($t_6$ = 9,93; p = 0,001).

Chez les séries témoins de *D. melanogaster,* le contenu en vitellogénines ovariennes au cours de la maturité sexuelle augmente significativement à 12 (p=0,024) ,18 (p=0,010) et 24 heures

(p = 0,001). Chez les séries traitées au Spinosad, une hausse dans le contenu en vitellogénines ovariennes est notée à 12 et 18 heures seulement **(Tab. 46)**.

**Tableau 46.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves du dernier stade de *D.melanogaster* et évalués sur le contenu en vitéllogénines ovariennes (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster* de la G0 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Temps (heures) | Génération 0 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| **06** | 67,90± 2,70 **a** **A** | 49,04 ± 2,80 **b** **A** |
| **12** | 78,26 ± 1,20 **a** **B** | 59,90 ± 2,90 **b** **B** |
| **18** | 82,99 ± 0,25 **a** **C** | 72,14 ± 4,50 **b** **C** |
| **24** | 98,42 ± 2,40 **a** **D** | 74,73 ± 4,00 **b** **C** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 4.2.2. Effets chez les adultes de la G1

Chez les adultes *D.melanogaster* issus de la génération traitée au Spinosad, l'analyse statistique des données obtenues révèle une diminution significative dans le contenu en vitellogénines ovariennespar rapport aux témoins **(Tab. 47);** cette baisse dans le contenu en vitellogénines est observée à toutes les heures testées (6 h: $t_6$ = 6,30, p = 0,001; 12 h: $t_6$ = 9,85, p = 0,001; 18 h: $t_6$ = 4,79, p = 0,005; 24 h : $t_6$ = 5,59, p= 0,005).

Chez les adultes femelles de *D.melanogaster* les résultats montrent que le contenu en vitellogénines reste comparable entre 12 et 18 h (p = 0, 052) puis augmente à 24 h (p < 0,001). Chez les séries traitées, des valeurs similaires sont notés à 6 et 12 heures (p = 0, 279)

puis une augmentation est observée à 18 ($p < 0,001$) et 24 heures ($p = 0,007$). Le Spinosad agit donc avec un effet différé sur les vitellogénines ovariennes.

**Tableau 47.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50ng) chez les larves de dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines ovariennes (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles de la G1 (m ± sd; n= 4 à 6).

| Temps (heures) | Génération 1 | |
|---|---|---|
| | Témoins | Traités |
| 6 | 71,33±1,80 **a** **A** | 61,52 ± 2,50 **a** **A** |
| 12 | 81,43 ± 3,20 **a** **B** | 63,35 ±1,60 **b** **A** |
| 18 | 86,73 ± 2,50 **a** **B** | 77,92 ± 2,60 **b** **B** |
| 24 | 94,22 ± 2,70 **a** **C** | 85,61 ± 1,40 **b** **C** |

● Les lettres en majuscules comparent les moyennes d'une même série entre les différents âges; les lettres minuscules comparent les valeurs d'un même âge entre les différentes séries (p<5 %).

### 4.2.3Effets sur les vitéllogénines : comparaison entre les deux générations

Le Spinosad induit une réduction significative dans le contenu en vitéllogénines ovariennes, chez les femelles adultes de la G0 au cours des premières 24 heures. Cette diminution dans les vitellogénines est aussi observée chez la G1 pour les mêmes temps évalués. La comparaison des moyennes pour un même âge entre les deux générations révèle une augmentation dans les valeurs des vitéllogénines ovariennes chez les femelles

adultes traitées de la G1comparativement à celles de la G0; ceci tend à soutenir un retour des normes physiologiques **(Fig.18)**.

L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle un effet génération ($F_{3, 48}$ = 21,58, p <0,001), un effet stade ($F_{3, 48}$ = 44.56, p <0,001) et une interaction génération-stade ($F_{9, 48}$ = 2,51, p = 0,020) **(Tab.48)**.

**Les vitéllogénines ovariennes chez les femelles adultes des deux générations successives de *D.melanogaster* sont affectées par le traitement au Spinosad effectué chez les larves de la G0. Par conséquent, l'effet différé est aussi noté pour ce paramètre.**

**Tableau 48.** Effets du Spinosad administré *in vivo* par application topique ($DI_{50}$: 288,50 ng) sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitéllogénines ovariennes (µg/mg) chez les adultes femelles au cours de deux générations successives G0 et G1: Analyse de la variance à deux critères de classification.

| Source de variation | SCE | ddl | CM | Fobs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Génération** | 3857,14 | 3 | 1315,47 | 21,58 | **p< 0,001*** |
| **Stade** | 7253,92 | 3 | 2715,83 | 44,56 | **p< 0,001*** |
| **Interaction** | 1375,84 | 9 | 152,87 | 2,51 | **p = 0,020*** |
| **Erreur résiduelle** | 2803,89 | 48 | 60,95 | | |

*** :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.

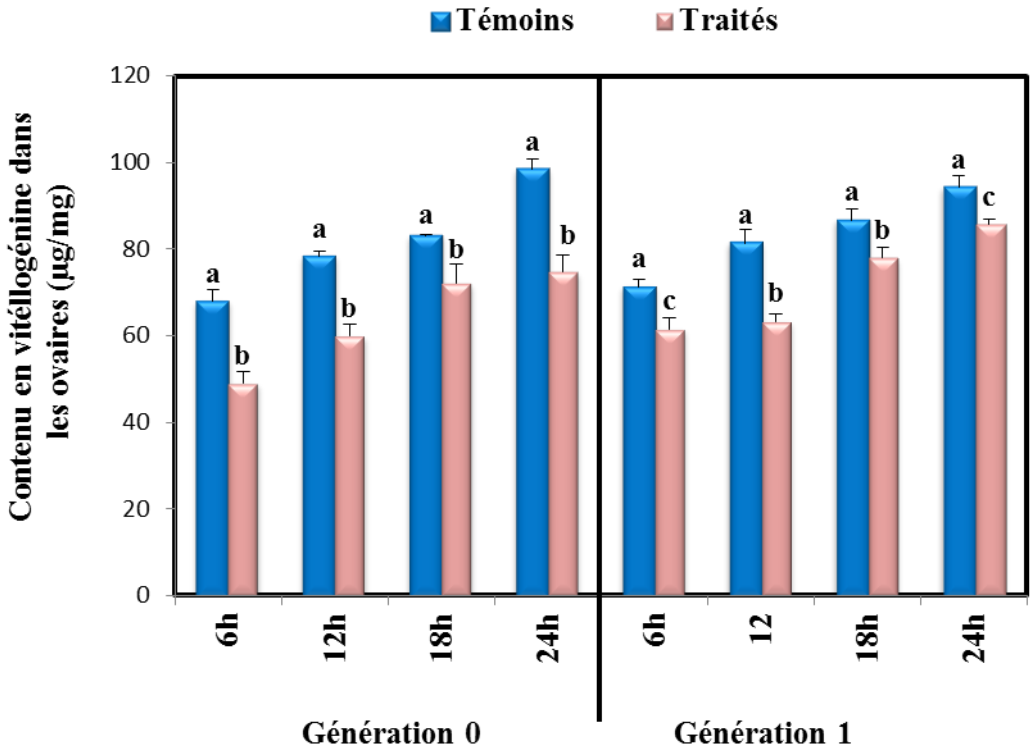


**Figure 18.** Effets du Spinosad, administré *in vivo*, par application topique, ($DI_{50}$: 288,50 ng sur les larves du dernier stade de *D.melanogaster* (G0) et évalués sur le contenu en vitellogénines dans les ovaires (µg/mg) au cours des 24 heures après l'émergence des adultes femelles chez les deux générations successives G0 et G1 (m ± sd; n= 4 à 6). Les lettres en minuscules correspondent à l'analyse statistique pour un même âge entre les deux générations.

# DISCUSSION

# DISCUSSION

## 1. Activité insecticide

Le Spinosad testé par application topique à la DI50, sur le dernier stade larvaire de *Drosophila melanogaster*, entraîne une inhibition de la mue nymphale, évaluée à l'émergence par les pupes mortes et malformées mais aussi les mues bloquées et/ou incomplètes. Ces effets du Spinosad, en accord avec la littérature (Maiza *et al*., 2013; Benchaabane *et al*., 2016) sont attribués à la neurotoxicité du Spinosad et ont aussi été signalés avec d'autres pesticides d'origine biologique (Almeida *et al*., 2014; Boulahbel *et al*., 2015). La cytotoxicité du Spinosad au niveau du système nerveux (Almeida *et al*., 2014; Somers *et al*., 2015) pourrait expliquer l'inhibition de la mue *via* une action indirecte sur les systèmes neuroendocrine et endocrine. En effet, les mues et le développement sont régulés majoritairement par la 20-hydroxyecdysone (20E) et l'hormone juvénile (JH) (Gade & Hoffman 2005; De Loof *et al*., 2014). Par conséquent, le Spinosad pourrait affecter indirectement la mue ou tout autre processus endocrinologique de par l'interaction des systèmes endocrine, neuroendocrine et neuronale (Toivonen et Partridge, 2009; Rauschenbach*et al*., 2017) intégrés dans un réseau de régulation physiologique complexe (Nässel et Broeck, 2016).

Le Spinosad, induit une inhibition de la mue nymphale chez *D. melanogaster* et la dose d'inhibition ou DI50 est de 288,50 ppm. Le Spinosad chez cette espèce non cible montre une efficacité importante dès 24 heures après traitement et ceci est en accord avec des travaux réalisés chez d'autres espèces (Arain *et al*., 2017). La $DI_{50}$ déterminée (288,50 ppm) semble plus forte comparativement à d'autres espèces de Drosophilidae (*D.suzukii)* qui est de 12 ppm (dose induisant une mortalité proche de 40%) (Profaizer *et al.,* 2014; Andreazza *et al*., 2017). Le Spinosad est également très efficace chez d'autres Diptères comme *Aedes albopictus* (0,3 ppm; Bond *et al*., 2004) et *Glossina palpalis gambiensis* (2,2 ppm; De Deken *et al.,* 2004). *Drosophila melanogaster* semble être plus sensible au Spinosad comparativement à d'autres

pesticides naturels, comme l'azadirachtine appliquée au stade pupal (1100 ppm; Boulahbel *et al*., 2015) et larvaire (670 ppm; Bendjazia *et al.,* 2016).

Cependant, une toxicité similaire est retrouvée chez les espèces de Lépidoptères comme *T.absoluta* (Benchaabane *et al*., 2016) *Helicoverpa armigera* (Wang *et al*., 2009), *Spodoptera exigua* (Wang *et al*., 2013) ou encore chez le Coléoptère *Rhynchophorus ferrugineus* (Abdelsalam *et al* .,2016).

La variabilité dans les valeurs des concentrations létales peut être expliquée par une activité insecticide du Spinosad qui est différente selon les espèces et qui est liée aux variations dans les sous-unités des nAChRs (Rinkevich & Scott, 2012; Somers *et al.,* 2015). Par ailleurs, la régulation des récepteurs mais aussi les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la régulation des canaux ioniques peuvent aussi jouer un rôle crucial dans la différence de sensibilité des insectes aux pesticides (Lavialle-Defaix *et al*., 2010). Il est important de noter que les différences de sensibilité aux pesticides entre les espèces d'insectes peuvent aussi être liées à d'autres mécanismes comme le taux de pénétration à travers la cuticule, leur absorption par les insectes, le transport dans les tissus de l'organisme ou encore le métabolisme (Besard *et al*., 2011).

**2. Effet du Spinosad sur les Biomarqueurs enzymatiques**

Le mécanisme de détoxication des xénobiotiques impliquent plusieurs types d'enzymes qui dégradent les insecticides en métabolites moins toxiques (Soderlund, 1997).Le processus de détoxication comprend différentes phases et les deux premières sont essentielles. La première phase ou phase de fonctionnalisation des xénobiotiques est assurée par des enzymes telles que les monooxygénases, hydrolases et réductases. La deuxième phase ou phase de conjugaison est réalisée par des enzymes telles que les GSTs qui catalysent la conjugaison des molécules fonctionnalisées à des substrats endogènes afin de faciliter leur

excrétion (Li, 2009; Misra *et al.,* 2011). Les GSTs représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles, essentiellement cytosoliques impliquées, dans de nombreux processus physiologiques parmi lesquels le transport intracellulaire, la biosynthèse des hormones, la protection contre le stress oxydatif et la détoxication des substances endogènes et de nombreux xénobiotiques (Enayati *et al.,* 2005, Board & Menon, 2013). Par ailleurs, les GSTs sont considérées comme des modérateurs du stress oxydatif et la catalase correspond à un biomarqueur de ce stress (Konus, 2015). La catalase (CAT : EC 1.11.1.6) est impliquée dans la défense de la cellule contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en oxygène et eau, ce qui limite les effets délétères des espèces réactives à l'oxygène (ROS; Hu *et al.,* 2015). L'activité de ces enzymes n'est pas spécifique à un groupe de contaminants; celle-ci peuvent être induites par une large gamme de xenobiotiques (Badiou-Bénéteau *et al.,*2012 ; Chakrabarti *et al.,* 2015) comprenant les pesticides naturels comme l'azadirachtine (Boulahbel *et al*.,2015).

Les résultats obtenus, chez *D.melanogaster,* après traitement au Spinosad, mettent en évidence une augmentation des activités spécifiques des GSTs dès 24 h après traitement. Ceci tend à confirmer la toxicité rapide et la mortalité obtenue 24 heures après application du pesticide. Cette hausse des GSTs se poursuit au stade adulte de la G0 puis retrouvé à la génération suivante (G1) avec un effet plus important. Cette augmentation, très significative comparativement aux témoins, pourrait s'expliquer par une induction du processus de détoxication, réaction de l'organisme face à l'entrée du xénobiotique. Ces résultats confirment l'induction des GSTs dans le processus de détoxication par le Spinosad, ceci contrairement à ce qui a été trouvé chez *R. ferrugineus* où le Spinosad inhibe l'activité des GSTs (Abdelsalam *et al.,* 2016). L'implication des GSTs a été retrouvée chez d'autres insectes traités au Spinosad, *Apis mellifera* (Carvalho *et al*., 2013), *Blattella germanica* (Maiza *et al.,*2013), *Glyphodes pyloalis* (Piri *et al*., 2014), *Xanthogaleruca luteola,*(Tamam *et al*., 2014) ou *T.*

*absoluta* (Benchaabane *et al*., 2016). La diminution dans l'activité spécifique des GSTs, observée entre les âges, peut être expliquée par l'implication de ces enzymes dans la biosynthèse hormonale, la régulation du métabolisme cellulaire et la physiologie (Broard & Menon, 2013).

Ainsi, l'induction des GSTs en G0 et en G1 apporte un nouvel élément qui est un effet différé du Spinosad au niveau de la descendance démontrant ainsi une toxicité rémanente de ce pesticide.

L'induction du système des GSTs chez *D.melanogaster* est corrélée avec une augmentation de l'activité spécifique de la CAT, observée dès 24 h après traitement au Spinosad et démontrant donc l'installation d'un stress oxydatif. Le Spinosad, provoque une induction de cette enzyme au cours des deux générations successives (G0 et G1) à tous les stades comparativement aux témoins; cet effet différé, retrouvé chez les larves pupes et adultes de la génération suivante (G1), est en accord avec les résultats de Benchaabane *et al*., (2016) chez *T.absoluta* après traitement avec ce même pesticide. Des effets similaires sont également observés chez *Tribolium castaneum* (Awan *et al*., 2012) et *A. mellifera* (Carvalho *et al*., 2013). La hausse dans l'activité spécifique de la catalase pourrait être expliquée par un mécanisme d'adaptation à la prévention de l'accumulation des (ROS) résultant de la présence du Spinosad et à une intensification de la sensibilité envers ce pesticide au niveau des membranes cellulaires. L'augmentation de l'activité de la catalase dès 24h après traitement est expliquée par le fait que cette enzyme est connue pour présenter une réponse claire et rapide de la contamination par les xénobiotiques (Wenning *e tal*., 1988). Par ailleurs, le retour à des normes physiologiques chez les adultes à la G1 peut s'expliquer par la détoxication plus importante qui a lieu à cette même période de développement.

L'augmentation dans les valeurs de la catalase observée entre les âges chez les pupes pourrait être liée à toutes les modifications histologiques relatives à la métamorphose.

L'AChE, l'une des principales cibles des insecticides neurotoxiques et inhibée de manière non réversible (Alout *et al.*, 2007), est aussi largement employée comme biomarqueur de neurotoxicité pour les organophosphorés, carbamates ou encore les néonicotinoides tels que l'imidaclopride (Lonare *et al.*, 2014).

L'AChE n'est pas un site cible pour le Spinosad, cependant, la littérature note que le traitement avec le spinosad entraîne une réduction de l'activité spécifique de cette enzyme chez divers insectes comme *T.absoluta* (Benchaabane *et al.*, 2016), *Spodoptera littoralis* (Rashwan, 2013), *B. germanica* (Maiza *et al.*, 2013), *A. mellifera (*Carvalho *et al.*, 2013), *Oreochromis niloticus* (Piner *et al.*, 2012), mais aussi chez les Vertébrés (Zidan, 2015). Les résultats obtenus chez *D.melanogaster* confirment la diminution significative de l'activité spécifique de l'AChE sur le stade adulte de la génération traitée (G0) mais également sur les stades de développement de la génération suivante (G1). Ainsi, la réduction dans les valeurs de l'AChE en G0 et G1 montre bien un effet différé du pesticide. Par ailleurs, les différences liées à l'âge chez les pupes et les adultes peuvent être expliquées par la régulation nerveuse et neurohormonale des diverses fonctions physiologiques.

En outre, l'inhibition de l'AChE est plus importante pour la génération 1 comparativement à la génération parent; ceci peut sans doute être en faveur de l'hypothèse de l'action indirecte du Spinosad déjà émise dans la littérature (Maiza *et al.,* 2013). Les molécules du Spinosad se lient sur le récepteur nAChR en compétition avec l'acétylcholine; l'acétylcholine ne pouvant pas agir, le potentiel post-synaptique et le potentiel d'action sont absents, et à leur tour les vésicules post-synaptiques ne peuvent libérer le neurotransmetteur.

L'AChE pourrait donc être indirectement perturbée et l'absence d'effet chez les pupes de la G0 mais aussi l'effet plus important en G1 appuient cette hypothèse; néanmoins, les mécanismes d'inhibition de ce site non cible par le Spinosad mériteraient d'être mieux étudiés.

**3. Effet sur les métabolites**

Les glucides, protéines et lipides ont des rôles physiologiques primordiaux, en particulier, dans la reproduction et le développement ainsi que dans les processus nutritifs et énergétiques. Ces principaux métabolites, synthétisés principalement dans le corps gras, sont ensuite secrétés dans l'hémolymphe et/ou utilisés par divers tissus (Cassier *et al*., 1997; Zhang & Xi, 2014). Par ailleurs ce sont des éléments essentiels dans l'évaluation de la «Fitness» chez l'insecte. En effet, les glucidesconstituent une source importante d'énergie pour les insectes et peuvent être convertis en lipides (Piri *et al*., 2014) représentant la principale source d'énergie (Malher & Gordes, 1968). Les protéines entrent dans diverses réactions telles que la régulation hormonale, les enzymes, les voies de signalisation ou encore les éléments structuraux des tissus (Cohen, 2010; Sugumaran, 2010). Les protéines sont importantes chez les insectes car elles sont liées à la taille du corps, au taux de croissance, et à la fécondité. Par ailleurs à des niveaux supérieurs de l'organisation, elles sont associées à la dynamique des populations, et aussi à la diversification biologique (Fagan *et al*., 2002). La teneur en protéines totales est aussi un paramètre souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez un organisme bioindicateur (Lin & Xu, 2016).

Les résultats montrent que les protéines diminuent chez les pupes et les adultes au cours de la génération G0. Cependant en G1, l'absence d'effet sur les protéines, correspondant à un retour vers des valeurs de base, est positivement correlé à un processus de détoxication plus important à ce stade. Cette diminution dans le contenu en protéines, après traitement au Spinosad, est aussi observée chez d'autres insectes (Elbarky *et al*., 2008; EL- Sheikh, 2012;

Rashwan, 2013;Piri *et al*., 2014;Tamam *et al*., 2014; Benchaabane *et al* .,2016) mais aussi chez les Vertébrés (Zidan, 2015). Des résultats similaires ont été enregistrés avec d'autres pesticides d'origine naturels comme l'Azadirachtine et l'huile de graines ou Karanj (*Pongamia pinnata*; Mohite *et al*., 2013). La réduction de ce métabolite peut être liée à une mobilisation importante de ces substances du fait de l'absence de nutriments causée par l'effet toxique du pesticide et/ou une diminution de leur synthèse, mais aussi à une élévation des enzymes de détoxication (Ortego *et al*., 1999). Les diminutions dans le contenu en protéines observées chez les pupes pourraient être expliquées par la métamorphose et l'élaboration des structures de l'adulte. Par ailleurs, chez les adultes, l'augmentation des protéines notées entre les âges seraient liées à la reprise d'un métabolisme actif dans les divers processus physiologiquesdont la reproduction.

Le Spinosad agit donc avec un effet différé sur le contenu en protéines et la diminution observée pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de compensation pouvant maintenir le métabolisme de l'organisme (Brisca Renuga & Sahayaraj, 2009; Piri *et al*., 2014).

Le Spinosad entraine également, chez *D.melanogaster*, une diminution dans le contenu en glucides, source d'énergie majeure, en accord avec la littérature chez d'autres espècesétudiées (El-Sheikh, 2012; Rashwan, 2013; Tamam *et al*., 2014; Piri *et al*., 2014; Benchaabane *et al.,* 2016). Dans nos résultats, l'effet différé du Spinosad est aussi observé pour les glucides, tout comme pour les protéines; en effet, les glucides diminuent chez la G0 mais aussi chez la G1. La baisse dans le contenu de glucides coïncide avec l'augmentation des activités du métabolisme de détoxication pendant l'exposition aux pesticides et donc par un besoin d'énergie accru (De Coen &Janssen, 1997; Verslycke *et al*., 2003; Sawczyn, 2012; Piri *et al*., 2014). Chez les séries traitées, les valeurs dans le contenu en glucides restent comparables entre les âges et ceci semble être en faveur d'une stabilité énergétique malgré le coût du stress toxique. Ce dernier pourrait aussi expliquer l'augmentation dans le contenu en glucides notée

entre les âges chez les pupes traitées du fait d'un besoin d'energie accru pour lutter contre le pesticide dès 24 heures après traitement. La diminution observée entre les âges chez les adultes des séries témoins peut être liée à l'énergie nécessaire pour l'activité des diverses fonctions physiologiques, et tout particulièrement le vol (Lehninger *et al*., 1993).

Chez l'adulte, la diminution observée dans le contenu en protéines et glucides peut être reliée à une interconversion en lipides d'où la stabilité de ces teneurs en G0 et chez les adultes de la G1; en effet, les lipides, deux fois plus caloriques par rapport aux glucides et aux protéines constituent une énergie mobilisable rapidement (Lehninger *et al*., 1993). Ce résultat est en accord avec ceux retrouvés dans la littérature après traitement de différentes espèces d'insectes au Spinosad (Tamam *et al*., 2014; Benchaabane *et al* .,2016). La baisse en lipides observée seulement chez les larves etles pupes de la G1 peut être expliquée par le besoin accru en énergie du fait de la détoxication plus importante observée à ces stades mais aussi à la stabilité des protéines.

Les diminutions dans le contenu en lipides observées chez les pupes témoins ou traitées pourraient être expliquées par l'énergie nécessaire pour la métamorphose avec la destruction des organes de la larve et l'élaboration des structures de l'adulte.

**4. Effet sur les vitéllogénines**

Chez *D. melanogaster*, la vitellogenèse est sous le contrôle principal de la 20E et de l'HJ (Wang *et al*., 2004, Bellés & Maestro, 2005; Swevers *et al.,* 2005); en outre, l'interaction entre ces deux hormones est essentielle dans la reproduction chez *D.melanogaster* (Gade *et al*., 1997; Swevers *et al.,* 2005; Gruntenko & Rauschenbach , 2009;Toivonen &Partridge, 2009).Le Spinosad inhibe la vitellogénèse en induisant une diminution dans les teneurs en vitellogénines dans les corps gras et les ovaires, au cours des premières 24 heures, chez les deux générations successives G0 et G1; ces effets similaires ont été notés chez *T. absoluta*

également traitée au Spinosad (Benchaabane *et al*., 2016). Cette réduction dans le contenu en vitellogénines, observée à toutes les heures testées est plus marquée à la G0 comparativement à la G1.L'induction plus importante des GSTs en G1 pourrait expliquer cette tendance de retour vers les normes physiologiques. L'effet différé sur la reproduction a été aussi noté par Gong*et al.,* (2015); en effet, les auteurs montrent que le Spinosad réduit la fécondité chez *Frankliniella occidentalis* de manière moins importante en G1 comparativement à la G0. Un impact similaire sur la fécondité et les vitellogénines a été retrouvé avec d'autres pesticides naturels comme l'azadirachtine chez divers insectes (Mordue et *al*., 2005; Liu *et al.,* 2012) notament *D.melanogaster*, Boulahbel *et al* .,2015).

Les effets du Spinosad sur le processus de vitellogénèse peuvent s'expliquer par l'impact du pesticide, particulièrement sur les protéines et la synthèse des vitellogénines *via* les variations dans le contenu en métabolites (Benchaabane *et al*., 2016). En effet, la stabilité dans les valeurs des protéines au cours de la G1 peut expliquer le retour vers des normes physiologiques pour les vitellogénines chez les adultes de la G1. Par ailleurs, l'impact du Spinosad sur la vitellogénèse peut aussi s'expliquer *via* la cytotoxicité observée dans les tissus comme les corps gras et les ovaires (synthèse des vitellogénines) après traitement au Spinosad (Anogwih *et al*., 2013). Des effets similaires sont aussi notés chez le Lepidoptère *T.absoluta* (Tomé *et al*., 2013; Benchaabane *et al* .,2016) avec le même pesticide. Un impact sur les différentes étapes du processus de reproduction est aussi observé chez d'autres Lepidoptères après traitement avec un autre pesticide naturel l'azadirachtine (Almeida *et al*., 2014).

Le Spinosad réduit le potentiel de reproduction chez différents espèces (Yin *et al*., 2009; Maiza *et al*., 2013; Wang *et al*., 2013; Piri *et al*., 2014); cette réduction dans la fécondité et la fertilité chez les femelles est expliquée par des perturbations endocrines, physiologiques et morphologiques (Piri *et al*., 2014). En effet, la réduction dans le contenu des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires chez *D. melanogaster* peut être expliquée par l'impact du

pesticide sur le système nerveux et ses effets indirects sur les neurohormones et hormones impliquées dans le contrôle endocrine de la reproduction (HJ et ecdystéroïdes); ceci de par les interrelations complexes entre ces différents systèmes.

Ainsi, le Spinosad, semble agir comme un perturbateur endocrinien affectant la vitellogénèse et donc la reproduction *via* les neurohormones et hormones qui jouent un rôle essentiel dans ces processus (Gade & Hoffman 2005; Swevers *et al*., 2005 ; De loof *et al*. 2014 ; Belles & Piulachs, 2015).

# CONCLUSION
# &
# PERSPECTIVES

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le Spinosad, testé par application topique, sur les larves de dernier stade de *D.melanogaster* présente une $DI_{50}$ de 288,50 ng. Chez cette espèce non cible, cette valeur plus importante, comparativement à d'autres insectes visés, reste néanmoins similaire à certains Lépidoptères ravageurs.

L'évaluation des activités spécifiques des biomarqueurs considérés appuie l'implication des GSTs dans la détoxication du Spinosad chez *D.melanogaster*. Les résultats montrent, au cours des deux générations, un stress oxydatif mais aussi l'induction d'un mécanisme de détoxication plus drastique en G1. Les valeurs de la CAT parfaitement corrélées avec celles des GSTs semblent confirmer le rôle important des GSTs dans le contrôle du stress oxydatif. L'inhibition de l'AChE, plus importante au cours de la G1 tend à supposer l'action indirecte du Spinosad sur ce site non cible et l'absence d'effets chez les pupes de la G0 appuie cette hypothèse.

Le Spinosad, induit une baisse dans les contenus en glucides et en protéines au cours des deux générations et de la G0 respectivement. Cette réduction est liée à un besoin d'énergie accru pour lutter contre la toxicité de la molécule. Le retour vers des normes physiologiques et/ou leur acquisition au cours de la G1 s'explique par l'important processus de détoxication concomitant. La stabilité dans le contenu en lipides chez les adultes, expliquée par une balance entre leur utilisation et leur stockage ou encore par une interconversion, permettrait le maintien du métabolisme. L'impact du Spinosad sur les métabolites essentiels pour la vitellogénèse peut contribuer à la réduction dans les contenus en vitellogénines (corps gras, ovaires) observée chez les femelles adultes au cours des deux générations. Ainsi, le Spinosad peut induire une inhibition de la reproduction *via* le processus de vitellogénèse comme déjà cité en littérature. L'effet différé explique l'impact négatif sur les paramètres reproductifs au cours des deux générations successives. En outre, si l'action primaire du

Spinosad est neurotoxique, il pourrait agir, secondairement, comme perturbateur endocrinien *via* les neurohormones et hormones. Ainsi, le Spinosad pourrait impacter les ecdystéroïdes et l'HJ, principales hormones impliquées dans la synthèse des vitellogénines. Par ailleurs, le Spinosad pourrait, *via* le système neuroendocrinien, affecter non seulement la reproduction mais toute régulation endocrine contrôlant diverses fonctions physiologiques.

Les expérimentations conduites ont donc mis en évidence l'effet indirect ou différé du Spinosad sur les stades qui suivent le traitement mais aussi sur la génération suivante démontrant ainsi la rémanence du Spinosad. Ce nouvel élément démontrant la persistance des effets toxiques chez *D.melanogaster* doit être pris en considération dans le contrôle des insectes ravageurs et ce, dans le cadre d'un programme de lutte intégrée. La faible toxicité du Spinosad envers les espèces non visées a fait de cette molécule un insecticide à recommander (Ramos *et al*., 2017; Li *et al*., 2017). Par ailleurs, l'absence de résistance sans pression de sélection fait du Spinosad un pesticide à privilégier dans les programmes de lutte intégrée (Campos *et al*., 2014; Afzal & Shad, 2017). Cependant, avant la mise en place d'un tel programme, il est essentiel de tester les effets du Spinosad dans les conditions naturelles afin de mettre en évidence les impacts sur les ennemis naturels; en effet, le Spinosad peut être sans effets ou encore modérément nuisible à nuisible sur ces espèces non cibles (Biondi *et al*., 2015; Mahdavi *et al.*, 2015; de Araujo, 2017; de França *et al*., 2017).

A l'avenir il serait intéressant, après obtention des souches de *D. melanogaster* résistantes au spinosad de comparer par différentes analyses moléculaires (extraction d'ADN génomique, et la polymérase chaîne réaction, purification et séquençage des amorces) et ce par rapport à des souches sensibles:

- les séquences et expressions des gènes cibles des insecticides afin de rechercher des modifications dans les nAchRs et gabaergiques, sites cibles du Spinosad.

- Mettre en évidence l'effet éventuel du Spinosad sur les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine.

Par ailleurs et du fait du développement de formulations qui utilisent le Spinosad en combinaison avec d'autres pesticides (Rizatti *et al*., 2016; Machekano *et al*., 2017) des évaluations de ces mixtures en laboratoire et en conditions naturelles s'avèrent indispensables.

# RESUMES

## RESUME

Le Spinosad, pesticide naturel, a été utilisé par application topique, sur les larves de dernier stade de *Drosophila melanogaster* puis évalué à différents stades au cours de deux générations successives (G0 et G1) afin de mettre en évidence les effets différés éventuels de la molécule.

Dans un premier temps, des tests de toxicité ont été effectués afin de préciser les doses d'inhibition (DI), dont la $DI_{50}$ qui a été retenue pour évaluer les effets du Spinosad sur les principaux métabolites (glucides, protéines et lipides) et sur les marqueurs de toxicité (GSTs, CAT, AChE) et de reprotoxicité (vitellogénines). Le Spinosad, chez *D.melanogaster,* entraîne une inhibition de la mue nymphale avec une relation dose-réponse; les DI déterminées grâce à une régression non linéaire, sont de 288.50 et 2963 ng pour les $DI_{50}$ et $DI_{90}$ respectivement. Le Spinosad, testé à la $DI_{50}$, induit un mécanisme de détoxication qui est observé chez les deux générations; en effet, l'augmentation des GSTs, chez les séries traitées, par rapport aux séries témoins, est retrouvée à tous les stades de développement de la G0 et de la G1. Il faut noter, cependant, que l'induction de l'enzyme est plus importante à la G1. Le profil des GSTs montre une parfaite corrélation avec celui de la CAT confirmant ainsi l'induction d'un stress oxydatif. La hausse de l'activité spécifique de la CAT est notée au cours des deux générations successives. Par ailleurs, le Spinosad entraîne une diminution significative de l'activité spécifique de l'AChE aux différents stades de la génération parent mais aussi ceux de la génération suivante. Le Spinosad entraîne, chez *D.melanogaster* une baisse dans les contenus en protéines et glucides au cours des deux générations successives mais le contenu en lipides demeure stable chez les adultes de la G0 et de la G1.

Le spinosad induit aussi une inhibition de la vitellogenèse pour les deux générations successives; en effet, une baisse dans le contenu en vitellogénines est observée dans le corps gras et les ovaires.

La comparaison entre les deux générations semble montrer un retour vers des valeurs de base pour la CAT, les métabolites et les vitéllogénines; ceci pourrait être lié à l'important processus de détoxication qui est induit en G1. L'effet observé sur l'AChE, plus drastique à la G1**,** suggère un effet indirect du Spinosad sur ce site non cible.

Ainsi, les résultats obtenus démontrent des effets différés du Spinosad et mettent donc en évidence la rémanence de ce pesticide.

**Mots clés**: *Drosophila* - Spinosad - Toxicité - Stress - Vitellogénese - Métabolites - Rémanence.

## ABSTRACT

Spinosad, a natural pesticide, was used by topical application on the last stage of *Drosophilamelanogaster* and was evaluated at different stages during two successive generations (G0 and G1).

Initially, toxicity tests were carried out to specify inhibition doses (DI), the DI50 was chosen to evaluate the effects of Spinosadon the main metabolites (carbohydrates, proteins and lipids) and toxicity markers (GSTs, CAT, AChE) and reprotoxicity (vitellogenins). Spinosad, in *D. melanogaster*, results in inhibition of nymphal moult with a dose-response relationship; The DIs determined by a nonlinear regression is 288.50 and 2963ng for the DI50 and DI90 respectively.

The Spinosad, tested at the DI50, induces a mechanism of detoxification which is observed in both generations. Therefore, the increase in GSTs assayed, in the different treatment series, comparatively to those of control, is found at all stages of development of G0 and G1. It should be noted however, that the induction of the enzyme is more important at G1.The profile of the GSTs shows a perfect correlation with that of the CAT thus confirming the induction of an oxidative stress. The increase in the specific activity of the CAT assayed is noted during the two successive generations. Furthermore, Spinosad results in a significant decrease in the specific activity of AChE assayed at the different stages of the parental generation but also those of the next generation. Spinosad induced a decrease in protein content in *D. melanogaster* and carbohydrates in the two successive generations, but the lipid content remained stable in G0 and G1 adults. Spinosad also induces an inhibition of vitellogenesis with a decrease in the content of vitellogenins dosed in the body and ovaries for the two successive generations. The comparison between the two generations seems to show a return to basic values for CAT, metabolites and vitellogenins; this could be related to the

important detoxification process that is induced in G1. The observed effect on AChE, more drastic at G1, suggests an indirect effect of Spinosad on this non-target site.

Thus, the results obtained show deferred effects of Spinosad and thus show the persistence of this pesticide.

**Key Words:** *Drosophila*, Toxicity, Spinosad, Stress, Vitellogenesis, Metabolites, persistence.

## الملخص

Spinosad ،مبيدطبيعي، استخدمبواسطةالتطبيق الموضعي المجرى علىيرقاتالطورالثالث لذ بابة الفواكه *D. melanogaster*وتمتقييمه علىمراحل مختلفة خلالجيلين متعاقبين (G0 وG1) من أجل تسليط الضوء على التأثيرات المتأخرة الممكنة للجزيء.

في البداية،تم إجراء اختبارات السمية لتوضيح الجرعات المثبطة (ID)، وقد تم اختيار $DI_{50}$ لتقييم آثار Spinosad على الأيض الأساسية (الكربوهيدرات والبروتينات والدهون) ومؤشرات السمية (GSTs، CAT و AChE )، و مؤشر السمية التناسلية (vitellogenines).

يسبب Spinosad عند*D.melanogaster* تثبيط اانسلاخ العذراء مع وجود علاقة بين الجرعة والاستجابة.جرعا تتثبيط (DI)تمتحديدها باستخدام المنحنى الغير الخطي، هي من 288.50 ngلDI50 و 2963ng لDI 90 .

اختبارSpinosad بجرعة المميةDI $_{50}$) ادىالىتنشيطآليةإزالةالسمومملاحظ عند الجيلين. زيادة GSTs، عند السلسلة المعالجة مقارنةبالشهود، وجدت في كل مراحل النمو عندG0 و عند G1. وتجدر الإشارة إلى أن تحريض انزيم مزيل للسموم أكبر في G1. نتائج GSTs تبين وجود علاقة إنسجام, معCAT) تؤكد إحداث الإجهاد التأكسدي. في الواقع، يتم تسجيل زيادة في نشاط (CAT) عند الجيلين المتعاقبين. علاوة على ذلكادى ، Spinosad إلى انخفاض كبير في نشاط (AChE)عند مختلف مراحل G0 ، و أيضا عند الجيل المقبل. يسببSpinosad، عند*D.melanogaster*، انخفاض في محتوىالبروتينات و الكربوهيدرات في الجيلين لكن يبقى محتوى الدهون مستقرعند البالغينG1 وG0.Spinosadادى أيضا إلى تعطيلتكوينالمح عندأنثىبالغة *D.melanogaster* ،مع انخفاض في محتوى vitellogenines فيالدهونالجسموالمبيضين للجيلين المتعاقبين. لمقارنة ما بين الجيلي يبد و أنها تبين الرجوع نحو القيم الأ ساسية عند،CAT ،الأيضو vitellogenines ، يمكن ان تكون مرتبطةبأهمية عملية إزالة السموم التي يسببها عندG1.التأثير الملاحظ علىAChE بشكل كبير عندG0 ،يقترح تأثير غير مباشرل Spinosad على هذا الموقع الغير مستهدف. و هكذا ،النتائج المتحصل عليها تبين الأ ثار المتأخرة لSpinosad و تسليط الضوء على إستمرار هذا المبيد.

**كلماتمفتاحية:** - Spinosad-*Drosophila*-السمية- الإجهاد - تكوينالمح-الإستقلاب.-استمرار

# REFERENCES
# BIBLIOGRAPHIQUES

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abbas N., Khan H. & Shad S.A. 2015.** Cross-resistance, stability, and fitness cost ofresistance to imidacloprid in *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Parasitol Res.***114**(1): 247-255.

**Abbott W.S. 1925.** A method for computing the effectiveness of insecticide.*J Econ Entomol***18**: 265-267.

**Abdelsalam S. A., Alzahrani A. M., Elmenshawy O. M. & Abdel-Moneim A.M. 2016**. Spinosad induces antioxidative response and ultrastructure changes in males of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *J. Insect Sci*. **16**(1): 106; 1-10

**Abhilash P.C. & Singh N. 2009.** Pesticide use and application: An Indian scenario. *JHazard Mater.* **165**(1-3): 1-12.

**Adak T., Mukherjee I.2016**. Investigating Role of Abiotic Factors on Spinosad Dissipation. *Bull.Environ.Conta. Toxico.***96**(1):125-129.

**Afzal M.B.S, ShadS.A. 2017.**Spinosad resistance in an invasive cotton mealybug*Phenacoccus solenopsis*: Cross-resistance, stability and relative fitness. *J.Asia Pacific Entomo.***20** :457-462.

**Almeida G.D., Zanuncio J.C., Senthil-Nathan S., Pratissoli D., Polanczyk. R.A., AzevedoD.O. & Serrão J.E. 2014.**Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatali* **(**Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Int Sci J*.**11**: 79-86.

**Alout H., Berthomieu A., Hadjivassilis A. & Weill M., 2007.** A new amino-acidsubstitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens*mosquitoes from Cyprus. *Insect.Biochem. Mol. Biol.* **37**(1): 41-7.

**Andreazza F., Bernardi D.,Baronio C., Pasinato J., Nava D.E., & Botton M.2017.**Toxicities and effects of insecticidal toxic baits to control *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae).*Pest Manag Sci* **73**:146-152 .

**Anjum S.I., Yousf M.J., Ayaz S. & Siddiqui B.S. 2010.** Toxicological evaluation ofchlorpyrifos and neem extract (biosal b) against 3rd instars larvae of *Drosophilamelanogaster. J Anim Pl Sci.* **20** (1): 9-12.

**Anogwih J.A., Makanjuola W.A. &Chukwu L.O.2013.**Spinosad induced cytogenotoxiceffects on the mosquito fish, *Poecilia reticulata*. *J Clinic Toxicol*. S12-001.

**Arain M.S., Wan P.J., Shakeel M., Farooq M., Hu X.X., Shah S.A.H, Elzaki MEA 1 Li G.Q. 2017.** Toxicity of butene-fipronil, in comparison with seven other insecticides, in *Leptinotarsa decemlineata* and *Drosophila melanogaster*. *Phytoparasitica* **45**(1): 103–111.

**Asplen M., G. Anfora A. Biondi D., Choi D., Chu K., Daane P., Desneux, N 2015.**Invasion biology of spottedwing Drosophila (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *J. Pest Sci.* **88**: 469-494.

**Awan D.A., Saleem M.A., Nadeem M.S., Shakoori A.R. 2012**. Toxicological andbiochemical studies on Spinosad and synergism with piperonyl butoxide in susceptible and resistant strains of *Tribolium castaneum*. *Pakistan J. Zool*. **44** (3): 649-662.

**Bellés X. & Maestro J.L. 2005.** Endocrine peptides and insect reproduction.*Invert. Reprod. Dev*. **47**(1): 23-37.

**Belles X. & Piulachs M.D. 2015.**Ecdysone signalling and ovarian development in insects:from stem cells to ovarian follicle formation. *Biochim Biophys Acta* **1849** (2): 181-186.

**Benchaabane S., Aribi N., Kilani-Morakchi S. & Chaabane M. 2016.**Delayed toxic effects of spinosad on G1 progeny of an invasive species, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Afr Entomol*. **24** (2):412-420.

**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 Manag Sci.* **67**(5): 541-547.

**Bezzar-Bendjazia R., Kilani-Morakchi S. & Aribi N., 2016**. Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition sitepreference of *Drosophila melanogaster*. *Pest Biochem.and Physiol.* **133**: 85-90.

**Bhatta D.,Henderson G. & Gautam B.K. 2016.** Toxicityand nonrepellency of Spinosad andSpinetoram on *formosan subterranean* termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Econ. Entomol*.**109**(3):1341-1349.

**Biondi A., Desneux N., Siscaro G. & Zappalà L. 2012.**Using organic-certified rather thansynthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere*.**87**: 803-812.

**BirchA E., Begg G. S &Squire G. R. 2011.** How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems.*J Exp Bot* .**62** (10): 3251-3261.

**Blacquière T., Smagghe G., Van Gestel C. A. & MommaertsV. 2012.**Neonicotinoids inbees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotox*. **21** (4): 973-992.

**Board P.G. & Menon D. 2013.** Glutathione transferases, regulators of cellular metabolismand physiology. *Biochim Biophys Acta* **1830** (5): 3267-3288.

**Boeke S.J., M.G. Boersma G.M. Alink J.J.A. van Loona A., van Huis M. 2004**. Dicke, Rietjens IMCM, safety evaluation of neem (Azadirachta indica) derived pesticides, *J.Ethno.pharmacol*. **94**:25-41

**Bond J.G., Marina C.F. & Williams T. 2004.** The naturally derived insecticide spinosad inhighly toxic to *Aedes* and *Anopheles mosquito* larvae. *Med Vet Entomol.***18**: 50-56.

**Bonmatin J.M., Giorio C., Girolami V., Goulson D., Kreutzweiser D., Krupke C., Liess M., Long E., Marzaro M., Mitchell E., Noome D.,Simon-Delso N., Tapparo A. 2014.** Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res*. **22**(1): 68-102.

**Bouharmont, J., Masson, P.L. & Van Hove, C. 2007.** Biologie. Révision scientifique deCharles- Marie Evrard. Edition *De Boeck Université*. **386:** 1250p.

**Boulahbel B., Aribi N., Kilani-Morakchi S. & Soltani N. 2015.**Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone. *Afr Entomol.***23** (1): 224-233

**Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.***72**: 248-254.

**Brisca Renuga F. & Sahayaraj K. 2009.**Influence of botanicals in total head protein of *Spodoptera litura* (Fab.). *J Biopest*. **2**(1): 52-55.

**Bruce T.J.A. 2010.** Tackling the threat to food security caused by crop pests in the new millennium. *Food Sec.* **2**: 133-141.

**Cabrera-Marín N.V., Liedo P., Sánchez D. 2016.** The effect of application rate of GF 120(Spinosad) and Malathion on the mortality of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) foragers. *J Econ Entomol*. **109** (2):515-519.

**Cantrell, C.L., Dayan, E.F. & Duke, S.O. 2012.** Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod.* **75** (6): 1231-1242.

**Carvalho S.M., Belzunces L.P., Carvalho G.A., Brunet J.L. & Badiou Beneteau A. 2013.** Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study ofexposure ofthe honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ Toxicol Chem.***32**: 2117-2124.

**Casida J.E. & Durkin K.A. 2013.** Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance,and secondary effects. *Annu.Rev.Entomol.* **58**: 99-117.

**Casida J.E. & Quistad G.B. 1998.** Golden age of insecticide researchpast present of future? *Ann.Rev.Entomol*. **43**: 1-16.

**Cassier P., Descamps M., Lafont R., Porchet M. & Soyez D. 1997.** La reproduction des invertébrés: Stratégies, modalités et régulation intérêt fondamental et appliqué. *Edition Masson Paris*. 354p.

**Chakrabarti P., Rana S., Sarkar S., Smith B. & Basu P. 2015.** Pesticide-inducedoxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. *Apidologie*. **46**(1): 107-129.

**Claiborne A. 1985.** Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 283–284.

**Cohen E. 2010.** Chitin biochemistry: synthesis, hydrolysis and inhibition. *Adv.InsectPhysiol*.**38**: 5-74.

**Cohen S.Z.,Creeger S.M.,CarselR.F.,EnfieldCG. 1984**. Potential pesticide contamination of ground water from agricultural uses. *Treatment and disposal of pesticide wastes* chapter 18 *ACS Symposium Series***, 259**: 297–325.

**Colombani J., Bianchini L., Layalle S. & Léopald P. 2006.** Stéroïdes, insuline et croissance: Les mouches dopent la recherche/ stéroïds, insulin and growth: The files.dope the research. *Medecine Sci.* **22**(3): 241-243.

**Comoretto L. & Chiron S. 2005.**Comparing pharmaceutical and pesticide loads into asmall Mediterranean river. *Sci Total Environ*. **349**(1-3): 201-210.

**Dasenaki M.E., Bletsou A.A., Hanafi A.H. & Thomaidis N.S. 2016.** Liquid chromatography tandem mass spectrometric methods for the determination of spinosad, thiacloprid and pyridalyl in spring onions and estimation of their pre-harvest interval values. *Food Chemistry***. (213)**:395–401.

**de Araújov T.A., Picanço M.C., Ferreira D.O., Campos J.N.D.,d e Arcanjo L.P., Silva G.A. 2017.** Toxicity and residual effects of insecticides on *Ascia monuste* and predator *Solenopsis saevissima. Pest.Manag.Sci.* DOI:10.1002/ps.4603.

**De Coen W.M. & Janssen C.R. 1997.** The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicitytesting. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget oftoxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* **6**: 43-55.

**De Deken R., Speybroeck N., Gillain G., Sigue H., Batawi K. & Bossche P.V.D. 2004.** Themacrocyclic lactone « spinosad » A promising insecticide for tsetse fly control. *J Med Entomol.* **41**: 814-818.

**de França S.M., Breda M. O., Barbosa D. R. S., Araujo M. N. &. Guedes C. A. 2017**.The sublethal effects of insecticides in Insects: Biological control of pest and vector insects In: VonnieD.C. Shields (Ed): *Agricultural and Biological Sciences*. DOI:10.5772/66461.

**De Loof A., De Haes W., Janssen T. & Schoofs L. 2014.** The essence of insect metamorphosis and aging: Electrical rewiring of cells driven by the principles of juvenile hormone-dependent $Ca^{2+}$ homeostasis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **199**: 70-85.

**Deravel J., Krier F. & Jacques P. 2014.** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **18** (2):220-232.

**Dhadialla T.S., Retnakaran A. & Smagghe G. 2005.** Insect growth and development disrupting insecticides. In: Gilbert L.I., Iatrou K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Insect Molecular Science*, Elsevier, Oxford, UK.**6**: 55-116.

**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.

**Di Priscoa G., Cavaliereb V., Annosciac .D., Varricchioa P., Caprioa E., F. Nazzic, Gargiulob G., & Pennacchioa F. 2013**.Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS.* **110** (46):18466-18471.

**Dimetry N.Z. 2015.** Different plant families as bioressource for pesticides. In: Singh, D. (Ed): *Advances in Plant Biopesticides*. Springer, New York, Dordrecht, London: 1-20.

**Dua V.K., Pandey A.C., Raghavendra K., Gupta A., Sharma T. & Dash A.P. 2009.** Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria J* **8:** 124-129.

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

**Duchet C., Franquet E. , Lagadic L. , Lagneau C. 2015**. Effects of Bacillus thuringiensis israelensis and spinosad on adult emergence of the non-biting midges *Polypedilum nubifer* (Skuse) and *Tanytarsus curticornis Kieffer* (Diptera:Chironomidae)in coastal wetlands. *Ecotox.Environ. Saf.* **115**: 272-278.

**El Joubari M., Faraj C., Louah A., Himmi O. 2015.** Sensibilité des moustiques *Anopheles labranchiae, Culex pipiens, Ochlerotatus detritus et Ochlerotatus caspius* de la region de Smir (Nord-Ouest du Maroc) aux organophosphores utilises en sante publique. *Environ. Risque Sante* **14** : 72-79.

**El-barky-Nehad M., Dahi H.F. & El-Sayed Y.A. 2008.** Toxicological evaluation andbiochemical impacts for radient as a new generation of spinosyn of *Spodoptera littoralis* (Boisd.), larvae. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.* **1** (2): 85-97.

**Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. & Featherstone R.M. 1961**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* **7**: 88-95.

**El-Sheikh T.A.A. 2012.** Biological, biochemical and histological effects of spinosad, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* and cypermethrin on the Cotton leafworm, *Spodopteralittoralis* (Boisd.)*, Egypt. Acad J Biolog Sci*. **4**: 113-124.

**Enayati A. A., Ranson H., & Hemingway J. 2005.** Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.***14**: 3–8.

**Fabre M.C., Descamps M. & Baert J.L. 1990.** Identification and partial characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulata* Latreille (Myriapoda Chilopoda). *In Proceedings of the* 8th International Conference on Myriapodology, Innsbruck, Austria.Ber.nat.ined. Verein Innsbruck. 117-121.

**Fagan W. F., Lewis M. A., Neubert M. G., Van den Driessche P. 2002.**Invasion theory and biological control. *Ecol. Lett*. **5**:1–10.

**Fisher R.A. & Yates F. 1957.** Statical tables for biological agricultural and medical research. 5eme edition, Olivier & Boyd.London. 64-66p.

**Fraenkel G. &BhaskaranG. 1973 .**Pupariation and Pupation in *Cyclorrhaphous Flies* (Diptera): Terminology and Interpretation1. *Ann Entomol Soc Am* .**66** (2): 418-422.

**Frasco M.F. & Guilhermino L. 2002.** Effects of dimethoate and betanaphthoflavone onselected biomarkers of *Poecilia reticulate*. *Fish Physiol. Biochem.***26**: 149-156.

**Fujiwara K., Koyama S., Fukuhara T., Miyake N., Yamasaki A., Kataoka H., Kitano H. & Takeuchi H.2016.** Transoral surgery for HIV-infected patient with pharyngeal cancer and supraglottic cancer: A case study and literature review. *Acta Oto laryng.case reports*, **1**(1):113-118.

**Fulton M., Key P.B. 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine Fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticides exposure and effects. *Environ.Toxicol.Chem.* **20**:37-45.

**Gäde G. & Hoffmann K.H. 2005.**Neuropeptides regulating development and reproductionin insect.*Physiol Entomol.***30**: 103-121.

**Gäde G., Hoffmann K. H. & Spring J.H. 1997.** Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future direction. *Physiol rev.* **77**(4): 963-1032.

**Gangé F., Pardos M. & Blaise C. 1999.** Estrogenic effects of organic environmentalextracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. *Bull Environ Contam Toxicol.***62**(6): 723-730.

**Ghanim M. & Ishaaya I. 2010.**Insecticides with novel modes of action: mechanism andresistance management. In: Ishaaya, I. & Degheele, D. (eds). *Insecticides with novelmodes of action: mechanism and application.* Springer, Berlin.385-407.

**Goldberg L.J. & Margalit J. 1977.** A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univitattus, Aedes aegypti,* and *Culex pipiens*. Mosquito News **37**: 355-358.

**Goldsworthy G.J., Mordue W. & Guthkelch J. 1972**. Studies on insect adipokinetichormones.*Gen. Comp. Endocrinol.***18**: 545-551.

**Gong**, **Y., Xu B., Zhang Y., Gao X. & Wu Q. 2015.** Demonstration of an adaptive response to preconditioning *Frankliniella occidentalis* (Pergande) to sublethal doses ofspinosad: ahormetic-dose response. *Ecotox*. **24**(5):1141-51.

**Goudey-Perrière F. & Perrière C. 1974.** Guide de travaux pratiques de Zoologie et de Biologie Animale. Paris *Centre de documentation universitaire*.Vol **2.**100p

.

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

**Griffiths A.J.F., Miller J. H., Suzuki D. T., Sanlaville C., Lewontin R. C. & Gelbart W.M. 2002.** Introduction a l'analyse genetique. 3eme édition *De Boeck Université*. 860p.

**Gupta R.C. & Milatovic D. 2014.** Insecticides. In: Gupta, R.C. (Ed). *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, Elsevier, Amsterdam. 389-407

**Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B. 1974.** Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* **249** (22): 7130-7139.

**Hellou J., Lebeuf M., & Rudi M. 2013.** Review on DDT and metabolites in birds and mammals of aquatic ecosystems. *Environ. Rev.***21**: 53-69.

**Højland D.H., Kristensen M .2017**. Analysis of differentially expressed genes related to resistance in spinosad- and neonicotinoid-resistant *Musca domestica*L. (Diptera: Muscidae) Strains.*PLoS ONE* **12**(1): e0170935. doi.org/10.1371/journal.

**Hsu A.C.T. 1991.** 1,2-Diacyl-1-alkyl-hydrazines; a novel class of insect growth regulators.In: Baker DR, Fenyes JG, Moberg WK (eds.); Synthesis and Chemistry of Agrochemicals II, ACS Symp. Ser., Washington, DC, *Am. Chem. Soc*. **443**: 478-490.

**HuanZ.,Luo J.,Xu Z.,Xie D.2015.**Residues, dissipation, and risk assessment ofspinosadin cowpea under open field conditions. *Environ Monit Assess*.**11**:706p.

**Ishaaya I. 1990.** Benzoylphenyl-ureas and other selective control agent, mechanism and application In: Cassida, J.E. (Ed) *Pesticides and alternatives.* Elsevier, Amsterdam, Netherlands 365-376.

**Ishaaya I., Horowitz A.R., 1998.** Insecticides with novel mode of actions: overview. *In*:I shaaya I., Degheel D. (*Eds*). Insecticides with novel mode of action mechanisms and application.*Springer.Berlin Heidelberg New York,* 1-24.

**Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. 2011.** Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem* **59**:2897-908.

**Jeschke, P.; Nauen, R. 2005.** Neonicotinoid insecticides. In *ComprehensiveMolecular Insect Sciences*; Gilbert, L. I., Iatrou, L., Gill, S. S., Eds.; Elsevier: Oxford, U.K., **5**:53-105.

**Jouandin, P. 2013.** Rôle de la voie de signalisation « Insuline » dans le couplage des informations nutritionnelles et développementales au cours de l'ovogénèse chez la drosophile. Thèse de Doctorat.Université de Nice Sophia-Antipolis.226 p.

**Kanwer S .A, Muhammad Z.M., Azhar Abbas H., Naveed H.2016.**Integrated pest management tactics and predatory coccinellids: A review. *J. Entomo. Zool .S* .**4**(1):591-600.

**Kavi L.A.K., Kaufman P.E. & Scott J.G. 2014.** Genetics and mechanisms of imidaclopridresistance in house flies.*Pest Biochem Physiol.* **109**: 64–69.

**Khan H.A., Akram W. & Shad S.A. 2014.** Genetics, cross-resistance and mechanism of resistance to spinosad in a field strain of *Musca domestica L.* (Diptera: Muscidae).*Acta Trop*.**130**:148-54.

**Khan H.A., Akram W., Arshad M.& Hafeez F. 2016.**Toxicity and resistance of field collected *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) against insect growth regulator insecticides.*Parasitol Res*.**115**(4):1385-90.

**Kirst H.A. 2010.** Spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J Antibiot* .**63** (3): 101-111.

**Kohler H.R. & Triebskorn R. 2013.**Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we traceffects to the population level and beyond? *Sciences*. **341** (6147): 759-765.

**Konuş M. 2015.** Effects of Oxidative Stress on xenobiotic metabolizing enzymes in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Turk.J.Biochem*. **40** (2):175-180.

**Kulkarni J., Kapse N. & Kulkarni D.K. 2009.**Plant based pesticides for control of *Helicoverpa armigera* on *Cucumis sativus*. *Asian Agric Hist.* **13**(4): 327-332.

**Lai D., Jin X., Wang H., Yuan M. & Xu H. 2014.** Gene expression profile change andgrowth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *J Biotechnol.***185**:51-56**.**

**Lavialle-Defaix C., Moignot B., Legros C. & Lapied B. 2010.** How does calcium-dependentintracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons? *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **333**(1): 264-72.

**Le DP., Thirugnanam M., Lidert Z., Carlson G.R., Ryan J.B. 1996.** RH-2485: a new selective insecticide for caterpillar control. *Conf. Pests Dis*. **2**: 481-486.

**Leach H., Van Timmeren S., & Isaacs R.2016.** Exclusion Netting delays and reduces *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) infestation in raspberries. *J Econ Entomol.* **109** (5): 2151-2158.

**Legwaila M.M., Munthali D.C., Obopile M. & Kwerepe B.C. 2013.** Effectiveness of Spinosad against diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) eggs and larvae on cabbage under Botswana conditions. *J .Insect .Sci.* **6:** 15- 21.

**Lehninger A.L., Nelson D.L. &Cox M.M. 1993.** Principles of biochemistry, 2nd.ed.Worth publishers, New-York.400p.

**Li X ., Wan Y., Yuan G ., Hussain S., Xu B., Xie W., Wang S., Zhang Y., Wu Q . 2017.** Fitness trade-off associated with spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J.Econ.Entomol*. **110**(4):1755-1763.

**Li X.. 2009**. Glutathione and Glutathione-S-Transferase in detoxification mechanisms In:Ballantyne, B., Marrs, T. & Syversen, T. (Eds). *General and Applied Toxicology*, (ThirdEdtion). John Wiley & Sons, Ltd, Chicheste, UK.411-423.

**Lin X.W. & Xu W.H.2016.** Hexokinase is a key regulator of energy metabolism and ROS activity in insect lifespan extension. *Aging (Albany NY)*. **8**(2): 245-258**.**

**Liu N. & Yue X. 2000.** Insecticide resistance and cross- resistance in the house fly (Diptera:Muscidae). *J. Econ. Entomol.***93**: 1269-1275.

**Liu X., Chen M., Collins H.L., Onstad D., Roush R., Zhang Q. & Shelton A.M. 2012.** Effect of insecticides and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) genotype on a predator and parasitoid and implications for the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol*. **105**(2): 354-62

**Lombet A., Mourre. C. & Lazdunski M. 1988.** Interaction of insecticides of the pyrethroid family with specific binding sites on the voltage-dependent sodium channel from mammalian brain. *Brain Research.***459** (198): 44 -53.

**Lonare M., Kumar M., Raut S., Badgujar P., Doltade S. & Telang A. 2014.** Evaluation o fimidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. *Neurochem Int*.**78**:122- 9.

**Long E.R. 2000.** Degraded sediment quality in US estuaries: A review of magnitude and ecological implications. *Ecol Appl.* **10** (2):338-349.

**Lynn O.M., Kim J.E. & Lee K.Y. 2012.** Effects of azadirachtin on the development andgene expression of fifth instar larvae of Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *J.Asia Pacific. Entomol.* **15**(1): 101-105.

**Machekano H., Mvumi B.M., Chinwada P., Richardson-Kageler S.J., RwafaR. 2017.** Efficacy of diatomaceous earths and their low dose combinations with spinosad or deltamethrin against three beetle pests of stored-maize.*J .Stor.Prod Resear*.**72**: 128-137.

**Mahdavi V., Saber M., Rafiee-Dastjerdi H., Kamita S. G.2015.** Lethal and Demographic Impact of chlorpyrifos and spinosad on the ectoparasitoid *Habrobracon hebetor*( Say) (Hymenoptera: Braconidae). *Neotrop Entomo*.**44**(6):626-633.

**Maiza A., Aribi N., Smagghe G., Kilani-Morakchi S., Bendjedid M. & Soltani N. 2013.** Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad and indoxacarb incockroaches *Blattella germanica. Bull. Insectology.***66**(1): 11-20.

**Malher H.R & Cordes E.H. 1968.** Biological chemistry Harper and Row.*Med Physiol*Vol.1, C.V. Mosby Co, St Louis, 12th edn.

**Matsuura A. & Nakamura M. 2014.**Development of neonicotinoid resistance in thecotton aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) in Japan. *Appl Entomol and Zool.***49**(4): 535-540.

**Mckay T., Bianco T., Rhodes L. & Barnett S. 2013.** Prevalence of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) in mosquitoes from northeast Arkansas, the UnitedStates. *J.Med. Entomol*. **50**(4): 871-878.

**Meigen J.W. 1830.** Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. *Hamm.* **6**: p.401.

**Mertz F.P. & Yao R.C. 1990.** *Saccharopolyspora spinosa* sp. novel isolated from soil collected in a sugar mill rum still. *Int J Syst Bacteriol*. **40**(1): 34-39.

**Misra J.R., Horner M.A., Lam G. & Thummel C.S. 2011.** Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila.Genes Dev*. **25**(17): 1796-1806.

**Mkenda P., Mwanauta R., Stevenson P.C, Ndakidemi P., Mtei K., Belmain S.R. 2015.** Extracts from field margin weeds provide economically viable and environmentally benign pest control compared to synthetic pesticides. PLoS ONE **10** (11):e0143530.doi:10.1371/journal.pone.0143530

**Mohite A., Dahegaonkar J. & Dorlikar A. 2013.** Effect of seed kernel oils of *Azadirachta indica* and *Pongamia pinnata* on carbohydrate and protein contents in fifth instar larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol Gen*. **34**:181-188.

**Mordue L.A.J., Morgan E.D. & Nisbet A.J. 2005.** Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *ComprehensiveMolecular Insect Science.*Elsevier, Oxford, UK.**6**: 117-135.

**Mordue L.A.J., Morgan E.D. & Nisbet A.J. 2010.** Addendum: Azadirachtin, a naturalproduct in insect control: An update. In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds). *Insect Control.*Elsevier, Oxford, UK.204-206.

**Nässel D.R., Broeck J. V.2015.** Insulin/IGF signaling in Drosophila and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides *Cell.Mol.life .Sci*. **73** (2): 271-290.

**Nicolopoulou-Stamati P.,Maipas S.,Kotampasi C.,Stamatis P.,Hens L. 2016.**Chemical pesticides and Human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front Public Health.***4**:148

**Noureen N., Hussain M., Samman F & Mobeen G. 2016.** Cotton mealy bug management: a review.*J.Entomo.Zoology Studies* .**4**(4): 657-663.

**Nozad-Bonab Z., Hejazi M.J., Iranipour S.H., Arzanlou M. 2017.** Lethal and sublethal effects of some chemical and biological insecticides on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) eggs and neonates. *J. Econ. Entomol* .**110** (3): 1138-1144.

**Olson S. 2015.** An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Out looks on Pest Management*.**26**: 203-206. DOI: 10.1564/v26.

**Orhan A., Aslantaş R., Şebnemönder B., Tozlu G. 2016**. First record of the invasive vinegar fly *Drosophila suzukii* (Matsumura)(Diptera: Drosophilidae) from eastern Turkey. *Turk J Zool*.**40**: 290-293.

**Ortego F., López-Olguì N.J., Ruìz M. & Castañera P. 1999.** Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato larvae. *Pest.Biochem.Physio*. **l63**:76-84.

**Osorio A., Martinez A.M., Schneider M.I., Diaz O., Corrales J.L., Aviles M.C., Smagghe G. & Pineda S. 2008.** Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico.*Pest Manag Sci*. **64**(10): 1001-1007.

**Pan L, Shi M., Chen J., Wei Q & Gao C.2017.** Resistance monitoring of larvae treated with Bt cotton and pesticides in *Helicoverpa armigera (*Lepidoptera: Noctuidae) *Oriental Insects*. doi.org/10.1080/00305316.2017.1283254

**Parvathi D.V., Amritha A. S. & Paul S.F.D. 2009.** Wonder animal model for genetic studies *Drosophila melanogaster* its life cycle and breeding methods a review. *SriRamachandra J.Med.* **2**(2): 33-38.

**Pener M.P. & Dhadialla T.S. 2012.** An overwiew of insect growth disruptors; applied aspects.*Adv.Insect.Physiol*.**43**:1-162.

**Pereira B.B., Caixeta E. S., Freitas C .P., Vieira Santos V., Limongi E. J., de Campos Júnior E. O., Campos C. F., Souto H.N., Rodrigues T.S & Morelli S. 2016.**Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivorous fish. *J. Toxicol.Environ. Health*, Part A, **79** (12):477-481.

**Pimentel M.A.G., Faroni L.R.A., Corrêa A.S., Guedes R.N.C., 2012**. Phosphine-induced walking response of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica). Pest Manag Sci*. **68**:1368-1373.

**PinerP. &ÜnerN.2012.** *In vivo* acetylcholinesterase inhibition in the tissues of Spinosad exposed *Oreochromis niloticus.Environ.Tox. Pharma.***34** (2): 473-477.

**Piri F., Sahraga A., Ghadamyari M. 2014.** Sublethal effects of spinosad on somes biochemical and biological parameters of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Plant Protect. Sci*. **50**(3): 135-144.

**Postlethwait J.H., Bownes M. & Jowett T. 1980.** Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster. Dev Biol.* **79**(2): 379–387.

**Profaizer D., Chiesa S., Zadra E.,Tomasi C. & Angeli G.2014.** Evaluation of chemical pesticides activity against *Drosophila suzukii* on blueberry. *Atti Ggiornate fitopatologiche,Chianciano Terme* (Siena) **1**:275-282.

**Qiao J., Zou X., Lai D., Yan Y., Wang Q., Li W., Deng S., Xu H. & Gu H. 2014.** Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila. Pest Manag Sci.* **70** (7):1041-1047.

**Quinn L., Lin J., Cranna N., Lee J.E.A., Mitchell N. & Hannan R. 2012.** Steroid hormones in *Drosophila*: How ecdysone coordinates developmental signalling withcell growth and division. In: Abduljabbar, H. (Ed). *Steroid Basic Science*. Intech,Rijeka. 141-168.

**Ra, V.J., Srikanth K., Arepalli S.K. & Gunda V.G. 2006.**Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pest Biochem .Physiol*. **86**: 131-137.

**Rabea E.I.,Nasr H.M. & Badawy M.E. 2009.** Toxic effect and biochemical study ofchlorfluazuron, oxymatrine, andspinosad on honeybees(*Apismellifera*). *Arch Environ Contam Toxicol.***58**: 722-732.

**Ramos R. S., Sediyama C. S., Queiroz E. A., Costa T. L., Martins J. C., Araujo T. A. & Picanc M. C. 2017**.Toxicity of insecticides to *Chrysodeixis includens* and their direct and indirect effects on the predator *Blaptostethus pallescens* . *J. Appl. Entomol*. doi: 10.1111/jen.12382.

**Rashwan M.H. 2013.** Biochemical Impacts of Rynaxypyr (Coragen) and Spinetoram (Radiant) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.) *Nat Sci.* **11**(8): 40-47.

**Rauschenbach I.Y. , Karpova E.K. , Burdina E.V., Adonyeva N.V., Bykov R.A., Ilinsky Y.Y., MenshanoP.N, Gruntenko N.E. 2017**. Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females**.** *General.Comp. Endocri.***243**:1-9.

**Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle BM., Rauh JJ., Sattelle DB . 2005 .**I on channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience*.**5**:119-133.

**Reddy G.V. & Antwi F.B. 2016.** Toxicity of natural insecticides on the larvae of wheat head armyworm, *Dargida diffusa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Toxicol Pharmacol.* **42**:156-62.

**Reyes M., Rocha K., Alarcon L., Siegwart M. & Sauphanor B. 2012.** Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic Biochem Physiol.* **102**(1): 45-50.

**Rinkevich F.D. & Scott J.G. 2012.** Reduction of *dADAR* activity affects the sensitivity of *Drosophila melanogaster* to spinosad and imidacloprid. *Pest Biochem.Physiol.* **104**(2): 163-169.

**Rizzati V., BriandO., GuillouH., Gamet-Payrastre L . 2016.** Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature**.** *Chemico-Biol.Inter.***254**:231-246**.**

**Sabry K.H. & Gehan Y. 2016**. Biochemical and toxic characterization of some insect growth regulators to the Pink Bollworm*, Pectinophora gossypiella* (Saunders).American eurasian. *J.sus agricul*. **10** (1): 8-14

**Salgado V.L. & Sparks T.C. 2005.** The spinosyns: Chemistry, biochemistry, mode ofaction and resistance. In Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S (Eds.).*Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, Oxford, UK. **6**: 137–173.

**Salgado V.L. 1997.** The modes of action of spinosad and other insect control products.*Down to Earth.***52** (1): 35-44.

**Sarfraz M., Dosdall L.M. & Keddie B.A. 2005.**- Spinosad: a promising tool for integrated pest management. *Outlook Pest Manag.***16** (2): 78-84.

**Sawczyn B., Dolezych M., Klosok M., Augustyniak D., Stygar R.J., Buldak M., Kukla K., Michalczyk I., Karcz-SochaI.& Zwirska-Korczala K. 2012,** Alteration of carbohydrates metabolism and midgut glucose absorption in *Gromphadorhin portentosa* after subchronic exposure to imidacloprid and fenitrothion. *J Environ Sci Heal A*. **47**: 1644-1651.

**Seifert J. 2014.** Neonicotinoids. In: Wexler, P. (Ed). *Encyclopedia of Toxicology* (*Third Edition*). Elsevier, Oxford. 477-481.

**Seifert J.2005**. Neonicotinoids. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. Paris: Elsevier.196-200.

**Shafer T.J., Meyer D.A., Crofton K.M. 2005.** Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future reserch needs. *Environ Health Perspect.***113**:123-36.

**Sheikh EI-S.A. 2015.** Comparative toxicity and sublethal effects of emamectin benzoate,lufenuron and spinosad on *Spodoptera littoralis* Boisd (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop.Prot.* **67**: 228-234.

**Shelton A.M. & Nault B.A. 2004.** Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot*. **23**: 497–503

**Shibko S P., Koivistoinen C., Tratynek A., Newhall A. & Friedman L. 1966.** A methodfor the sequential quantitative separation and determination of protein. RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellulae fraction. *Anal Biochem.***19**: 415 - 528.

**Shivanandappa T. & Rajashekar Y. 2014**. Mode of Action of Plant-Derived Natural Insecticides. In: Singh, D. (Ed). *Advances in Plant Biopesticides* .Springer, New York.223-345.

**Silva T.B.M., Silva W.M., Campos M.R., Silva J.E., Ribeiro L.M.S., Siqueira, H.A.A. 2016.** Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. *Crop Prot.***79**:80-86.

**Soderlund DM. 1997.** Pharmacokinetic behavior of enantiomeric pyrethroid esters in cockroach *Periplaneta americana* L. *Pest Biochem Physiol.* **12**: 38-48.

**Somers J., Luong H.N.B., Mitchell J., Batterham P. & Perry T. 2017**. Pleiotropic effects f loss of the *Dα1* subunit in *Drosophila melanogaster*: Implications for Insecticide Resistance. *Genet.***205** (1):263-271.

**Somers J., Nguyen J., Lumb C., Batterham P. & Perry T. 2015.** In vivo functional analysis of the *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor Dα6 using the insecticide spinosad. *Insect Biochem Molecul Biol.***64**: 116-127.

**Sparks T.C. & Nauen R,. 2015.**Mode of action classification and insecticide resistance management.*Pest Biochem and Physio.***121**:122–128.

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

**Su T., Cheng M.L. & Thieme J. 2014.** Laboratory and field evaluation of spinosad formulation Natular T30 against immature Culex mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J.Med Entomol.* **51**(4): 837-844.

**Sugumaran M. 2010.** Chemistry of cuticular sclerotization.*Adv. Insect Physiol.* **39**: 151-209.

**Swevers L., Raikhel A.S., Sappington T.W., Shirk P. & Iatrou K. 2005.** Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert, L.I., Iatrou K. & Gill, S.S. (Eds).*Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, U.K.**6**: 87-156.

**Tamam B. M., Ghadamyari M., Sahragard A. & Karimi-Malati A. 2014**. Sublethal effects of spinosad on some biochemical parameters of *Xanthogaleruca luteola* (Müller) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Plant Protect. Sci.* **50**(4): 199-206.

**Tavernier R. & Lizeaux C. 2002.** Sciences vie de la Terre Terminale S**-** Spec. *Maisonneuve& Larose***.** Paris, France. 255 p**.**

**Tia E., Konan K. G., Boby Ouassa A.M., Moussa K., Tea Sea A., Koffi B., Kadjo K .2016.** Evaluation au laboratoire de l'efficacite de la peinture insecticide acrylique titan contre *Anopheles Gambiae*, vecteur majeur du Paludismeen Côte d'Ivoire. *Europ. Sci. J.* **12** (27): p.229.

**Tine S. 2013.** Etude de la biodiversité des blattes dans la région semi-arides et arides etevalution de l'impact d'insecticides chez *Blattela germanica et Blatta orientalis*(Dictyoptera, Blattellidae). Université Badji Mokhtar Annaba.202 p.

**Toivonen J.M. & Partridge L. 2009.** Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila.Mol Cell Endocrinol.***299**(1): 39-50.

**Tomé H.V.V., Martins J.C., Corrêa, A.S., Galdino T.V.S., Picançon M.C. & GuedesR.N.C. 2013.** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leaf miner*Tuta absoluta. Crop Prot*. **46**: 63-69.

**US-EPA. 2011**. Pesticide industry sales and usage reports.Washington, D.C.: U.S. EnvironmentalProtection Agency. Available from: http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/.

**Vanisree K., Upendhar S., Rajasekhar P & Rao G .R.2017**.Effect of newer insecticides against chilli thrips, *Scirtothrips dorsalis* (Hood). *J. Entom . Zool.St* .**5**(2): 277-284.

**Verslycke T., Vercauteren J., Devos C., Moens L., Sandra P.& Janssen C.R. 2003.** Cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following tributyltin exposure. *J Exp Mar Biol Ecol*. **288**: 167-179.

**Villaverde J.J., Sevilla-Morán B., Sandín-España P., López-Goti C., Alonso-Prados J. 2014.** Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009.*Pest.Manag.Sci***. 70** (1):2-5.

**Vrijheid M., CasasM., GasconM., Valvi D., Nieuwenhuijsen M. 2016.** Environmental pollutants and child health: A review of recent concerns. *Inter.J.Hyg.Environ.Heal.* **219** (4-5): 331-342.

**Wang D., Gong P., Li M., Qiu X. & Wang K. 2009.** Sublethal effects of spinosad of survival growth and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).*Pest Manag Sci.***65**: 223-227.

**Wang D., Qiu X., Ren X., Zhang W. & Wang K. 2015.** Effects of spinosad on*Helicoverpa amirigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: tolerance status*, synergisme and enzymatic responses. Pest Manag Sci.* **65**(9): 1040-1046.

**Wang D.,Wang Y.M., LiuH.Y., Xin Z.&Xue M. 2013.** Lethal and sublethal effects of spinosad on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.***106**: 1825-31.

**Wang H., Lai D., Yuan M. & Xu H. 2014.** Growth inhibition and differences in protein profiles in azadirachtin-treated *Drosophila melanogaster* larvae. *Electrophoresis* **35**(8): 1122-1129**.**

**Wang S.F., Zhu J.D. & Raikhel A.S. 2004.** Regulation of vitellogenin gene expression by ecdysteroids. In: Raikhel, A.S. & Sappington, T.W. (Eds.). *Reproductive biology*

*ofinvertebrates*, Part B: Progress in vitellogenesis. Science Publishers, Enfield,USA Plymouth, UK. **12**: 69-94.

**Wenning R.J., Di Giulio R.T. &Gallaghe E.P. 1988.** Oxidant mediated biochemical effects of paraquat on the ribbed mussel*, Geukensia demissa*. *Aquat.Toxicol*.**12**: 157-170.

**White N.J., Pukrittayakamee S., Hien T.T., Faiz M.A., Mokuolu O.A, & Dondorp, A.M. 2014.** Paludisme. *Lancet*. **383**(9918): 723-735.

**Yalçin M., Mermer S., Kozaci L. & Turgut C., 2015.** Insecticide resistance in two populations of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) from Turkey. *Türk.entomol. derg*. **39** (2): 137-145.

**Yin X.H.,Wu Q.J., Li X.F.,Zhang, Y.J.&Xu B.Y. 2009.** Demographic changes in multigeneration *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to sublethal concentrations of spinosad. *J Econ Entomol.***102**: 357-65.

**Yuan T., Zhantao Z.& Kaibiao S. 2016.** Qualitative analysis of a pest management gompertz model with interval state feedback impulsive control**.** *Dis.Dynam.Nat .Soc* dx.doi.org/10.1155/2016/4294595.

**Zaim M., Aittio A., Nakashima N. 2000.** Safety of pyrethroide treated mosquito nets. *Med Vet Entomol.* **14**:1-5.

**Zdarek J., Fraenkel G. 1972.** The mechanism of puparium formation in flies.*J. Exp. Zool Part A*. **179** (3): 315-323

**Zhang Y. & Xi Y. 2014.** Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster. Tissue Sci Eng*. **6**:141.

**Zidan N.H. 2015.** Hepato- and nephrotoxicity in male albino rats exposed to malathion and spinosad in stored wheat grains.*Acta Biol Hung*.**66**(2):133-48.

**Zimmer C.T., Garrood W.T., Puinean A.M, Zimmer M. E., Williamson M. S., Davies T.G., Bass C. 2016**. A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad *inDrosophila melanogaster*: *Insect Biochem Mol Bio*.**73**:62-69.

**Zlatnik M.G. 2016.** Endocrine Disrupting Chemicals and Reproductive Health. *J Mid Wom. Health.***61**(4):442-55.

# ANNEXE

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

# *Production Scientifique*

## PUBLICATIONS

1. **Chaabane M., Benchaabane S., Kilani-Morakchi S. & Aribi, N. 2012.** Physiotoxicity of spinosad, evaluated to two generations in *Tuta absoluta* (lepidoptera), an invasive species, and in *Drosophila melanogaster* (Diptera), a reference model. *Bull. Soc. Zool. Fr.***137**: 61-72.

2. **Benchaabane S., Aribi N., Kilani-Morakchi S. & Chaabane M. 2016.** Delayed toxic effects of spinosad on G1 progeny of an invasive species, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Afr Entomol*. **24**(2): 412-420.

## COMMUNICATIONS

***Internationales***

1. **M. Chaabane**, S. Benchaâbane**,** S. Kilani-Morakchi , N. Aribi, 2011. Physiotoxicité du Spinosad (pesticide naturel), évalué sur deux générations chez *Tuta absoluta* (lepidoptera), et chez *Drosophila melanogaster* (Diptera). Congrès de la Société Zoologique de France, 13-16 septembre 2011, Nice, France.

2. S. Benchaâbane**, M. Chaabane**, S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, 2013. Neurotoxicité du Spinosad, évalué sur deux générations chez *Tuta absoluta* (Lepidoptera) et *Drosophila melanogaster* (Diptera). 3ème Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie et d'Ichtyologie, 6-10 Novembre 2012, Marrakech, Maroc.

3. S. Benchaâbane**, M. Chaabane**, S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, 2013. Toxicité du Spinosad et évaluation des glutathion S-transférases au cours de deux générations successives chez *Tuta absoluta* (Lepidoptera). Congrès International « 50 ans de Formation et de Recherche », ENSA, 22-24 Avril 2013, Alger, Algérie.

4. **M. Chaabane,** S. Benchaâbane, S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, 2014. Effets différés du spinosad sur les vitellogénines et les vitellines ovariennes chez *Drosophila melanogaster*.8ème Conférence Internationale Francophone d'Entomologie, 23-27 juin 2014, Hammamet, Tunisie.

5. **M. Chaabane,** S. Benchaâbane, S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, 2015. Evaluation des effets différés d'un biopesticide, le spinosad, chez *Drosophila melanogaster* (Diptera). Congrès international de Biologie Animale USTO-MB, 29-1décembre 2015, Oran, Algérie.

6. **M. Chaabane,** S. Benchaâbane, S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, 2016.Evaluation of delayed effects of Spinosad, natural pesticide, in a model insect, *Drosophila*

*melanogaster* (Diptera).2nd ICIEM 2016, International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development.27-30 October 2016, Sousse, Tunisie.

**7.** S. Benchaâbane**, M. Chaabane,** ,S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, 2016. Physiotoxicité d'un biopesticide, le Spinosad: effets différés chez *Tuta absoluta* (Lepidoptera) et *Drosophila melanogaster* (Diptera) .1erColloqueInternational en Ecophysiologie Animale et Biodiversité. USTHB, 22-23 novembre 2016, Alger, Algérie