



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE

THESE

Présentée En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat

Spécialité : Biologie Animale et Environnementale

Option : Reproduction et Développement

Intitulé

Evaluation de l'azadirachtine (Neem-Azal et Huile de Neem) sur le développement et la reproduction chez *Drosophila melanogaster* (Diptera) : mécanismes d'action et action comparée.

Présentée par : M. Bilel BOULAHBEL

Membres de Jury:

M. Nouredine SOLTANI	Pr.,	Président	Université B.M-Annaba
Mme Nadia ARIBI	Pr.,	Directeur de thèse	Université B.M-Annaba
Mme Leila ALLAL-BENFEKIH	Pr.,	Examinatrice	Université Blida
M. Abdallah KELLOUCHE	Pr.,	Examineur	Université Tizi-Ouzou
M. Ali LADJAMA	Pr.,	Examineur	Université B.M-Annaba

Année Universitaire: 2014-2015.

REMERCIEMENTS

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

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur Le Professeur **Noureddine Soltani**, Directeur de Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (Université d'Annaba) pour avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et pour avoir accepté d'être président de ce jury; je lui exprime, également, ma profonde reconnaissance pour son aide et ses encouragements durant toutes mes études.

Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à mon directeur de thèse Mme **Nadia ARIBI** (Professeur, Université d'Annaba) 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.

Je remercie infiniment Mme **Leïla ALLAL-BENFEKIH** (Professeur, Université de Blida) de me faire l'honneur de juger ce travail en étant membre de ce jury.

Mes remerciements vont également à monsieur **Abdallah KELLOUCHE** (Professeur, Université de Tizi-Ouzou) pour avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger ce travail.

Je tiens également à remercier monsieur **Ali LADJAMA** (Professeur, Université d'Annaba) d'avoir pris de son temps et d'accepter de juger ce travail.

Enfin, mes remerciements vont à tous ceux et celles qui ont contribué de loin ou de près à l'aboutissement de ce travail, particulièrement à Mme **Samira Kilani-Morakchi** (Professeur, Université Annaba) pour son aide, sa présence et ses encouragements durant la réalisation de cette thèse.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	6
1. Matériel biologique.....	6
1.1. Présentation du matériel biologique	6
1.2. Cycle de vie de <i>D. melanogaster</i>	7
1.3. Elevage au laboratoire	9
2. Présentation des insecticides.....	10
2.1. Huile de Neem	10
2.2. Neem Azal	10
3. Traitement des insectes et tests de toxicité	10
4. Application exogène de 20 hydroxyecdysone (20 E).....	12
5. Croissance pondérale.....	12
6. Impact sur la descendance.....	12
7. Biomarqueurs de toxicité : GST _s et CAT	13
7.1. Dosage des Glutathion-S-Transférases (GSTs).....	13
7.2. Dosage de la Catalase (CAT)	14
8. Evaluation des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires.....	15
8.1. Echantillonnage	15
8.2. Extraction et dosage des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires	15
9. Analyse statistique	16
RESULTATS	17
1. Toxicité de l’Huile de Neem et du Neem Azal sur l’inhibition de l’exuviation adulte	17
1.1. Effets de l’Huile de Neem sur l’inhibition de l’exuviation adulte.....	17
1.2. Effets du Neem Azal sur l’inhibition de l’exuviation adulte.....	20
1.3. Comparaison de la toxicité entre l’Huile de Neem et le Neem Azal	22
2. Effets de l’Huile de Neem et du Neem Azal sur la croissance pondérale des pupes.....	23
2.1. Effet de l’Huile de Neem sur la croissance pondérale des pupes	23
2.2. Effet du Neem Azal sur la croissance pondérale des pupes	25
2.3. Comparaison entre l’Huile de Neem et le Neem Azal sur la croissance pondérale des pupes.....	27
3. Effets du Neem Azal et de l’Huile de Neem sur le suivi de la descendance.....	28
3.1. Effets du Neem Azal sur le suivi de la descendance	28
3.2. Effets de l’Huile de Neem sur le suivi de la descendance	29
3.3. Comparaison de l’effet de l’Huile de Neem et le Neem Azal sur le suivi de la descendance.....	31
4. Effets du Neem Azal sur les biomarqueurs de toxicité.....	32
4.1. Effets du Neem Azal sur l’activité spécifique des Glutathion S-Transférases (GSTs).....	32
4.2. Effets du Neem Azal sur l’activité spécifique de la catalase.....	34

5. Effets de traitement combiné du Neem Azal et de la 20 E sur les biomarqueurs de toxicité	36
5.1. Effets du traitement combiné sur l'activité spécifique des GSTs.....	37
5.2 Effets du traitement combiné sur l'activité spécifique de la Catalase	38
6. Effets du Neem Azal sur les vitellogénines dans les corps gras et les ovaires	39
6.1. Effets du Neem Azal sur les vitellogénines dans les corps gras.....	39
6.2. Effet du Neem Azal sur les vitellogénines dans les ovaires	41
6.3. Comparaison dans le contenu en vitellogénines entre les corps gras et les ovaires.....	43
7. Effets du traitement combiné entre le Neem Azal et la 20E sur les vitellogénines dans le corps gras et les ovaires	44
7.1. Effets du traitement combiné sur les vitellogénines dans le corps gras et les ovaires.....	44
DISCUSSION	46
1. Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal sur l'inhibition de la mue adulte.....	48
2. Effets du Neem Azal sur la GSTs et catalase.....	50
3. Effets du Neem Azal sur la reproduction	52
3.1 Effets du Neem Azal sur les vitellogénines	53
3.2. Effets du Neem Azal sur la descendance.....	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	57
RESUMES	59
Français	59
Anglais	61
Arabe	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64

ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE (publications et communications)

LISTES DES
TABLEAUX
&
FIGURES

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Dosage des vitellogénines chez <i>D. melanogaster</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	16
2	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition observée (%) de la mue adulte. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	17
3	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition corrigée (%) de la mue adulte. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	18
4	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> , sur le pourcentage d'inhibition corrigé de la mue adulte : Analyse de la variance a un critère de classification. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	18
5	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Détermination des doses d'inhibition de la mue adulte (DI en μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.	19
6	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition observée (%) de la mue adulte. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	20
7	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition corrigée (%) de la mue adulte. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	20
8	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> , sur le pourcentage d'inhibition corrigé de la mue adulte : Analyse de la variance a un critère de classification. ($m \pm sd$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).	21

9	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Détermination des doses d'inhibition de la mue adulte ou DI (μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.	22
10	Effets de l'Huile de Neem et de Neem Azal, administrés <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : comparaison des doses d'inhibition de la mue adulte (DI en μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.	23
11	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,68 et DI ₅₀ : 1,17 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> . ($m \pm \text{sd}$; $n = 20$). Comparaison des moyennes à différents âges pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).	24
12	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,68 et DI ₅₀ : 1,17 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> . ($m \pm \text{sd}$; $n = 20$). Analyse de la variance à deux critères de classification.	25
13	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> . ($m \pm \text{sd}$; $n = 20$). Comparaison des moyennes à différents âges pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).	26
14	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> . ($m \pm \text{sd}$; $n = 20$). Analyse de la variance à deux critères de classification.	27
15	Effets du Neem Azal et d'Huile de Neem, administrés <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> : Classement des molécules testées par le test HSD de Tukey.	27
16	Effets du Neem Azal et de l'Huile de Neem, administrés <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> : Classement des molécules testées par le test HSD de Tukey.	28

17	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des descendants (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd ; n = 9). Comparaison des moyennes à différents couples pour un même stade du développement. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	29
18	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,68 et DI ₅₀ : 1,17 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des descendants (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd ; n = 9). Comparaison des moyennes à différents couples pour un même stade du développement. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	30
19	Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal, administrés <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ et DI ₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre d'œufs (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd; n = 9). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	31
20	Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal, administrés <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ et DI ₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des larves L3 (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd; n = 9). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	31
21	Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal, administrés <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ et DI ₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des pupes (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd; n = 9). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	31
22	Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal, administrés <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ et DI ₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des adultes (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd; n = 9). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	32

23	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique des GSTs (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 5-8). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	33
24	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique des GSTs (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 5-8). Analyse de la variance à deux critères de classification.	34
25	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd ; n = 6-10). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	35
26	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 6-10). Analyse de la variance à deux critères de classification.	36
27	Effets de la 20 Hydroxyecdysone (0,25 et 0,5 µg) sur l'activité spécifique de GSTs mesurée 72 heures après l'exuviation nymphale en fonction du temps (24 et 48 heures) après l'application topique du Neem Azal (1,10 µg) sur des pupes nouvellement exuviées de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd, n = 5-7). Pour toutes les séries les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	37
28	Effets de la 20 Hydroxyecdysone (0,25 et 0,5 µg) sur l'activité spécifique de catalase mesurée 72 heures après l'exuviation nymphale en fonction du temps (24 et 48 heures) après l'application topique du Neem Azal (1,10 µg) sur des pupes nouvellement exuviées de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 5-7). Pour toutes les séries les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	38
29	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 4-5) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	40

30	Effet du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd ; n = 4-5) : Analyse de la variance à deux critères de classification.	41
31	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines ovariennes (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 4-5). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	42
32	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines ovariennes (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 4-5). Analyse de la variance à deux critères de classification.	43
33	Comparaison dans le contenu en vitellogénines (µg/mg) entre le corps gras et les ovaires chez les séries témoins; évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 4-5). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	43
34	Effets de la 20 Hydroxyecdysone (0,25 et 0,5 µg) sur le contenu des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires (µg/mg) mesurées 24 heures après l'exuviation adulte en fonction du temps (24 et 48 heures) après l'application topique du Neem Azal (1,10 µg) sur des pupes nouvellement exuviés de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd, n = 4-6). Pour toutes les séries les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	45

Listes des figures

N°	Titre	Page
1	<i>Drosophila melanogaster</i> (A : x 6,87 ; B : x 5,94).	7
2	Le cycle de vie de <i>D. melanogaster</i> à 25°C (Jouandin, 2013).	8
3	Elevage de <i>D. melanogaster</i> au laboratoire.	9
4	Structure chimique de l'azadirachtine (1) ; nimbine (2) ; salanine (3) ; 20 hydroxyecdysone (4) (Mordue <i>et al.</i> , 2005 ; Morgan, 2009 ; Dhadialla <i>et al.</i> , 2005).	11
5	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition corrigée de la mue adulte et classement des doses testées par le test HSD de Tukey.	18
6	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose de l'Huile de Neem (μg).	19
7	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Inhibition corrigée de la mue adulte et classement des doses testées par le test HSD de Tukey.	21
8	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez <i>D. melanogaster</i> : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose testée (μg).	22
9	Effets de l'Huile de Neem, administrée <i>in vivo</i> , par application topique, (DI_{25} : 0,68 et DI_{50} : 1,17 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> . ($m \pm \text{sd}$; $n = 20$). Comparaison des moyennes pour un même âge entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).	24

10	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 20). Comparaison des moyennes pour un même âge entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	26
11	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique des GSTs (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 5-8). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	34
12	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 6-10). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	36
13	Effet du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd ; n = 4-5). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	40
14	Effets du Neem Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DI ₂₅ : 0,59 et DI ₅₀ : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines ovariennes (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . (m ± sd; n = 4-5). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).	42
15	Taux d'hormone juvénile (JH) et de 20-hydroxyecdysone (20E) au cours du développement de <i>D. melanogaster</i> (Dubrovsky, 2005). La 20 E initie toutes les transitions de développement, tels que de la larve à la larve, de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte tandis que l'HJ détermine le type de transition et la nature de mue ; Pp : pré-pupes.	47

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la population mondiale, de l'ordre de 6,13 milliards en 2001, pourra atteindre, à l'horizon 2025, un chiffre de 8,50 milliards. L'augmentation de la population exigera donc une production agricole supplémentaire de $2,4.10^9$ tonnes/ans (<http://apps.fao.org>); cette prévision, strictement dépendante de l'amélioration de la productivité des cultures, ne pourra être possible que par un contrôle approprié des agents biotiques. En effet, des pertes de récoltes, estimées en moyenne à 40% de la production potentielle (Abhilash & Singh, 2009; Dimetry, 2014), sont dues, essentiellement, à des ravageurs (Kulkarni *et al.*, 2009 ; Abhilash & Singh, 2009). Les insectes nuisibles, considérés comme l'un des problèmes majeurs en agriculture, peuvent être, également, vecteurs d'agents pathogènes (McKay *et al.*, 2013 ; Menasria *et al.*, 2014; White *et al.*, 2014; Govindarajan & Rajeswary, 2015) et constituer une menace pour les animaux dont l'homme. Par conséquent, une gestion des ces différentes nuisances est primordiale pour un appui à la productivité agricole et une protection de la santé animale et humaine. Actuellement, la lutte chimique reste le moyen le plus largement adopté dans le monde pour contenir ces insectes nuisibles à un seuil raisonnable (Cantrell *et al.*, 2012 ; Casida & Durkin, 2013). Les dépenses mondiales annuelles en pesticides représentent plus de 25 milliards d'euros pour un montant total d'environ 2,5 millions de tonnes de pesticides (US-EPA, 2011; FAO, 2012; Fenner *et al.*, 2013) ; par ailleurs, 90% de ces produits sont perdus dans l'air, au moment de l'application ou encore du fait du phénomène de ruissellement, affectant à la fois les coûts des traitements et les différents écosystèmes (Ghormade *et al.*, 2011).

Les organismes de protection de l'environnement, dénoncent l'impact négatif des molécules synthétiques comme les organochlorés, organophosphorés et carbamates (Hoffman & Lorenz, 1998 ; Scudeler & Santos, 2013; Kohler & Triebkorn, 2013; Gupta & Milatovic, 2014). qui restent encore les plus vendus (40%) dans le monde (Casida & Durkin, 2013); en effet, ces pesticides conventionnels, très efficaces dans la gestion des organismes visés (Bruce, 2010), sont responsables du phénomène de pollution (Gagné *et al.*, 1999 ; Long, 2000; Comoretto & Chiron, 2005) et de l'apparition de forte résistance chez les organismes cibles (Kristensen *et al.*, 2005 ; Karunker *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009 ; Ahmad & Arif, 2010 ; Sahu *et al.*, 2014). Ainsi, dans le cadre du développement durable, des pesticides non polluants ont été commercialisés par les firmes pharmaceutiques et phytosanitaires; ces

molécules, alternatives aux pesticides conventionnels, sont représentées par les pesticides synthétiques de la 3^{ème} génération (régulateurs de croissance) ou encore par les pesticides d'origine naturelle (biopesticides). Les régulateurs de croissance synthétiques (Insect growth Regulator IGRs) agissent, spécifiquement (Dhadialla *et al.*, 2005; 2010) *via* les deux principales hormones du développement (hormone juvénile ou HJ et les ecdystéroïdes) ou *via* la synthèse de la chitine, composé majeur de la cuticule (Ishaaya, 1990; Dhadialla *et al.*, 2010); ainsi, en fonction du mode d'action, ces molécules sont réparties en trois groupes (Dhadialla *et al.*, 2005; 2010): les agonistes et antagonistes de l'HJ (Kaakeh *et al.*, 1997; Aribi *et al.*, 2006), les inhibiteurs de la synthèse de la chitine (Oberlander & Silhacer, 1998) et enfin, les agonistes et antagonistes des ecdysteroides (Aribi *et al.*, 1999; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012; Amira *et al.*, 2013; Daas-Maamcha *et al.*, 2013 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2014). Les pesticides naturels, issus du développement de la biotechnologie, se définissent, au sens large, comme provenant d'organismes vivants: animaux, plantes, bactéries ou encore certains minéraux comme le bicarbonate de potassium (Sporleder & Lacey, 2013). Selon, l'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA), il a été enregistré plus de 192 biopesticides actifs (Cantrell *et al.*, 2012). Parmi ces molécules, biodégradables et à faible impact environnemental se trouvent les néonicotinoïdes, le spinosad et l'azadirachtine.

Les néonicotinoïdes, insecticides d'origine végétale, agissent, par contact et ingestion (Shivanandappa & Rajashekar, 2014), sur le système nerveux des insectes *via* les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs) (Nauen *et al.*, 2003; Ihara *et al.*, 2008; Ghanim & Ishaaya, 2010; Seifert, 2014; Shivanandappa & Rajashekar, 2014). Les néonicotinoïdes, sont très efficaces contre divers insectes, y compris les Homoptères, les Coléoptères, et les Lépidoptères (Seifert, 2014). Le spinosad, provenant de la fermentation d'une bactérie Actinomycète *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz & Yao, 1990), 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 récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs) (Salgado, 1997; Kirst, 2010 ; Rinkevich & Scott, 2012) et sur les récepteurs gabaergiques (GABA) (Ishaaya, 2001; Salgado & Sparks, 2005; Osorio *et al.*, 2008). Le spinosad agit, par contact et ingestion, et différents travaux ont montré son efficacité chez les insectes tel que les Lépidoptères (Wang *et al.*, 2009 ; Sheikh, 2015), les Dictyoptères (Maiza *et al.*, 2013) et les Diptères (Su *et al.*, 2014). L'azadirachtine provient des grains d'*Azadirachta indica*, arbre, à croissance rapide, de la famille des Meliaceae originaire d'Asie du Sud-Est. L'azadirachtine, triterpénoïde, est le limonoïde le plus puissant et actif dans les grains de

Neem. Les autres limonoïdes comme la salanine et la nimbine, sont responsables des effets antiappétants (Morgan, 2009). Les effets majeurs de l'azadirachtine contre les Arthropodes ont été cités par Schmutterer, 1990 ; ce pesticide est utilisé comme insecticide (Mordue *et al.*, 2005, 2010) acaricide (Denardi *et al.*, 2010) ou encore contre les crustacés ectoparasites des poissons (Banerjee *et al.*, 2014). L'azadirachtine, structurellement semblable aux ecdysones d'insectes, inhibe l'hormone prothoracicotropique (Schmutterer, 1990; Mordue & Blackwell, 1993) et l'hormone allatotropique (Banken & Stark, 1997), stimulant, respectivement, les ecdystéroïdes et l'HJ; l'azadirachtine, agit donc comme un régulateur de croissance en perturbant par ses effets antagonistes sur les hormones précitées, les processus physiologiques comme le développement et la reproduction (Mordue *et al.*, 2005; Morgan, 2009). L'azadirachtine peut également agir par des effets antiappétants sur le mouvement naturel de l'intestin, provoquant une paralysie et le dépérissement des organismes cibles (Stark *et al.*, 1990; Schmutterer & Singh, 1995; Andreu *et al.*, 2000; Senthil-Nthan *et al.*, 2004, 2005, 2006). Les pesticides naturels, à l'instar de toute molécule exogène à l'organisme, sont potentiellement capables d'induire un mécanisme de résistance ; en effet, plusieurs travaux ont cité des phénomènes de résistance au spinosad chez *Tuta absoluta*, *Musca domestica* et *Spodoptera litura* (Reyes *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014 ; Rehan & Freed, 2014) mais aussi aux néonicotinoïdes (imidacloprid) (Kaufman *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012; Kavi *et al.*, 2014 ; Matsuura & Nakamura, 2014 ; Abbas *et al.*, 2015) ; cependant, à l'heure actuelle, aucune résistance n'est notée envers l'azadirachtine A (Mordue *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2014). Ainsi, l'azadirachtine semble constituer un pesticide naturel à encourager.

Plusieurs formulations commerciales (Huile de Neem, Neem Azal, Bioneem) sont utilisées avec succès dans les agro-écosystèmes (Schmutterer, 1990; Mordue & Blackwell, 1993; Isman, 2006; Akca *et al.*, 2009), cependant, la littérature récente note des contradictions sur son innocuité vis-à-vis des organismes non cibles et la possibilité de risques futurs ne doit pas être ignorée (Qi *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2003; Aggarwal & Brar, 2006; Cordeiro *et al.*, 2010; Scudeler & Santos, 2013 ; Gontijo *et al.*, 2015). Ainsi il est noté des effets toxiques chez certains insectes non cibles tels que chez *Ceraeochrysa claveri*, *Neoseiulus baraki*, *Amphiareus constrictus* et *Bombus terrestris* (Scudeler *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Gontijo *et al.*, 2015 ; Barbosa *et al.*, 2015). A l'opposé, chez les organismes aquatiques, l'azadirachtine est citée comme molécule, relativement inoffensive, avec un potentiel immunostimulant et serait un agent prometteur contre les parasites (Kumar *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2014). Parallèlement à son action insecticide, l'azadirachtine est aussi utilisée

en médecine traditionnelle, en Asie et en Afrique, contre la malaria (paludisme), le diabète, les ulcères, l'acné et les mycoses (Koriem, 2013); l'azadirachtine semble présenter aussi, chez les Mammifères, des effets immunostimulants, antimicrobiens, antiviraux et contraceptifs (Koriem, 2013).

L'efficacité et la toxicité de l'azadirachtine contre les insectes ont été citées par divers travaux (Mordue *et al.*, 2005); ce pesticide interfère avec la chemoréception et cause des dommages aux tissus des insectes tels que les muscles, le corps gras et le tube digestif (Capinera *et al.*, 2007). L'azadirachtine est particulièrement actif sur les cellules en division par blocage de la polymérisation des microtubules (Mordue *et al.*, 2010). Ce pesticide naturel induit l'apoptose et a une action antiproliférative en arrêtant le cycle cellulaire chez *Spodoptera litura* et *Spodoptera frugiperda* (Huang *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). L'azadirachtine interagit avec les récepteurs de l'acide rétinoïque et exerce des réponses anti-inflammatoires et anti-métastatiques dans les lignées cellulaires humaines (Lim, 2014). Cette molécule affecte le stress et l'immunité chez *Plodia interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012), *Aedes aegypti* ou encore chez *Spodoptera littoralis* (Koodalingam *et al.*, 2014; Shaurub *et al.*, 2014). L'azadirachtine interfère avec le système nerveux central (SNC) chez la drosophile par l'inhibition de la transmission cholinergique excitatrice *via* les canaux calciques (Qiao *et al.*, 2014); l'expression des gènes (liés au développement) se trouve aussi modifié par l'azadirachtine chez *P. interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012) et chez *D. melanogaster* (Lai *et al.*, 2014). Ainsi, il a été listé différents effets de l'azadirachtine mais le mécanisme d'action de ce pesticide reste encore inconnu (Wang *et al.*, 2014).

Les effets antagonistes directs de l'azadirachtine, sur la signalisation de la 20 hydroexecdysone (20E), impliquée dans le développement comme les mues et la métamorphose ont été mis en évidence dans des travaux antérieurs (Mordue *et al.*, 2005); cependant, les effets antagonistes sur le stress oxydatif, indirectement lié à la signalisation de la 20 E ou encore sur la reproduction restent à préciser ; en outre, il apparaît que la toxicité de l'azadirachtine semble différente d'une formulation commerciale à une autre, (Abedi *et al.*, 2014 a; da Costa *et al.*, 2014). Par conséquent, la présente étude a pour but d'évaluer les effets de deux formulations commerciales de l'azadirachtine, l'Huile de Neem et le Neem Azal, chez *D. melanogaster*, modèle biologique le plus utilisé en toxicologie (Pinho *et al.*, 2014; Rand *et al.*, 2014). Les objectifs de cette étude sont donc les suivants :

1. Evaluer la toxicité de l'Huile de Neem et du Neem Azal, testés séparément, par application topique, sur les pupes nouvellement exuviées de *D.melanogaster*. La

détermination des doses sublétales et létales de l'inhibition de la mue adulte (DI_{25} et DI_{50}) et de leurs intervalles de confiance respectifs nous permettra, pour les deux formulations, de comparer leur toxicité.

2. Evaluer les effets sublétaux et létaux (DI_{25} et DI_{50}) de l'Huile de Neem et du Neem Azal, en traitement simple, sur la croissance pondérale des pupes et sur le suivi de la descendance des adultes qui ont survécu au traitement des pupes (évaluation du nombre d'œufs, larves, pupes et adultes de la génération suivante). Les résultats nous permettront d'apprécier l'effet direct du pesticide sur le développement mais aussi les effets différés sur la fécondité et la fertilité.

3. Examiner les effets sublétaux et létaux du Neem Azal, en traitement simple, sur le stress oxydatif vu le pouvoir antioxydant de la 20E (Krishnan *et al.*, 2007); ceci, par l'évaluation des activités spécifiques de la catalase et des glutathion-S-transférases, indicatrices de stress.

4. Examiner les effets sublétaux et létaux du Neem Azal, en traitement simple, sur le contenu des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires ; la vitellogenèse ou synthèse de vitellogénines qui s'effectue dans les deux compartiments nécessite la présence de 20E d'HJ (Jowett & Postlethwait, 1980; Swevers *et al.*, 2005; Tufail *et al.*, 2014).

5. Tester la capacité de la 20E exogène (en application topique) à compenser les effets dépressifs induits par l'azadirachtine sur le stress oxydatif et sur la reproduction. Pour cela, un traitement combiné Neem-Azal-20E (deux doses et deux périodes d'application) a été réalisé pour préciser l'interaction entre ces deux composés.

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 (Joly, 2006). *D. melanogaster* est une petite mouche jaune brunâtre mesurant environ 3 ou 4 mm de long, ailes incluses (Fig. 1); l'abdomen, plutôt court, est rayé de bandes sombres. Un dimorphisme sexuel (Parvathi *et al.*, 2009) permet de différencier les mâles et les femelles (Fig. 1).

- **Taille de l'adulte:** mâles plus petits que les femelles
- **Forme de l'extrémité de l'abdomen :**
 - Femelles : allongée
 - Mâles : arrondie
- **Marques sur l'abdomen :**
 - Femelles : bandes sombres et claires alternées sur la partie arrière
 - Mâles : fusion des derniers segments terminaux qui sont très foncés
- **Nombre des segments abdominaux :**
 - Femelles : 8 segments
 - Mâles : 5 segments
- **Organes sexuels situés à l'extrémité de l'abdomen :**
 - Femelles : plaque vaginale non colorée
 - Mâles : pénis très coloré
- **Peignes sexuels :**
 - Femelles : Absence de peignes
 - Mâles : présents au niveau de la première paire de pattes

Sa position systématique est la suivante :

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

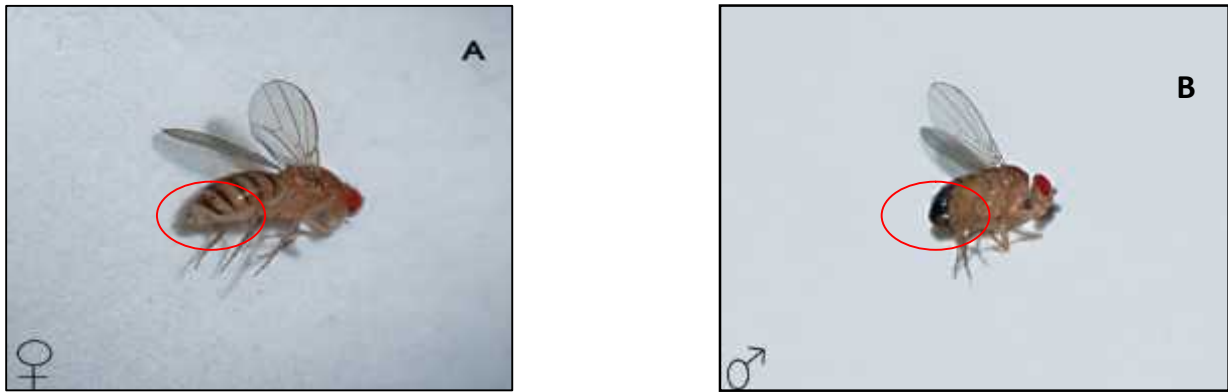


Figure 1. *Drosophila melanogaster* (A : x 6,87 ; B : x 5,94).

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. 2) :

Œufs: La femelle pond de 200 à 300 œufs (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 œufs 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, qui dure 4 jours environ, comprend 3 stades, L1 (24h), L2 (24h) et L3 (48h). A la fin de ce dernier stade, les larves cessent de s'alimenter, sortent du milieu nutritif et entame une phase d'errance. A son terme, les larves secrètent une glue et se fixent sur un support.

Stade pupal : l'éversion des spiracles antérieurs 120 h après la ponte, définit le début du stade prépupal d'une durée de 12h. La dernière cuticule larvaire se tanne rapidement et dévient le puparium, où se déroule la métamorphose. La période pupale dure 3 jours et demi environ. À son terme, toutes les structures larvaires sont détruites et les structures adultes sont 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.

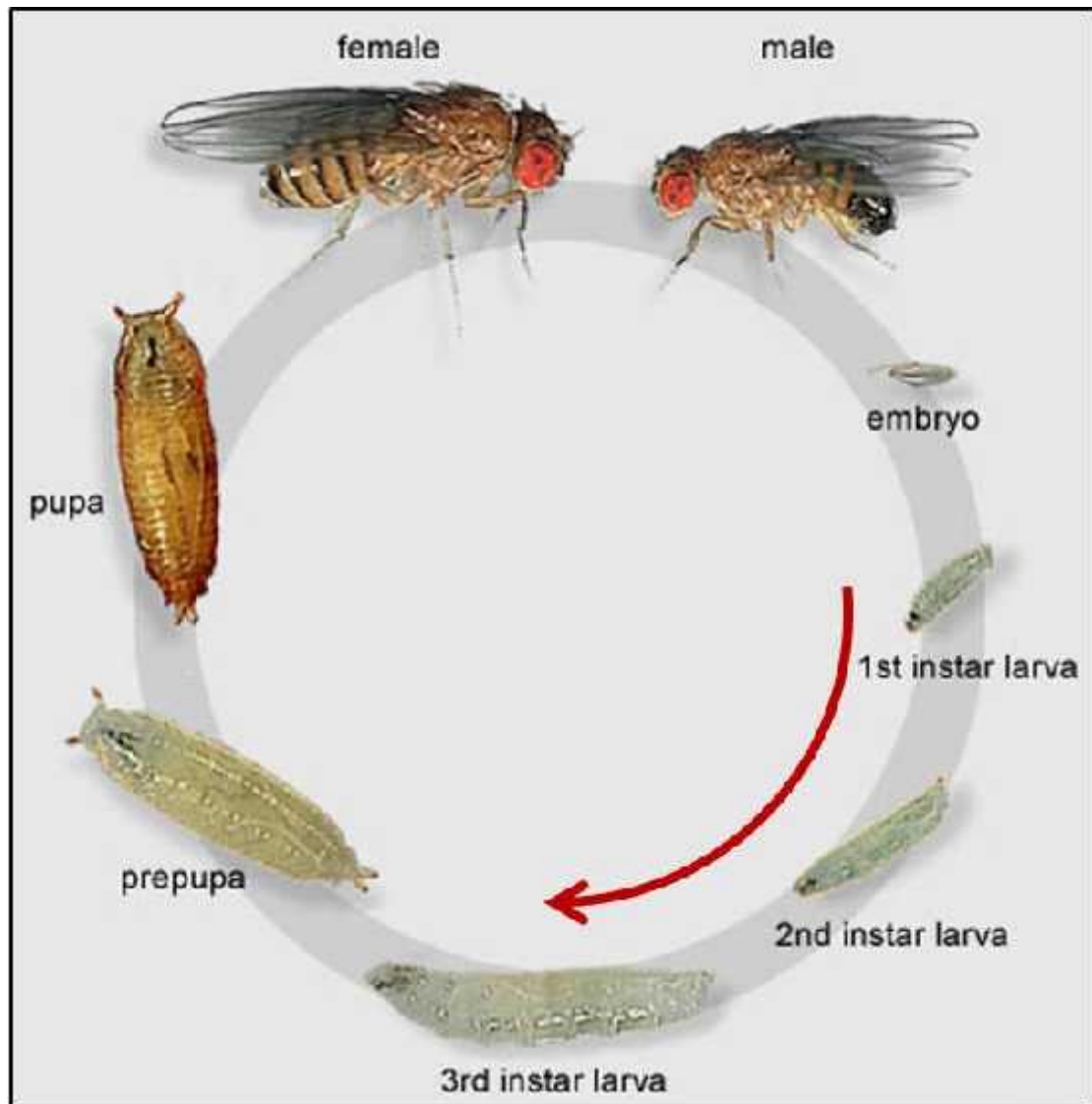


Figure 2. Le cycle de vie de *D. melanogaster* à 25°C (Jouandin, 2013).

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. Cette espèce est utilisée, actuellement, comme modèle biologique en génétique, biologie moléculaire et toxicologie par 80 000 à 100 000 chercheurs (Colombani *et al.*, 2006).

L'élevage *D. melanogaster*, souche Canton S, est réalisé, en laboratoire (Fig. 3), à une température de 25°C, une hygrométrie de 70% et une scotophase de 12 h (souche donnée gracieusement par C. Wickers Thomas, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, Université de Paris Sud).

Le milieu nutritif artificiel gélosé sur lequel est élevée la drosophile est à base de farine de maïs et de levure de bière. Il est composé essentiellement de 33,3 g semoule de maïs, 33,3 g levure de bière, 4,8 g d'agar-agar, et 20 ml d'antifongique (méthyl-hydroxy-4-benzoate à 10%). Les drosophiles sont élevées dans des flacons de plastique et bouchés par un tampon de mousse.



Figure 3. Elevage de *D. melanogaster* au laboratoire.

2. Présentation des insecticides

2.1. Huile de Neem

L'azadirachtine commercialisée sous cette appellation Huile de Neem comporte trois substances actives (nimbine : 0,4 %, salanine 0,6% et azadirachtine 0,3 %, Emulsion Concentrée (EC); firme : H3D Terraneem-France). La formule chimique de la nimbine la salannine et l'azadirachtine est de $C_{30}H_{36}O_9$ (540 g/mol), $C_{34}H_{44}O_9$ (596 g/mol) et $C_{35}H_{44}O_{16}$ (720,7 g/mol) respectivement (Fig. 4). Cette formulation, insoluble dans l'eau, correspond à un liquide jaune avec une odeur caractéristique du Neem.

2.2. Neem Azal

L'azadirachtine commercialisée sous le nom de Neem Azal-T/S comprend seulement de l'azadirachtine (1% d'azadirachtine ; Emulsion Concentrée (EC); firme : Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany) ; cette formulation, insoluble dans l'eau, correspond à un liquide brun avec une odeur caractéristique du Neem.

3. Traitement des insectes et tests de toxicité

Les deux composés (Huile de Neem et Neem Azal) ont été utilisés, séparément, par application topique (1 μ l), sur pupes nouvellement exuviées (0 jour) de *D. melanogaster*. Les insecticides ont été dilués dans l'acétone (solvant) et différentes solutions stocks ont été préparées. Après un screening préalable, les concentrations utilisées sont de 500 ; 1000 ; 1620 ; 3250 ; et 6500 ppm pour l'Huile de Neem et 500 ; 1000 ; 1500 ; 2500 ; 4500 ppm pour le Neem Azal correspondant respectivement aux doses 0,5 ; 1 ; 1,62 ; 3,25 et 6,5 μ g pour l'Huile de Neem et 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2,5 et 4,5 pour le Neem Azal. L'essai pour chaque dose est conduit en utilisant 3 réplifications qui comportent chacune 30 insectes ; une série témoin est conduite en parallèle et les individus reçoivent uniquement le solvant (1 μ l).

Les pourcentages d'inhibition observée des différentes séries ont été déterminés puis corrigés selon la formule d'Abbott (1925) pour éliminer la mortalité naturelle. Les pourcentages d'inhibitions corrigées subissent une transformation angulaire selon les tables de Bliss (1938), cités par Fisher et Yates (1957) et font l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification qui permet le classement des doses par le test HSD de Tukey, afin d'évaluer l'effet des deux pesticides. Enfin, la régression non linéaire exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose a permis d'estimer,

pour l'Huile de Neem et le Neem-Azal, les doses d'inhibition de la mue adulte DI_{10} , DI_{25} , DI_{50} et DI_{90} avec leurs intervalles de confiance.

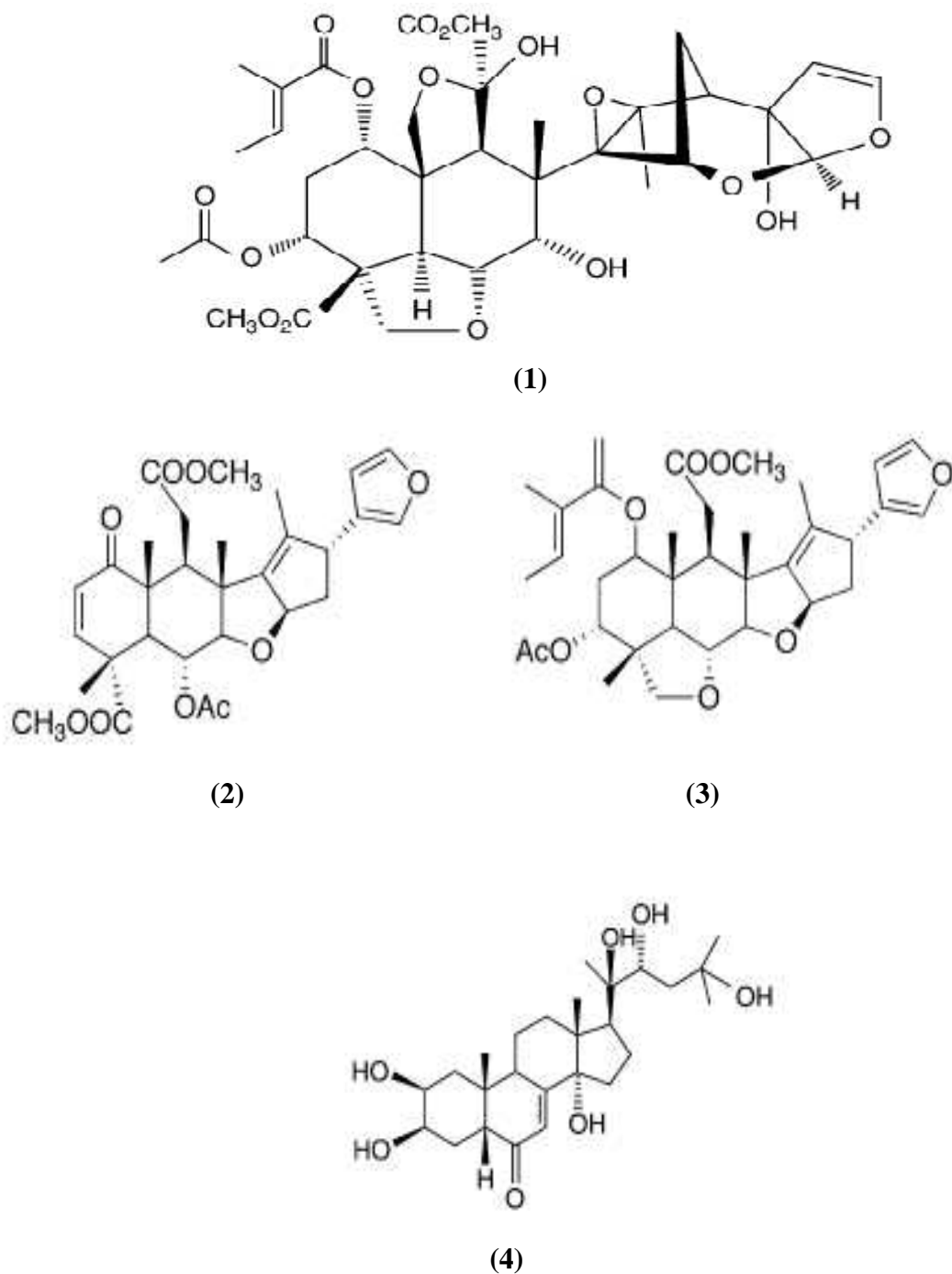


Figure 4. Structure chimique de l'azadirachtine (1); nimbine (2); salanine (3); 20 hydroxyecdysone (4) (Mordue *et al.*, 2005 ; Morgan, 2009 ; Dhadialla *et al.*, 2005).

4. Application exogène de 20 hydroxyecdysone (20 E)

La 20E exogène (Sigma) a été dissous dans l'acétone et utilisée, *in vivo*, par application topique en traitement combiné avec le Neem Azal. Le Neem Azal a été appliqué à la DI_{50} (1,10 μg) le jour de l'exuviation nymphale puis la 20E a été testée à deux doses (0,25 et 0,50 μg), par application topique, à 24 ou à 48 heures après le Neem Azal. Les doses de 20E ont été choisies selon les travaux d'El Ouar *et al.*, (2010) ; les temps d'application retenus, 24 et 48 heures coïncident, respectivement, avec la phase ascendante et descendante du principal pic des ecdystéroïdes (Kozlova & Thummel, 2000).

5. Croissance pondérale

La croissance pondérale de *D. melanogaster* des séries témoins et traitées au Neem Azal et à l'Huile de Neem aux doses sublétales et létales (DI_{25} et DI_{50}) a été évaluée tout au long du stade pupal (0, 1, 2 et 3 jours) à l'aide d'une balance de précision (Sartorius AG Gottinger, Germany).

6. Impact sur la descendance

Les adultes, mâles et femelles nouvellement exuviés, issus des séries témoins et traitées dont les individus ont survécu au traitement des pupes (DI_{25} et DI_{50} des deux formulations commerciales) ont été placés dans des boîtes de pétri contenant un milieu nutritif. Neufs répétitions de différents types de couples sont réalisés (voir ci-dessous) et après 48 heures, les adultes sont retirés des boîtes de pétri. Le suivi de la génération 1 ou F1 est ensuite réalisé dès le stade œufs ; l'effet différé du Neem Azal et de l'Huile de Neem a pu être évalué en procédant au comptage des œufs, larves de dernier stade (L3), pupes et adultes provenant de chaque série de couples. Les différents couples réalisés sont les suivants :

Couples 1: $M_T \times F_T$: Mâles _{Témoins} x Femelles _{Témoins}

Couples 2: $M_T \times F_{DI25}$: Mâles _{Témoins} x Femelles _{DI25}

Couples 3: $M_{DI25} \times F_T$: Mâles _{DI25} x Femelles _{Témoins}

Couples 4: $M_T \times F_{DI50}$: Mâles _{Témoins} x Femelles _{DI50}

Couples 5: $M_{DI50} \times F_T$: Mâles _{DI50} x Femelles _{Témoins}

Couples 6: $M_{DI25} \times F_{DI25}$: Mâles _{DI25} x Femelles _{DI25}

Couples 7 : $M_{DI50} \times F_{DI50}$: Mâles _{DI50} x Femelles _{DI50}

7. Biomarqueurs de toxicité : GSTs et CAT

Les pupes, nouvellement exuviées de *D. melanogaster*, ont été traitées par application topique au Neem Azal à la DI_{25} (0,59 μg) et DI_{50} (1,10 μg) respectivement. Les activités spécifiques des biomarqueurs (GSTs et CAT) ont été évaluées à 24, 48 et 72 heures après le traitement ; une série témoin a été réalisée en parallèle. Par ailleurs, la concentration en protéines totales des différents échantillons, permettant d'évaluer l'activité spécifique, a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford (1976) (décrite plus loin), afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques.

7.1. 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 (1chloro 2-4- Dinitrobenzoïque, 1mM). La réaction de conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm. Dans le but de préciser l'activité spécifique des GSTs chez le modèle biologique étudié, les pupes de *D. melanogaster* des séries témoins et traitées, échantillonnées à différents temps après traitement, sont homogénéisées dans 1ml de tampon phosphate (0,1M ; pH6)¹ à l'aide d'un broyeur 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 CDNB-GSH² dans 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 (réglage du spectrophotomètre) contenant 0,2 ml d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant. L'activité spécifique des GSTs, déterminée d'après la formule de Habig *et al.*, (1974) suivante :

$$\text{GSTs (mMol/min/mg)} = \frac{\Delta\text{DO}}{9,6} \times \frac{V_t}{V_s} / \text{mg de protéines}$$

Dans nos résultats, l'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{Mol/min/mg}$ de protéines.

DO : Pente de la droite de régression des densités optiques obtenues à 340 nm.

Vt : Volume totale de la cuve (ml) : (1,2 ml du mélange CDNB- GSH + 0,2 ml du surnageant).

9,6 : m Mol⁻¹ Cm⁻¹ : Coefficient d'extinction du mélange GSH- CDNB (à 340 nm).

E : Epaisseur de la cuve = 1 cm.

Vs : Volume du surnageant dans la cuve en ml = 0,2 ml.

mg de protéine : Quantité de protéines exprimée en mg.

1- 17,805g Na₂ HPO₄ (a) —————> dilué dans 500ml d'eau distillée.

2- 6,39g NaHPO₄ (b) —————> dilué dans 500ml d'eau distillée.

1- Mélanger 61,5ml de la solution a avec 438,5 ml de la solution b et ajouter ensuite 21,3925 g de saccharose.

2- Mélanger 4,052 mg de CDNB avec 30,73 mg de GSH et ajouter ensuite 0,8 ml d'éthanol et 20 ml de tampon phosphate.

7.2. Dosage de la Catalase (CAT)

Le dosage de la Catalase (CAT) est réalisé selon la méthode de Claiborne (1985). Cette méthode est basée sur la mesure spectrophotométrique de la réduction de l'eau oxygénée (H₂O₂) en une molécule d'oxygène (O₂) et deux molécules d'eau (H₂O) en présence de la CAT à une longueur d'onde UV de 240 nm. Les pupes de *D. melanogaster* des séries témoins et traitées, échantillonnées à différents temps après traitement, sont homogénéisées dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4)¹ à l'aide d'un broyeur à ultrasons. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (15,000 trs/min, pendant 10 min) et le surnageant récupéré servira au dosage enzymatique de la catalase. Le dosage de l'activité CAT s'effectue, à température ambiante, dans une cuve en quartz, sur une fraction aliquote de 50 µl du surnageant (dilué de façon à se situer entre 1 et 1,5 mg de protéines/ml, soit 0,05 à 0,75 mg dans la cuve) à laquelle on ajoute 750 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4), et 200 µl H₂O₂ (500 mM) préparé extemporanément [1,42 ml eau oxygénée à 30 volumes (garder en chambre froide), 25 ml tampon phosphate (100 Mm pH 7,4)]. Après agitation, la lecture est effectuée au spectrophotomètre. L'activité décroît 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 le spectrophotomètre. 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 H₂O₂.

L'activité spécifique de la CAT, exprimée dans nos résultats en, µMol/min/mg de protéine, est déterminée par la formule suivante:

$$\text{CAT (mMol/min/mg de protéines)} = \frac{\text{DO max} - \text{DO min}}{0,04} / \text{mg de protéines}$$

DO max : Densité optique maximum obtenue.

DO min : Densité optique minimum obtenue.

0,04 : m Mole⁻¹ Cm⁻¹ : Coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène (à 240 nm).

mg de protéines: Quantité de protéines exprimée en mg.

1- 16,11 g Na₂ HPO₄ (a) —————> dilué dans 500ml d'eau distillée.

2 -1,38 g NaHPO₄ (b) —————> dilué dans 500ml d'eau distillée.

Mélanger 404 ml de la solution a avec 95,5 ml de la solution b

8. Evaluation des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires

8.1. Echantillonnage

Les adultes femelles de *D. melanogaster*, provenant des séries témoins et traitées (adultes ayant survécu après le traitement des pupes) avec le Neem Azal (DI₂₅ et DI₅₀), sont échantillonnés à différents temps (6, 12, 18 et 24 heures) au cours du premier cycle gonadotrophique. Le corps gras et les ovaires, sites de synthèse des vitellogénines (Swevers *et al.*, 2005) sont prélevés sous loupe binoculaire. Les prélèvements biologiques, ovaires ou corps gras préalablement pesés, sont ensuite déposés dans des tubes contenant un tampon (Tris-HCl-NaCl) permettant l'extraction des vitellogénines. La conservation se fait à -20C° jusqu'au dosage.

8.2. Extraction et dosage des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires

L'extraction des vitellogénines 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 (pH 7,4; 0,5 M)¹, sont broyés aux ultrasons puis l'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 5000 trs/min pendant 10 minutes. La fraction soluble obtenue est récupérée puis déposée dans un tube eppendorf. Les échantillons sont ensuite conservés au froid (-20°C) jusqu'au dosage.

Les vitellogénines dans le corps gras et les ovaires ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 (BBC)² comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (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 contre un blanc de gamme (Tableau 1).

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

Tableau 1 : Dosage des vitellogénines chez *D. melanogaster* : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de BSA (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

9. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont représentés par la moyenne suivie de l'écart type pour chaque groupe d'expérience ($m \pm sd$). Pour toutes les séries de données l'égalité des variances a été confirmée grâce aux tests de Bartlett et Levene avant l'utilisation des tests paramétriques. La régression non linéaire, le test « t » de Student ($p = 5\%$), l'analyse de variance (un et deux critères de classification) ou encore le test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey ont été utilisés pour mettre en évidence des différences entre les échantillons mais aussi pour définir des groupes ou des classes selon leurs effets (classement des doses).

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism d'analyse et de traitement statistique des données version 6.01 pour Windows XP.

RESULTATS

RESULTATS

1. Toxicité de l’Huile de Neem et du Neem Azal sur l’inhibition de l’exuviation adulte

L’efficacité de deux formulations commerciales, Huile de Neem et Neem Azal, a été testée, par application topique, sur des nymphes nouvellement exuviées de *D. melanogaster*. La mortalité a été relevée à l’émergence de l’adulte. Les doses, correspondant à 25 et 50% de l’inhibition de l’exuviation adulte (DI_{25} et DI_{50}), caractérisant la toxicité d’un insecticide, ont été déterminées.

1.1. Effets de l’Huile de Neem sur l’inhibition de l’exuviation adulte

Le traitement avec l’Huile de Neem, en application topique à différents doses (0,5, 1, 1,62, 3,25, 6,5 μ g) le jour de l’exuviation nymphale de *D. melanogaster*, a induit une inhibition de la mue adulte dont les pourcentages sont précisés dans le [tableau 2](#). L’inhibition de la mue adulte, de l’ordre de $10,36 \pm 3,39$ chez les témoins (Inhibition naturelle) augmente, chez les séries traitées significativement avec une relation dose réponse; ainsi, il est noté, pour la dose la plus élevée, un pourcentage d’inhibition observée de $96,15 \pm 6,66$.

Tableau 2: Effets de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes doses (μ g) le jour de l’exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Inhibition observée (%) de la mue adulte. ($m \pm sd$; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,5	1	1,62	3,25	6,5
R1	13,33	23,33	46,66	80	70	100
R2	11,33	23,33	53,33	76,92	98,33	88,46
R3	6,66	13,33	46,66	60	90	100
m \pm sd	10,36\pm3,39	19,99\pm5,77	48,88\pm3,85	72,30\pm10,76	86,11\pm14,56	96,15\pm6,66

Les pourcentages d’inhibition observées, chez les séries traitées, ont été corrigées par la formule d’Abbott (1925) afin d’éliminer le pourcentage d’inhibition naturelle ([Tableau 3](#)). Les pourcentages d’inhibitions corrigées de l’ordre de $10,80 \pm 3,35$ à la dose la plus faible (0,5 μ g) augmentent graduellement et sont de $95,67 \pm 7,49$ à la dose la plus élevée (6,5 μ g).

L’analyse statistique des résultats, présentée dans le [tableau 4](#), révèle une relation dose-réponse avec une différence hautement significative ($p < 0,0001$). Un classement des doses réalisé, grâce au test HSD de Tukey, permet de classer les doses testées en fonction de leur toxicité ([Fig. 5](#)). Les résultats révèlent l’existence de quatre groupes présentant des effets

différents du pesticide sur les pourcentages d'inhibition de la mue adulte ; ainsi dans un ordre croissant les doses sont : 0,5 µg < 1 et 1,62 µg < 1,62 et 3,25 µg < 3,25 et 6,5 µg.

Tableau 3: Effets de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l’exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Inhibition corrigée (%) de la mue adulte. (m ± sd; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

Répétitions	0,5	1	1,62	3,25	6,5
R1	11,53	38,45	76,92	65,38	100
R2	13,74	47,49	74,03	98,12	87,01
R3	7,14	42,85	57,14	89,28	100
m ± sd	10,80± 3,35	42,93±4,52	69,36±10,68	84,26±16,93	95,67±7,49

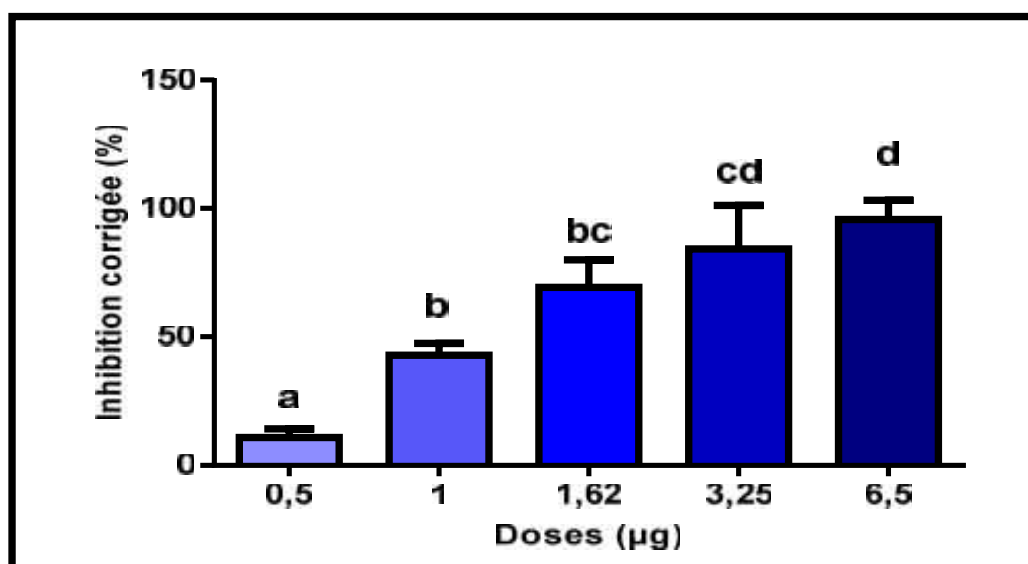


Figure 5. Effets de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l’exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : Inhibition corrigée de la mue adulte et classement des doses testées par le test HSD de Tukey.

Tableau 4: Effets de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l’exuviation nymphale chez *D. melanogaster*, sur le pourcentage d’inhibition corrigé de la mue adulte : Analyse de la variance a un critère de classification. (m ± sd; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

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

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

La régression non linéaire a permis d'obtenir la courbe dose-réponse chez les pupes de *D. melanogaster* ; cette courbe, exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose de l'Huile de Neem présente un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 0,9897$). Cette valeur révèle une liaison très forte entre le pourcentage d'inhibition corrigé et le logarithme de la dose (Fig. 6). Les différentes doses d'inhibition de la mue adulte et leur intervalle de confiance ont été également déterminées par cette analyse; les DI_{25} et DI_{50} sont de l'ordre de 0,687 [0,528-0,893] et 1,170 μg [0,988 -1,384] respectivement (Tableau 5).

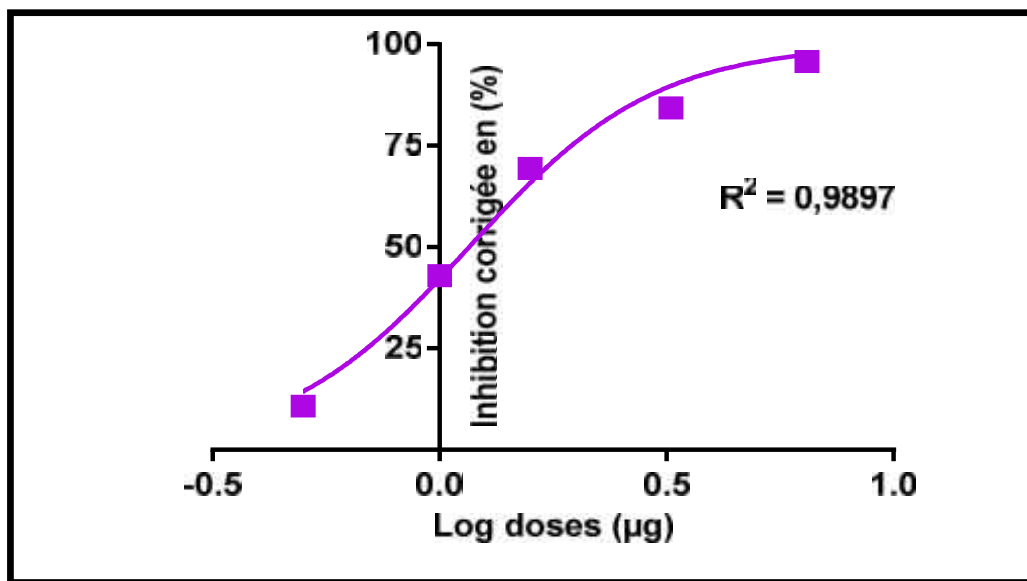


Figure 6. Effets de l'Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose de l'Huile de Neem (μg).

Tableau 5: Effets de l'Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : Détermination des doses d'inhibition de la mue adulte (DI en μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.

Composé	DI_{10}	DI_{25}	DI_{50}	DI_{90}	Hill Slope	Erreur Standard
Huile de Neem	0,403 [0,263-0,618]	0,687 [0,528-0,893]	1,170 [0,98 -1,384]	3,388 [2,264-5,058]	2,066 [1,331-2,802]	0,2311

1.2. Effets du Neem Azal sur l'inhibition de l'exuviation adulte

Le [tableau 6](#) présente les pourcentages d'inhibition observés de la mue adulte après traitement avec le Neem Azal aux différentes doses (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2,5 ; 4,5 µg). Le pourcentage d'inhibition augmente de manière proportionnelle aux doses administrées avec une valeur de $91,28 \pm 2,79$ à la dose la plus forte et ce, comparativement à l'inhibition naturelle, chez les témoins, qui est de $10,81 \pm 0,75$.

Tableau 6: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Inhibition observée (%) de la mue adulte. ($m \pm sd$; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,5	1	1,5	2,5	4,5
R1	10,55	29,46	49,99	66,71	83,32	92,68
R2	10,23	29,01	46,66	73,44	80	88,06
R3	11,66	28,56	53,33	67,12	85,71	93,11
m ± sd	10,81±0,75	29,01±0,45	49,99±3,33	69,09±3,77	83,01± 2,86	91,28± 2,79

L'élimination de la mortalité naturelle, permet l'obtention des pourcentages d'inhibition corrigés de la mue adultes présentés dans le [tableau 7](#). Les résultats obtenus, montrant une augmentation de l'inhibition adulte en fonction des doses, indiquent des valeurs de l'ordre de $19,13 \pm 0,51$ à la dose la plus faible (0,5µg) à $90,07 \pm 3,19$ à la dose la plus forte (4,5 µg) ([Tableau 7](#)).

L'analyse statistique effectuée révèle un effet dose réponse hautement significatif ($p < 0,001$) ([Tableau 8](#)). Un classement des doses, réalisé grâce au test HSD de Tukey, montre cinq groupes démontrant une toxicité différente chez *D. melanogaster* ; dans l'ordre croissant, les doses sont classées comme suit : $0,5 \mu\text{g} < 1 \mu\text{g} < 1,5 < 2,5 < 4,5 \mu\text{g}$ ([Fig. 7](#)).

Tableau 7: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster*: Inhibition corrigée (%) de la mue adulte. ($m \pm sd$; n = 3 répétitions de 30 individus chacune).

Répétitions	0,5	1	1,5	2,5	4,5
R1	18,62	43,02	61,60	81,46	91,56
R2	19,13	42,85	69,19	77,50	86,41
R3	19,64	45,85	63,48	83,51	92,26
m ± sd	19,13 ± 0,51	43,9 ± 1,68	64,75 ± 3,95	80,82 ± 3,05	90,07 ± 3,19

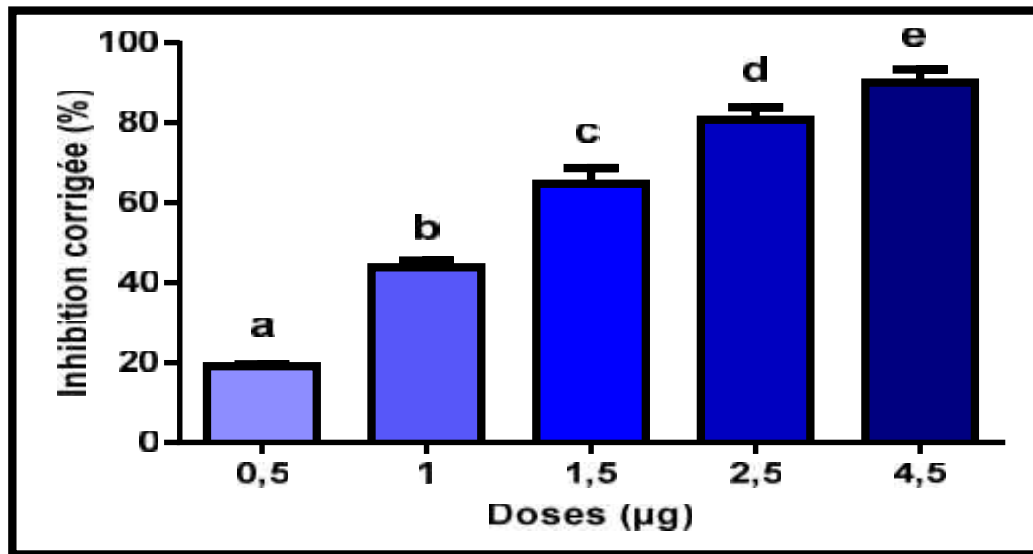


Figure 7. Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : Inhibition corrigée de la mue adulte et classement des doses testées par le test HSD de Tukey.

Tableau 8: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster*, sur le pourcentage d'inhibition corrigée de la mue adulte : Analyse de la variance à un critère de classification. ($m \pm \text{sd}$; $n = 3$ répétitions de 30 individus chacune).

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	3952	4	987,9	235,7	0,0001***
Erreur résiduelle	41,92	10	4,19	-	-
Total	3994	14	-	-	-

*** : hautement significatif ($p < 0,0001$) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

La courbe dose-réponse, exprimant le pourcentage d'inhibition corrigé, chez les pupes de *D. melanogaster*, en fonction du logarithme de la dose du Neem Azal présente un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 0,996$) démontrant une liaison très forte entre les deux paramètres mortalité et doses (Fig. 8). Par ailleurs, cette analyse a permis de déterminer les différentes doses d'inhibition de la mue adulte qui sont présentées dans le tableau 9 ; la DI_{25} et la DI_{50} et leurs intervalles de confiance sont de l'ordre de 0,595 [0,512-0,692] et 1,106 μg [1,012-1,209] respectivement (Tableau 9).

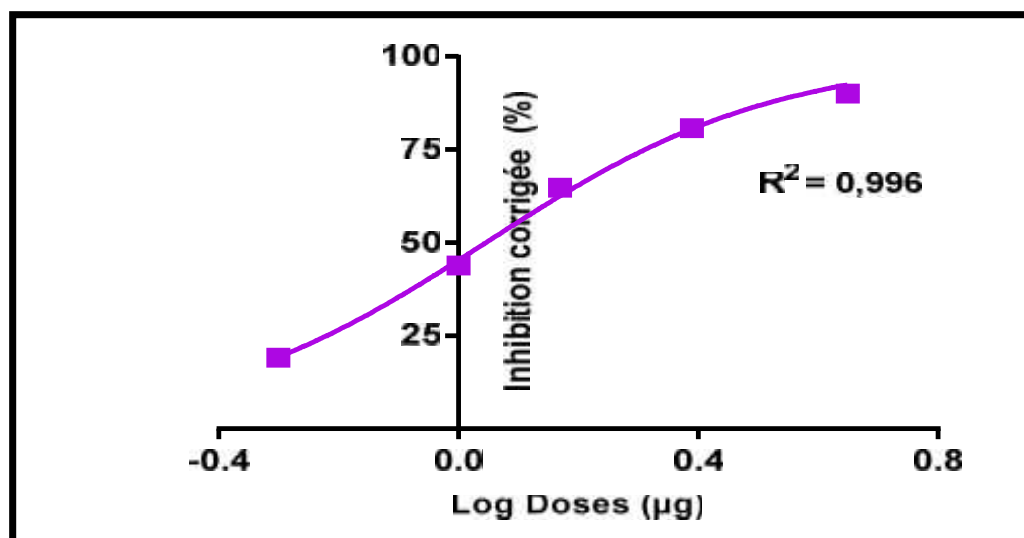


Figure 8. Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage d'inhibition corrigée en fonction du logarithme de la dose testée (μg).

Tableau 9: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : Détermination des doses d'inhibition de la mue adulte ou DI (μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.

Composé	DI ₁₀	DI ₂₅	DI ₅₀	DI ₉₀	Hill Slope	Erreur Standard
Neem Azal	0,321 [0,251- 0,409]	0,595 [0,512-0,692]	1,106 [1,012-1,209]	3,811 [3,082-4,711]	1,776 [1,474-2,078]	0,094

1.3. Comparaison de la toxicité entre l'Huile de Neem et le Neem Azal

La comparaison de la toxicité entre Huile de Neem et de Neem Azal révèle que les deux formulations commerciales ont la même toxicité; en effet, les doses d'inhibitions de la mue adulte (DI) sont comparables car les valeurs des doses sont situées dans les mêmes intervalles de confiance (Tableau 10).

Pour les différentes expérimentations et pour les deux molécules seules les DI₂₅ et DI₅₀ ont été testées.

Tableau 10: Effets de l’Huile de Neem et du Neem Azal, administrés *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l’exuviation nymphale chez *D. melanogaster* : comparaison des doses d’inhibition de la mue adulte (DI en μg) et leurs intervalles de confiance à 95%.

Doses d’inhibition de la mue adulte	Huile de Neem	Neem Azal
DI ₁₀	0,40 [0,26- 0,61]	0,32 [0,25- 0,40]
DI ₂₅	0,68 [0,52 -0,89]	0,59 [0,51-0,69]
DI ₅₀	1,17 [0,98 -1,38]	1,10 [1,01-1,20]
DI ₉₀	3,38 [2,26- 5,05]	3,81 [3,08-4,71]

2. Effets de l’Huile de Neem et du Neem Azal sur la croissance pondérale des pupes

La croissance pondérale, paramètre de développement peut permettre d’évaluer l’impact de pesticides ; ainsi, les deux formulations testées ont été évaluées au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*.

2.1. Effet de l’Huile de Neem sur la croissance pondérale des pupes

La comparaison des poids des pupes en fonction de l’âge et pour un même stade est donné dans le [tableau 11](#).

Chez les séries témoins, le poids des pupes à 0 jour, est de l’ordre de $1,34 \pm 0,04$ mg et les valeurs restent comparables jusqu’à l’exuviation adulte ($p = 0,05$).

Chez les séries traitées à l’Huile de Neem le poids des pupes à 0 jour est de l’ordre de $1,33 \pm 0,04$ et $1,35 \pm 0,04$ mg pour les deux doses testées DI₂₅ et DI₅₀ respectivement; une diminution significative est notée dès le second jour de la pupa et ce, jusqu’à l’émersion adulte ([Tableau 11](#)).

La comparaison entre les séries témoins et traitées ([Fig. 9](#)) indique que l’Huile de Neem administrée, le jour de l’exuviation nymphale de *D. melanogaster*, à la DI₂₅ et la DI₅₀ induit une diminution dans le poids de pupes le 2^{ème} ($p < 0,0001$) et 3^{ème} jour ($p < 0,0001$) après traitement. Il n’existe aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les séries traitées.

L’analyse de la variance à deux critères de classification effectuée entre les séries témoins et traitées ([Tableau 12](#)) révèle un effet âge, un effet traitement et une interaction

âge-traitement hautement significatifs ($p < 0,0001$).

Tableau 11: Effets de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique, (DI_{25} : 0,68 et DI_{50} : 1,17 μg) le jour de l’exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*. ($m \pm \text{sd}$; $n = 20$). Comparaison des moyennes à différents âges pour une même série. Les moyennes suivies d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Ages (Jours)	Témoins	DI_{25}	DI_{50}
0	1,34 \pm 0,04 A	1,33 \pm 0,04 A	1,35 \pm 0,04 A
1	1,33 \pm 0,04 A	1,31 \pm 0,10 A	1,32 \pm 0,05 A
2	1,35 \pm 0,04 A	1,21 \pm 0,04 B	1,18 \pm 0,10 B
3	1,35 \pm 0,06 A	1,17 \pm 0,09 B	1,14 \pm 0,09 B

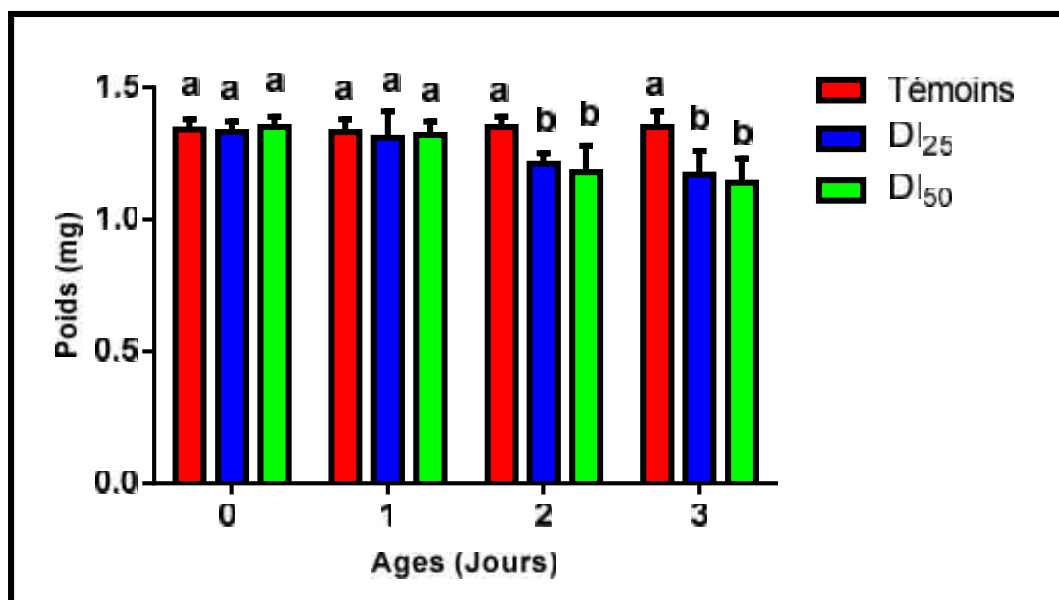


Figure 9. Effets de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique, (DI_{25} : 0,68 et DI_{50} : 1,17 μg) le jour de l’exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*. ($m \pm \text{sd}$; $n = 20$). Comparaison des moyennes pour un même âge entre les différentes séries. Les moyennes suivies d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Tableau 12: Effets de l’Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,68 et DI₅₀ : 1,17 µg) le jour de l’exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*. ($m \pm sd$; n = 20). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,407	2	0,067	50,72	0,0001***
Age	0,594	3	0,198	45	0,0001***
Interaction	0,446	6	0,223	15,42	0,0001***
Erreur résiduelle	1.003	228	0,0044		

*** : hautement significatif ($p < 0,0001$). ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

2.2. Effet du Neem Azal sur la croissance pondérale des pupes

Le [tableau 13](#) présente les effets du Neem Azal sur la croissance pondérale chez les pupes en fonction de l’âge et pour une même série.

Chez les séries témoins ([Tableau 13](#)), le poids des pupes, le jour de l’exuviation nymphale, est de l’ordre de $1,35 \pm 0,06$ mg et reste comparable pendant toute la durée du stade pupal chez *D. melanogaster* ($p = 0,05$).

Chez les séries traitées au Neem Azal à la DI₂₅ et DI₅₀ le poids des pupes diminue dès le second jour de la pupe ($p < 0,05$) et reste comparable jusqu’à l’exuviation adulte ($p > 0,05$) ([Tableau 13](#)).

Le Neem Azal administré, le jour de l’exuviation nymphale de *D. melanogaster*, aux deux doses testées (DI₂₅ et DI₅₀) induit une diminution dans le poids des pupes dès le second jour du stade nymphal ($p < 0,0001$), comparativement aux témoins. Par ailleurs, aucune différence significative ($p > 0,05$) n’est observée entre les deux doses testées traitées ([Fig. 10](#)).

L’analyse de la variance, à deux critères de classification, effectuée sur le poids des nymphes entre les séries témoins et traitées ([Tableau 14](#)) révèle un effet âge, un effet traitement et une interaction âge-traitement hautement significatifs ($p < 0,0001$).

Tableau 13: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 20). Comparaison des moyennes à différents âges pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Âges (Jours)	Témoins	DI ₂₅	DI ₅₀
0	1,355 ± 0,06 A	1,34 ± 0,05 A	1,35 ± 0,05 A
1	1,325 ± 0,04 A	1,30 ± 0,14 A	1,345 ± 0,06 A
2	1,345 ± 0,06 A	1,195 ± 0,08 B	1,145 ± 0,09 B
3	1,38 ± 0,05 A	1,15 ± 0,06 B	1,175 ± 0,11 B

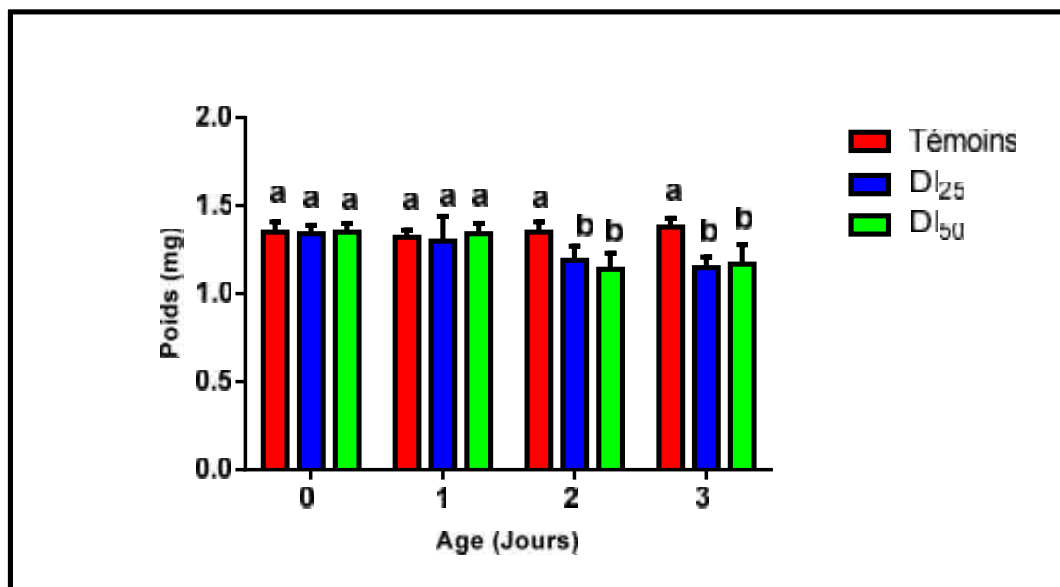


Figure 10. Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 20). Comparaison des moyennes pour un même âge entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Tableau 14 : Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 20). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	0,5490	2	0,2745	42,79	0,0001***
Age	0,6711	3	0,2237	34,88	0,0001***
Interaction	0.5440	6	0,09067	14,13	0,0001***
Erreur résiduelle	1,46	228	0,006414		

*** : hautement significatif (p < 0,0001). ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

2.3. Comparaison entre l'Huile de Neem et le Neem Azal sur la croissance pondérale des pupes

La comparaison, des effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal, sur la croissance pondérale au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*, montre des différences significatives entre les séries témoins et les séries traitées au second et troisième jour; par ailleurs, le test HSD de tukey révèle que pour les doses testées (DI₂₅ et DI₅₀) de l'Huile de Neem et le Neem Azal présentent des effets similaires sur la croissance pondérale (Tableaux 15 et 16).

Tableau 15: Effets du Neem Azal et de l'Huile de Neem, administrés *in vivo*, par application topique, (DI₂₅) le jour de l'exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*: Classement des molécules testées par le test HSD de Tukey.

Ages (jours)	Traitement	Valeurs moyennes	Groupes
0	Témoins	1,35 ± 0,06	a
	Huile de Neem	1,33 ± 0,04	a
	Neem Azal	1,34 ± 0,05	a
1	Témoins	1,32 ± 0,04	a
	Huile de Neem	1,31 ± 0,10	a
	Neem Azal	1,30 ± 0,14	a
2	Témoins	1,345 ± 0,06	a
	Huile de Neem	1,21 ± 0,04	b
	Neem Azal	1,195 ± 0,08	b
3	Témoins	1,38 ± 0,05	a
	Huile de Neem	1,17 ± 0,09	b
	Neem Azal	1,15 ± 0,06	b

Tableau 16: Effets du Neem Azal et de l’Huile de Neem, administrés *in vivo*, par application topique, (DI_{50}) le jour de l’exuviation nymphale sur la croissance pondérale (mg) au cours du stade pupal chez *D. melanogaster*: Classement des molécules testées par le test HSD de Tukey.

Ages (jours)	Traitement	Valeurs moyennes	Groupes
0	Temoins	1,35 ± 0,06	a
	Huile de Neem	1,35 ± 0,04	a
	Neem Azal	1,35 ± 0,05	a
1	Temoins	1,32 ± 0,04	a
	Huile de Neem	1,32 ± 0,05	a
	Neem Azal	1,34 ± 0,06	a
2	Temoins	1,34 ± 0,06	a
	Huile de Neem	1,18 ± 0,10	b
	Neem Azal	1,14 ± 0,09	b
3	Temoins	1,38 ± 0,05	a
	Huile de Neem	1,14 ± 0,09	b
	Neem Azal	1,17 ± 0,11	b

3. Effets du Neem Azal et de l’Huile de Neem sur le suivi de la descendance

Les pupes de *D. melanogaster* ont été traitées le jour de l’exuviation nymphale puis les adultes survivants ont été prélevés le jour de l’émergence ; les mâles et les femelles ont ensuite été accouplées en procédant à différentes combinaisons entre les individus témoins et traités aux deux doses (cf: matériel et méthodes). Au bout de 48 heures d’accouplement, les différents couples constitués sont retirés et la génération 1 ou F1 est suivie quotidiennement. L’effet différé de l’Huile de Neem et du Neem Azal a pu être évalué en procédant au comptage du nombre d’œufs, larves (L3), pupes et adultes exuviées pour chaque série d’expérimentations.

3.1. Effets du Neem Azal sur le suivi de la descendance

Chez les séries témoins le nombre d’œufs pondus est de $72,88 \pm 6,64$. Ce nombre diminue et atteint des valeurs respectives de $62 \pm 5,01$; $58,88 \pm 7,21$; $45,77 \pm 8,21$; $38,25 \pm 7,14$; $28 \pm 2,67$ pour les couples $M_T \times F_{DI25}$; $M_{DI50} \times F_T$; $M_T \times F_{DI50}$; $M_{DI25} \times F_{DI25}$; $M_{DI50} \times F_{DI50}$ (Tableau 17).

Le nombre de larves (L3), de pupes et d’adultes, chez les séries témoins, est de l’ordre de $71,66 \pm 6,36$; $71,66 \pm 6,36$ et $70,44 \pm 5,59$ respectivement ; Cette valeur, chez le couple où le mâle et la femelle sont issues d’un traitement à la plus forte dose ($F_{DI50} \times M_{DI50}$), diminue, significativement, pour atteindre $25,12 \pm 1,88$ pour larves (L3), $24,75 \pm 1,83$ pour les pupes et

22,5 ± 2,13 pour les adultes. L'analyse statistique des données (Tableau 17) révèle, comparativement aux témoins, une diminution ($p < 0,05$) dans le nombre d'œufs, larves, pupes et adultes pour toutes les séries provenant des adultes ayant survécu au traitement des pupes, excepté pour le couple où seul le mâle provient d'un traitement à la plus faible dose ($F_T \times M_{DI25}$).

La comparaison entre les séries traitées pour chaque stade du développement révèle un effet dose significatif entre les différents couples formés ($p < 0,0001$); le test HSD de Tukey a permis de classer les couples en quatre groupes pour les stades œufs, larves, pupes mais en cinq groupes pour le stade adulte. Ainsi, pour tous les stades de développement il est possible de classer les différents couples en fonction de l'effet croissant du Neem-Azal sur la descendance :

Œufs, larves et pupes : $M_T \times F_T$; $M_{DI25} \times F_T < M_T \times F_{DI25}$; $M_{DI50} \times F_T < M_T \times F_{DI50}$; $M_{DI25} \times F_{DI25} < M_{DI50} \times F_{DI50}$.

Adultes: $M_T \times F_T$; $M_{DI25} \times F_T < M_{DI25} \times F_T$; $M_T \times F_{DI25} < M_T \times F_{DI25}$; $M_T \times F_{DI50} < M_T \times F_{DI50}$; $M_{DI25} \times F_{DI25} < M_{DI50} \times F_{DI50}$.

Tableau 17: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI_{25} : 0,59 et DI_{50} : 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des descendants (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. ($m \pm sd$; $n = 9$). Comparaison des moyennes à différents couples pour un même stade du développement. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

	Œufs	Larves (L3)	Pupes	Adultes
Témoins	72,88 ± 6,64 a	71,66 ± 6,36 a	71,66 ± 6,36 a	70,44 ± 5,59 a
$M_{DI25} \times F_T$	72,33 ± 6,26 a	70,55 ± 6,00 a	70,00 ± 6,10 a	67,00 ± 5,91 ab
$M_T \times F_{DI25}$	62,00 ± 5,01 b	60,12 ± 4,88 b	59,62 ± 5,26 b	59,25 ± 5,36 bc
$M_{DI50} \times F_T$	58,88 ± 7,21 b	55,88 ± 7,07 b	54,88 ± 7,92 b	53,77 ± 7,64 c
$M_T \times F_{DI50}$	45,77 ± 8,21 c	43,66 ± 8,78 c	42,88 ± 9,08 c	39,22 ± 6,32 d
$M_{DI25} \times F_{DI25}$	38,25 ± 7,14 c	36,37 ± 7,34 c	35,12 ± 7,41 c	34,50 ± 7,30 d
$M_{DI50} \times F_{DI50}$	28,00 ± 2,67 d	25,12 ± 1,88 d	24,75 ± 1,83 d	22,50 ± 2,13 e

3.2. Effets de l'Huile de Neem sur le suivi de la descendance

Chez les séries témoins le nombre d'œufs pondus est de 71,88 ± 3,5. Ce nombre diminue et atteint des valeurs respectives de 59,33 ± 4,22 ; 56,00 ± 6,44 ; 40,99 ± 7,10; 37,13

$\pm 6,10$; $26,89 \pm 3,55$ pour les couples $M_T \times F_{DI_{25}}$; $M_{DI_{50}} \times F_T$; $M_T \times F_{DI_{50}}$; $M_{DI_{25}} \times F_{DI_{25}}$; $M_{DI_{50}} \times F_{DI_{50}}$ (Tableau 18).

Le nombre de larves (L3), de pupes et d'adultes, chez les séries témoins, est de l'ordre de $70,10 \pm 5,25$; $69,33 \pm 4,33$ et $68,50 \pm 3,44$ respectivement ; Cette valeur, chez le couple où le mâle et la femelle sont issues d'un traitement à la plus forte dose ($F_{DI_{50}} \times M_{DI_{50}}$), diminue significativement, pour atteindre $24,33 \pm 2,10$ pour larves (L3), $22,66 \pm 2,99$ pour les pupes et $20,10 \pm 3,13$ pour les adultes. L'analyse statistique des données, révèle comparativement aux témoins une diminution ($p < 0,05$) dans le nombre d'œufs, larves, pupes et adultes pour toutes les séries provenant des adultes ayant survécu au traitement, excepté pour le couple où seul le mâle provient d'un traitement à la plus faible dose ($F_T \times M_{DI_{25}}$).

La comparaison entre les séries traitées pour chaque stade du développement révèle un effet dose significatif entre les différents couples formés ($p < 0,0001$); le test HSD de Tukey a permis de classer les couples en quatre groupes pour les stades œufs, larves, pupes mais seulement en cinq groupes pour le stade adulte. Ainsi, pour tous les stades de développement il est possible de classer les différents couples en fonction de l'effet croissant du Neem-Azal sur la descendance

Œufs, larves et pupes : $M_T \times F_T$; $M_{DI_{25}} \times F_T < M_T \times F_{DI_{25}}$; $M_{DI_{50}} \times F_T < M_T \times F_{DI_{50}}$; $M_{DI_{25}} \times F_{DI_{25}} < M_{DI_{50}} \times F_{DI_{50}}$.

Adultes: $M_T \times F_T$; $M_{DI_{25}} \times F_T < M_{DI_{25}} \times F_T$; $M_T \times F_{DI_{25}} < M_T \times F_{DI_{25}}$; $M_T \times F_{DI_{50}} < M_T \times F_{DI_{50}}$; $M_{DI_{25}} \times F_{DI_{25}} < M_{DI_{50}} \times F_{DI_{50}}$.

Tableau 18: Effets de l'Huile de Neem, administrée *in vivo*, par application topique, (DI_{25} : 0,68 et DI_{50} : 1,17 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des descendants (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. ($m \pm \text{sd}$; $n = 9$). Comparaison des moyennes à différents couples pour un même stade du développement. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

	Œufs	Larves (L3)	Pupes	Adultes
Témoins	$71,00 \pm 3,50$ a	$70,10 \pm 5,25$ a	$69,33 \pm 4,33$ a	$68,50 \pm 3,44$ a
$M_{DI_{25}} \times F_T$	$70,10 \pm 5,12$ a	$68,00 \pm 2,33$ a	$66,13 \pm 3,88$ a	$62,10 \pm 8,10$ ab
$M_T \times F_{DI_{25}}$	$59,33 \pm 4,22$ b	$57,13 \pm 3,20$ b	$56,33 \pm 3,13$ b	$54,25 \pm 9,10$ bc
$M_{DI_{50}} \times F_T$	$56,00 \pm 6,44$ b	$54,55 \pm 6,88$ b	$52,95 \pm 6,88$ b	$50,44 \pm 6,33$ c
$M_T \times F_{DI_{50}}$	$40,99 \pm 7,10$ c	$39,22 \pm 4,55$ c	$38,40 \pm 4,14$ c	$35,22 \pm 7,00$ d
$M_{DI_{25}} \times F_{DI_{25}}$	$37,13 \pm 6,10$ c	$35,33 \pm 2,33$ c	$33,00 \pm 3,40$ c	$31,25 \pm 5,39$ d
$M_{DI_{50}} \times F_{DI_{50}}$	$26,89 \pm 3,55$ d	$24,33 \pm 2,10$ d	$22,66 \pm 2,99$ d	$20,10 \pm 3,13$ e

3.3. Comparaison de l'effet de l'Huile de Neem et le Neem Azal sur le suivi de la descendance

La comparaison entre les deux molécules, effectuée pour chaque stade de développement et pour les mêmes séries de couples, montre que l'Huile de Neem et le Neem Azal ont les mêmes effets sur le nombre des descendants (œufs, larves, pupes et adultes) provenant des adultes qui ont survécu après traitements des pupes (Tableaux 19,20, 21,22).

Tableau 19: Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal, administrés *in vivo*, par application topique, (DI₂₅ et DI₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre d'œufs (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd; n = 9). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

	Œufs					
	F _T xM _{DI25}	F _{DI25} xM _T	F _T xM _{DI50}	F _{DI50} xM _T	F _{DI25} xM _{DI25}	F _{DI50} xM _{DI50}
Neem Azal	72,33 ±6,26 a	62,00 ± 5,01 a	58,88 ±7,21 a	45,77 ±8,21 a	38,25 ±7,14 a	28 ±2,67 a
Huile de Neem	70,10 ±5,12 a	59,33 ± 4,22 a	56,00 ±6,44 a	40,99 ±7,10 a	37,13 ±6,10 a	26,89 ±3,55 a

Tableau 20: Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal, administrés *in vivo*, par application topique, (DI₂₅ et DI₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des larves L3 (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd; n = 9). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

	Larves (L3)					
	F _T xM _{DI25}	F _{DI25} xM _T	F _T xM _{DI50}	F _{DI50} xM _T	F _{DI25} xM _{DI25}	F _{DI50} xM _{DI50}
Neem Azal	70,55 ±6,00 a	60,12 ±4,88 a	55,88 ±7,07 a	43,66 ±8,78 a	36,37 ±7,34 a	25,12 ±1,88 a
Huile de Neem	68,00 ±2,33 a	57,13 ±3,20 a	54,55 ±6,88 a	39,22 ±4,55 a	35,33 ±2,33 a	24,33±2,10 a

Tableau 21: Effets, de l'Huile de Neem et du Neem Azal, administrés *in vivo*, par application topique, (DI₂₅ et DI₅₀) le jour de l'exuviation nymphale sur le nombre des pupes (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. (m ± sd ; n = 9). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

	Pupes					
	F _T xM _{DI25}	F _{DI25} xM _T	F _T xM _{DI50}	F _{DI50} xM _T	F _{DI25} xM _{DI25}	F _{DI50} xM _{DI50}
Neem Azal	70,00 ±6,10 a	59,62 ±5,26 a	54,88 ±7,92 a	42,88 ±9,08 a	35,12 ±7,41 a	24,75 ±1,83 a
Huile de Neem	66,13 ±3,88 a	56,33 ±3,13 a	52,95 ±6,88 a	38,40 ±4,14 a	33,00 ±3,40 a	22,66 ±2,99 a

Tableau 22: Effets, de l’Huile de Neem et du Neem Azal, administrés *in vivo*, par application topique, (DI₂₅ et DI₅₀) le jour de l’exuviation nymphale sur le nombre des adultes (génération F1) provenant des adultes ayant survécu après traitement des pupes. ($m \pm sd$; $n = 9$). Les lettres minuscules comparent les séries traitées aux deux molécules pour un même couple. Les moyennes suivies d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

	Adultes					
	F _T xM _{DI25}	F _{DI25} xM _T	F _T xM _{DI50}	F _{DI50} xM _T	F _{DI25} xM _{DI25}	F _{DI50} xM _{DI50}
Neem Azal	67,00 ±5,91 a	59,25 ±5,36 a	53,77 ±7,64 a	39,22 ±6,32 a	34,50 ±7,30 a	22,50 ± 2,13 a
Huile de Neem	62,10 ±8,10 a	54,25 ±9,10 a	50,44 ±6,33 a	35,22 ±7,00 a	31,25 ±5,39 a	20,10 ±3,13 a

Les deux formulations commerciales ont la même toxicité et présentent des effets comparables sur la croissance pondérale et le suivi de la descendance. Par conséquent, pour tout le reste des expérimentations (biomarqueurs de toxicité, biomarqueur de reprotoxicité et le traitement combiné), seul le Neem Azal à été testé ; ce choix a été fait en fonction de la composition du Neem Azal où seul l’azadirachtine est présenté comme substance active.

4. Effets du Neem Azal sur les biomarqueurs de toxicité

Le Neem Azal a été utilisé *in vivo*, par application topique, le jour de l’exuviation nymphale de *D. melanogaster* aux deux doses d’inhibition de la mue adulte (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg). L’effet de cet insecticide a ensuite, été évalué sur l’activité spécifique des Glutathion S-Transférases et de la Catalase à différents temps (24, 48 et 72 heures) après traitement. Les résultats sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéines (µM/min/mg de protéines).

4.1. Effets du Neem Azal sur l’activité spécifique des Glutathion S-Transférases (GSTs)

Le [tableau 23](#) présente les résultats de l’activité spécifique des GSTs et compare les valeurs obtenues en fonction du temps dans une même série.

Chez les séries témoins, les valeurs de l’activité spécifique des GSTs ([Tableau 23](#)) sont de l’ordre $46,58 \pm 3,87$ µM/min/mg de protéines à 24 heures et restent comparable à 48 heures ($p = 0,349$) ; à 72 heures une diminution est notée ($p < 0,0001$) et une valeur moyenne de $38,97 \pm 3,55$ µM/min/mg de protéines est enregistrée.

Les valeurs de l'activité spécifique des la GSTs chez les séries traitées à la DI₂₅ (Tableau 23) sont de l'ordre $42,37 \pm 4,80$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines à 24 heures; une augmentation significative est ensuite notée seulement à 48 heures ($p = 0,0001$) ($64,70 \pm 6,97$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines); en effet, les valeurs restent comparables à 72 heures ($p = 0,121$) ($74,26 \pm 10,2$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines). Les séries traitées à la DI₅₀, présentent la même évolution que celles traitées à la DI₂₅ (Tableau 23).

La comparaison entre les séries témoins et traités (Fig. 11) montre que le Neem Azal induit, une augmentation significative de l'activité spécifique des GSTs chez les pupes de *D. melanogaster* (Fig. 11) à 48 ($p = 0,004$; $p < 0,0001$) et 72 heures ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$) pour la DI₂₅ et la DI₅₀ respectivement. Par ailleurs le Neem Azal agit avec un effet dose réponse seulement à 48 heures ($p = 0,037$). Les valeurs obtenus montrent que le Neem Azal entraîne un processus de détoxification dès 48 heures.

L'analyse de variance à deux critères de classification réalisée sur l'activité spécifique des GSTs (Tableau 24) entre les séries témoins et traitées au Neem Azal (DI₂₅ et DI₅₀) révèle un effet temps hautement significatif ($p < 0,0001$), un effet traitement très significatif ($p < 0,0001$) et une interaction traitement/temps hautement significatifs ($p < 0,0001$) (Tableau 24).

Tableau 23: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les pupes de *D. melanogaster*. ($m \pm \text{sd}$; $n = 5-8$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Temps (heures)	Témoins	DI ₂₅	DI ₅₀
24	$46,58 \pm 3,87$ A	$42,37 \pm 4,80$ A	$42,70 \pm 5,04$ A
48	$48,69 \pm 3,50$ A	$64,70 \pm 6,97$ B	$76,17 \pm 7,54$ B
72	$38,97 \pm 3,55$ B	$74,26 \pm 10,2$ B	$79,27 \pm 7,49$ B

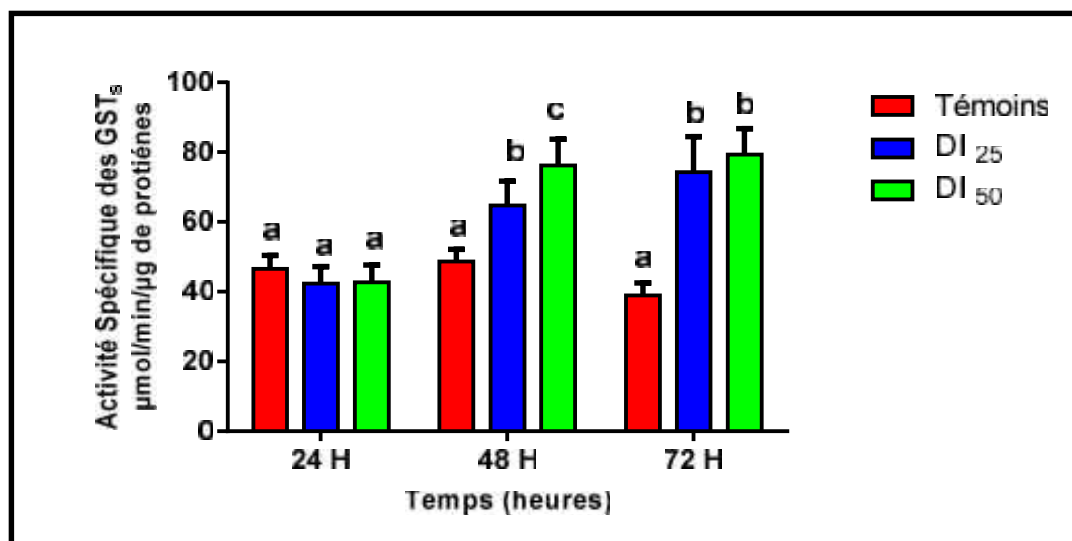


Figure 11. Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique des GSTs (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 5-8). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Tableau 24: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique des GSTs (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 5-8). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	4264	2	3132	59,72	0,0001***
Age	4240	2	2120	59,38	0,0001***
Interaction	3529	4	882,3	24,71	0,0001***
Erreur résiduelle	1500	42	35,70		

*** : hautement significatif (p<0,0001) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

4.2. Effets du Neem Azal sur l'activité spécifique de la catalase :

Le [tableau 25](#) présente les résultats de l'activité spécifique de la CAT et compare les valeurs obtenues en fonction du temps dans une même série.

Chez les séries témoins (Tableau 25), l'activité spécifique de la catalase indique une augmentation significative à 48 ($p = 0,010$) et 72 heures ($p = 0,007$) où les valeurs passent de $0,65 \pm 0,092$ à $0,82 \pm 0,118$ $\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

L'activité spécifique de la catalase chez les séries traitées au Neem Azal (DI_{25} et DI_{50}) augmente également à 48 ($p = 0,007$; $p = 0,0001$) mais aussi à 72 heures ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$) après traitement ; ainsi, à la DI_{25} , les valeurs chez les séries traitées passent de $0,77 \pm 0,097$ à $1,19 \pm 0,061$ $\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines et à la DI_{50} de $0,95 \pm 0,099$ à $1,47 \pm 0,126$ $\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Tableau 25).

La comparaison entre les séries témoins et traitées (Fig. 12) montre que le traitement au Neem Azal entraîne une augmentation hautement significative de l'activité spécifique de la catalase après 24 ($p = 0,01$; $p = 0,001$), 48 ($p = 0,02$; $p < 0,0001$) et 72 heures ($p < 0,001$; $p < 0,0001$) de traitement ; un effet dose dépendant est noté à 48 ($p = 0,002$) et 72 heures ($p = 0,0006$).

Les résultats enregistrés indiquent la mise en place chez les individus traités d'un stress oxydatif dès 24 heures et qui se poursuit tout au long du stade pupal.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (Tableau 26) révèle des différences hautement significatives pour l'effet traitement ($p < 0,0001$), l'effet temps ($p < 0,0001$) et l'interaction traitement-temps ($p < 0,0001$).

Tableau 25: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI_{25} : 0,59 et DI_{50} : 1,10 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les pupes de *D. melanogaster*. ($m \pm \text{sd}$; $n = 6-10$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Temps (heures)	Témoins	DI_{25}	DI_{50}
24	$0,54 \pm 0,038$ A	$0,62 \pm 0,06$ A	$0,70 \pm 0,10$ A
48	$0,65 \pm 0,092$ B	$0,77 \pm 0,097$ B	$0,95 \pm 0,099$ B
72	$0,82 \pm 0,118$ C	$1,19 \pm 0,061$ C	$1,47 \pm 0,126$ C

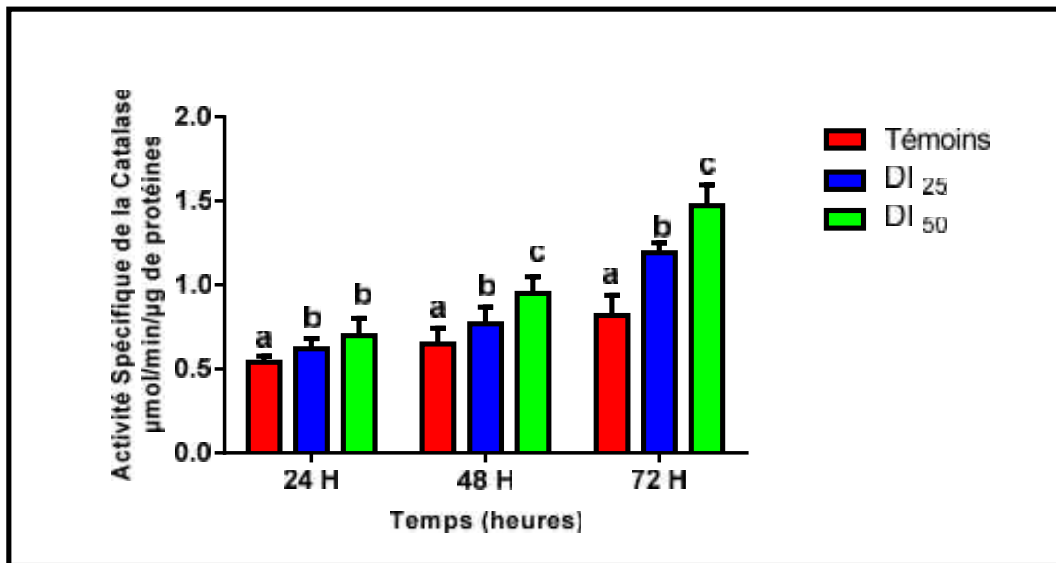


Figure 12. Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 6-10). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Tableau 26: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur l'activité spécifique de la catalase (µMol/min/mg de protéines) chez les pupes de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 6-10). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	1,508	2	0,7541	85,34	0,0001***
Age	2,95	2	1,475	166,9	0,0001***
Interaction	0,4279	4	0,1070	12,11	0,0001***
Erreur résiduelle	0,5037	57	0,008837		

*** : hautement significatif (p<0,0001) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

5. Effets de traitement combiné du Neem Azal et de la 20 E sur les biomarqueurs de toxicité

Le Neem Azal a été appliquée à la DI₅₀ (1,10 µg), le jour de l'exuviation nymphale puis la 20E a été administrée aux deux doses (0,25 et 0,50 µg) et à deux périodes différentes

(24 ou 48 heures) après le pesticide naturel. L'effet du traitement combiné a, ensuite, été évalué sur l'activité spécifique des Glutathion S-Transférases et de la catalase. Les résultats sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéines ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines).

5.1. Effets du traitement combiné sur l'activité spécifique des GSTs

La 20E exogène, testée aux deux doses et appliquée 24 et 48 h après le Neem Azal montre que le système des GSTs n'est pas induit comparativement au traitement seul avec le Neem Azal (Tableau 27). Ainsi, les valeurs obtenues suite au traitement combiné ($43,30 \pm 2,90$; $38,03 \pm 5,01 \mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines) sont comparables aux témoins ($43,90 \pm 8,36 \mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines) quand la 20E est appliquée 48 h après le Neem Azal; cependant, lorsque l'application de la 20 E ($0,25$ et $0,5 \mu\text{g}$) s'effectue 24 h après le Neem Azal une diminution de l'activité spécifique des GSTs est observée ($34,20 \pm 1,99$; $27,39 \pm 3,38 \mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines).

Tableau 27: Effets de la 20 Hydroxyecdysone ($0,25$ et $0,5 \mu\text{g}$) sur l'activité spécifique de GSTs mesurée 72 heures après l'exuviation nymphale en fonction du temps (24 et 48 heures) après l'application topique du Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) sur des pupes nouvellement exuviées de *D. melanogaster*. ($m \pm \text{sd}$; $n = 5-7$). Pour toutes les séries les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Traitement	Activité spécifique de GSTs ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines) (72 h après l'exuviation nymphale)
Témoins	$43,90 \pm 8,36$ a
Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,25 \mu\text{g}$) 24 h après	$34,20 \pm 1,99$ bc
Neem Azal ($1,10\mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,5 \mu\text{g}$) 24 h après	$27,39 \pm 3,38$ b
Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,25 \mu\text{g}$) 48 h après	$43,30 \pm 2,90$ a
Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,5 \mu\text{g}$) 48 h après	$38,03 \pm 5,01$ ac

5.2. Effets du traitement combiné sur l'activité spécifique de la Catalase

La comparaison entre les séries témoins et celle des séries traitées de manière combinée avec le Neem Azal suivi de la 20E montre des valeurs comparables de l'activité spécifique de la catalase (Tableau 28). En effet, chez les témoins, il est noté une valeur de l'ordre $0,77 \pm 0,15 \mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines ; cette valeur reste comparable suite au traitement combiné avec le Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) et la 20E appliqué aux deux doses ($0,25$ et $0,5 \mu\text{g}$) et aux deux temps (24 et 48 heures) respectivement $0,63 \pm 0,10$; $0,60 \pm 0,12$; $0,98 \pm 0,28$; $0,85 \pm 0,28 \mu\text{Mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Tableau 28).

L'application de 20E restaure donc les valeurs physiologiques pour les deux doses testées ($0,25$ et $0,5 \mu\text{g}$) et pour les deux périodes d'application après traitement au Neem Azal (24 et 48 heures) ; il est observé, pour la dose $0,25 \mu\text{g}$ de 20E, un retour à des valeurs de base plus marqué à 48 heures comparativement à 24 heures pour la dose $0,5 \mu\text{g}$ de 20 E (Tableau 28).

Tableau 28: Effets de la 20 Hydroxyecdysone ($0,25$ et $0,5 \mu\text{g}$) sur l'activité spécifique de catalase mesurée 72 heures après l'exuviation nymphale en fonction du temps (24 et 48 heures) après l'application topique du Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) sur des pupes nouvellement exuviées de *D. melanogaster*. ($m \pm \text{sd}$; $n = 5-7$). Pour toutes les séries les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Traitement	Activité spécifique de la Catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines) (72 h après l'exuviation nymphale)
Témoins	$0,77 \pm 0,15$ ab
Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,25 \mu\text{g}$) 24 h après	$0,63 \pm 0,10$ ab
Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,5 \mu\text{g}$) 24 h après	$0,60 \pm 0,12$ a
Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,25 \mu\text{g}$) 48 h après	$0,98 \pm 0,28$ b
Neem Azal ($1,10 \mu\text{g}$) suivi par la 20E ($0,5 \mu\text{g}$) 48 h après	$0,85 \pm 0,28$ ab

6. Effets du Neem Azal sur les vitellogénines dans les corps gras et les ovaires

Le Neem Azal a été utilisé *in vivo*, par application topique, le jour de l'exuviation nymphale de *D. melanogaster* aux deux doses d'inhibition de la mue adulte (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) puis évalué chez les adultes femelles. L'effet de cet insecticide a été déterminé sur le contenu en vitellogénines dans les corps gras et les ovaires du fait de leur synthèse au niveau de ces deux organes. L'évaluation du contenu en vitellogénines a été réalisée à différents temps de la vitellogénèse au cours du premier cycle gonadotrophique (6, 12, 18 et 24 heures après exuviation).

6.1. Effets du Neem Azal sur les vitellogénines dans les corps gras

Le [tableau 29](#) compare les valeurs dans le contenu en vitellogénines en fonction du temps pour une même série (témoins et traitées) après l'émergence des adultes femelles.

Au cours de la maturité sexuelle, chez les femelles adultes témoins les vitellogénines dans le corps gras ([Tableau 29](#)) augmentent significativement à 12 (p = 0,0458) puis à 24 heures (p = 0,0437). Des valeurs similaires sont notées entre 12 et 18 heures (p = 0,209).

Chez les séries traitées au Neem Azal ([Tableau 29](#)), le même profil est remarqué pour les deux doses testées ; en effet, une augmentation dans les valeurs est observée seulement 12 heures après l'exuviation. Les valeurs restent comparables ensuite jusqu'à 24 heures, ce qui laisse supposer un arrêt dans la synthèse des vitellogénines.

La comparaison, entre les séries témoins et traitées ([Fig. 13](#)), montre une diminution dans le contenu en vitellogénines à 6, 12, 18 et 24 heures après l'exuviation adulte. Cet effet, est noté entre les séries témoins et traitées à 06 h (p = 0,0186 ; p = 0,0002), 12 h (p = 0,0132 ; p = 0,0004), 18 h (p = 0,009 ; p = 0,0005) et 24 heures (p = 0,0017 ; p = 0,0004) pour les deux testées (DI₂₅ et DI₅₀).

Par ailleurs, une relation dose réponse est noté à 6 (p = 0,0012), 12 (p = 0,036) et 18 heures (p = 0,0356). A 24 heures, les valeurs restent comparables entre les deux doses.

L'analyse de variance à deux critères de classification ([Tableau 30](#)) confirme ces résultats et indique un effet temps et traitement hautement significatifs (p < 0,0001) et une interaction traitement-temps non significative (p = 0,8668).

Tableau 29: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines dans le corps gras (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. (m ± sd; n=4-5) : Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre en majuscules ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Temps (heures)	Témoins	DI ₂₅	DI ₅₀
06	51,90 ± 4,32 A	44,86 ± 1,65 A	37,50 ± 2,38 A
12	57,81 ± 3,51 B	50,18 ± 3,33 B	43,33 ± 4,34 B
18	60,90 ± 3,61 B	52,77 ± 3,03 B	45,47 ± 4,88 B
24	65,72 ± 2,69 C	53,98 ± 4,48 B	47,22 ± 6,47 B

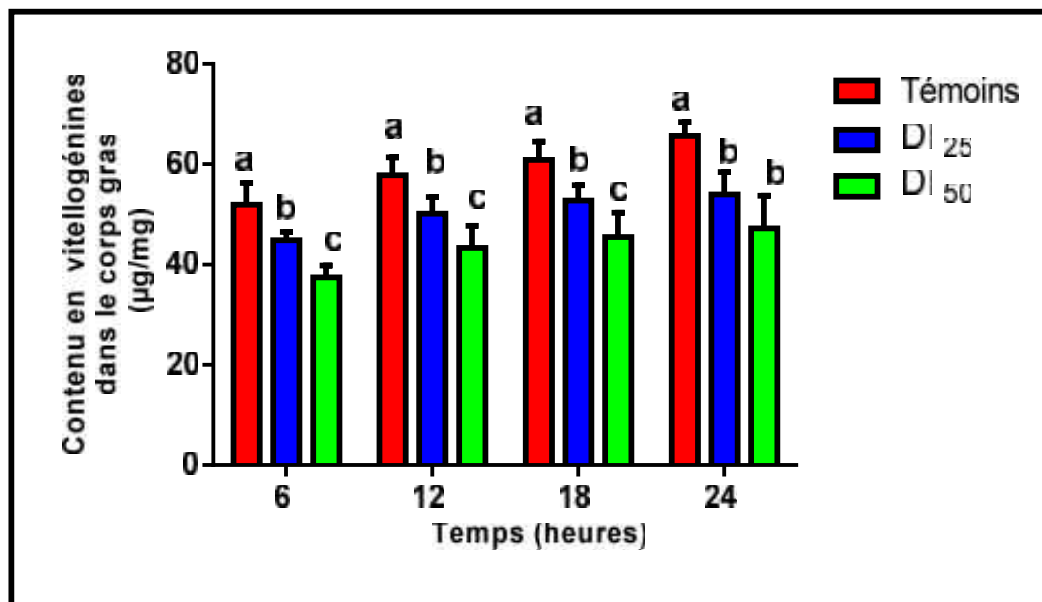


Figure 13. Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 4-5). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Tableau 30: Effet du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 4-5) : Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	2480	2	1240	78,23	0,0001***
Age	905,4	3	301,8	19,04	0,0001***
Interaction	39,21	6	6,536	0,4124	0,8668
Erreur résiduelle	697,3	44	15,85		

*** : hautement significatif (p < 0,0001) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

6.2. Effet du Neem Azal sur les vitellogénines dans les ovaires

Le [tableau 31](#) compare les valeurs dans le contenu en vitellogénines en fonction du temps pour une même série (témoins et traitées) après l'émergence des adultes femelles.

Chez les séries témoins, des femelles adultes de *D. melanogaster*, le contenu en vitellogénines ovariennes ([Tableau 31](#)) au cours de la maturité sexuelle augmente significativement à 12 (p < 0,0001) puis à 24 heures (p = 0,0057) ; à 12 et 18 heures des valeurs similaires sont notées (p = 0,517).

Chez les séries traitées au Neem Azal ([Tableau 31](#)), le même profil est remarqué pour les deux doses testées, avec une hausse dans le contenu en vitellogénines ovariennes aux même temps après émergence des adultes femelles (12 et 24 heures).

L'analyse statistique, effectuée entre les séries témoins et traitées ([Fig. 14](#)), montre un impact du Neem-Azal sur le contenu en vitellogénines ovariennes ; aussi, le Neem-Azal entraîne une diminution dans le contenu en vitellogénines dans les ovaires et ce, aux deux doses testées. Les résultats obtenus montrent une baisse à 6 (p = 0,0107 ; p = 0,0010) 12 (p = 0,0006 ; p < 0,0001) 18 (p = 0,0032 ; p = 0,0002) et 24 heures (p = 0,0121 ; p = 0,0001) pour la DI₂₅ et la DI₅₀ respectivement. Les différences significatives observées entre les séries traitées (DI₂₅ et DI₅₀) révèlent une relation dose réponse à 18 (p = 0,0464) mais aussi à 24 heures (p = 0,0247).

L'analyse de variance à deux critères de classification ([Tableau 32](#)) confirme ces résultats et indique un effet temps et traitement hautement significatifs (p < 0,0001) et une interaction traitement-temps non significative (p = 0,2972).

Tableau 31: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines ovariennes (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 4-5). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Temps (heures)	Témoins	DI ₂₅	DI ₅₀
06	67,05 ± 5,40 A	53,57 ± 6,36 A	43,53 ± 8,88 A
12	90 ± 3,83 B	66,43 ± 7,85 B	59,84 ± 6,18 B
18	91,7 ± 4,10 B	77,33 ± 5,73 B	65,73 ± 8,06 B
24	99,7 ± 2,46 C	90,66 ± 5,41 C	79,73 ± 5,93 C

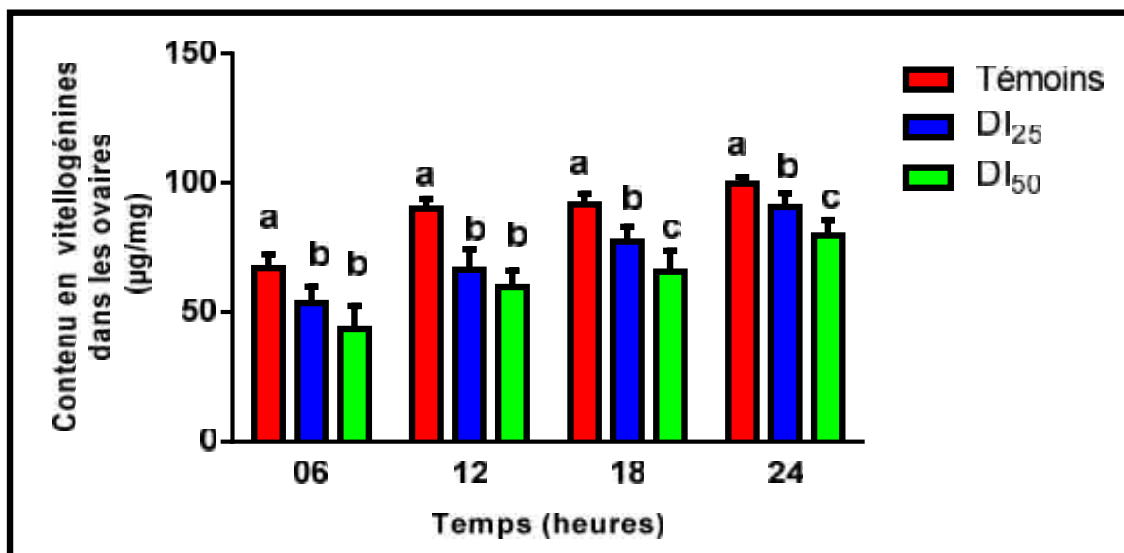


Figure 14. Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI₂₅: 0,59 et DI₅₀: 1,10 µg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines ovariennes (µg/mg) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. (m ± sd; n = 4-5). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Tableau 32: Effets du Neem Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DI_{25} : 0,59 et DI_{50} : 1,10 μg) le jour de l'exuviation nymphale sur le contenu en vitellogénines ovariennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$) évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. ($m \pm sd$; $n = 4-5$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	6282	2	3141	84,80	0,0001***
Age	9003	3	3001	81,02	0,0001***
Interaction	279,1	6	46,52	1,256	0,2972
Erreur résiduelle	1630	44	37,04		

*** : hautement significatif ($p < 0,0001$) ; ddl : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; p: niveau de significativité.

6.3. Comparaison dans le contenu en vitellogénines entre les corps gras et les ovaires

La comparaison dans le contenu en vitellogénines dans les deux compartiments (corps gras et ovaires) chez les séries témoins montre des valeurs plus importantes au niveau des ovaires à tous les temps testés (6, 12, 18, 24 heures) ; ceci peut s'expliquer par le fait que l'ovaire est un site de synthèse mais aussi de captation des vitellogénines provenant des corps gras.

Tableau 33 : Comparaison dans le contenu en vitellogénines ($\mu\text{g}/\text{mg}$) entre le corps gras et les ovaires chez les séries témoins; évalué au cours des premières 24 heures en fonction du temps après l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. ($m \pm sd$; $n = 4-5$). Comparaison des moyennes pour un même temps entre les différentes séries. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Temps (heures)	Contenu en vitellogénines dans le corps gras	Contenu en vitellogénines dans les ovaires
06	51,90 \pm 4,32 a	67,05 \pm 5,40 b
12	57,81 \pm 3,51 a	90,00 \pm 3,83 b
18	60,90 \pm 3,61 a	91,70 \pm 4,10 b
24	65,72 \pm 2,69 a	99,70 \pm 2,46 b

7. Effets du traitement combiné entre le Neem Azal et la 20E sur les vitellogénines dans le corps gras et les ovaires.

Le Neem Azal a été appliquée à la DI_{50} (1,10 μg), le jour de l'exuviation nymphale puis la 20E a été administrée aux deux doses (0,25 et 0,50 μg) et à deux périodes différentes (24 ou 48 heures) après le pesticide naturel. L'effet du traitement combiné a, ensuite, été évalué sur le contenu en vitellogénines dans le corps et les ovaires mesurés 24 heures après l'émergence adultes des femelles.

7.1. Effets du traitement combiné sur les vitellogénines dans le corps gras et les ovaires

L'application de 20 E (0,25 et 0,5 μg), 24 ou 48 heures après le Neem Azal restaure les valeurs physiologiques des vitellogénines dans les corps gras et les ovaires (Tableau 34). L'analyse statistique montre des valeurs comparables dans le contenu en vitellogénines dans le corps gras ($p > 0,05$) entre les séries témoins ($70,98 \pm 6,68 \mu\text{g}/\text{mg}$) et celles du traitement combiné ($78,66 \pm 8,17$; $71,57 \pm 4,87$; $67,20 \pm 8,41$; $61,81 \pm 8,53 \mu\text{g}/\text{mg}$). Cependant, le processus de restauration est plus marqué pour la faible dose (0,25 μg) de 20E appliquée 24 h après le Neem Azal comparativement à la forte dose de 20E (0,5 μg) appliquée 48 h après le Neem Azal.

Pour le contenu en vitellogénines dans les ovaires (Tableau 34) des valeurs comparables sont également observées entre les séries témoins ($94,69 \pm 3,24 \mu\text{g}/\text{mg}$) et celles du traitement combiné ($97,61 \pm 4,60$; $104,50 \pm 9,47$; $99,29 \pm 5,55 \mu\text{g}/\text{mg}$) excepté pour la plus faible doses de 20E appliqué 24 h après le Neem Azal ($p < 0,00001$).

Tableau 34: Effets de la 20 Hydroxyecdysone (0,25 et 0,5 µg) sur le contenu des vitellogenines dans le corps gras et les ovaires (µg/mg) mesurées 24 heures après l'exuviation adulte en fonction du temps (24 et 48 heures) après l'application topique du Neem Azal (1,10 µg) sur des pupes nouvellement exuviées de *D. melanogaster*. (m ± sd, n= 4-6 répétions). Pour toutes les séries les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

Traitement	Contenu en vitellogénines dans les corps gras (µg/mg)	Contenu en vitellogénines dans les ovaires (µg/mg)
Témoins	70,98 ± 6,68 ab	94,69 ± 3,24 a
Neem Azal (1,10 µg) suivi par la 20E (0,25 µg) 24 h après	78,66 ± 8,17 a	46,30 ± 2,77 b
Neem Azal (1,10µg) suivi par la 20E (0,5 µg) 24 h après	71,57 ± 4,87 ab	97,61 ± 4,60 a
Neem Azal (1,10 µg) suivi par la 20E (0,25 µg) 48 h après	67,20 ± 8,41 ab	104,50 ± 9,47 a
Neem Azal (1,10 µg) suivi par la 20E (0,5 µg) 48 h après	61,81 ± 8,53 b	99,29 ± 5,55 a

DISCUSSION

DISCUSSION

Chez les insectes, le développement et la reproduction sont contrôlés par des facteurs externes (température, nutrition, photopériode) mais aussi internes comme les hormones et les neurohormones (Gilbert *et al.*, 2002; Lafont *et al.*, 2005; Gruntenko & Rauschenbach, 2009; Hiruma & Kaneko, 2013). Les deux principales hormones, agissant en coordination dans ces processus physiologiques, sont les ecdystéroïdes et l'HJ.

Chez la drosophile, les corps allates, à l'origine de la synthèse de l'HJ, sont régulés par des neurohormones activatrices, l'allatotropine ou inhibitrice, l'allatostatine (Bellés & Maestro, 2005 ; Toivonen & Partridge, 2009). L'HJ, libérée dans l'hémolymphe, est transportée vers les tissus cibles grâce à des protéines vectrices (JH-binding proteins) qui la protègent contre l'action des hydrolases (Cassier *et al.*, 1997). Les ecdystéroïdes sont sécrétés, par les glandes prothoraciques (McBrayer *et al.*, 2007; Cranna & Quinn, 2009), grâce à l'action conjointe de l'hormone prothoracicotrope (PTTH) et de l'insuline, en présence d'autres co-facteurs indispensables (rapamycine, protéines kinases et l'oxyde nitrique) (McBrayer *et al.*, 2007; Cranna & Quinn, 2009; Yamanaka *et al.*, 2013). L'ecdysone (E), pro-hormone, est synthétisée *via* des enzymes codés par une famille de gènes (Halloween) incluant plusieurs cytochromes P450 (Petryk *et al.*, 2003 ; Ono *et al.*, 2006; Yoshiyama *et al.*, 2006). L'ecdysone, libérée dans l'hémolymphe, est convertie en hormone active ou 20-hydroxyecdysone (20E), grâce à l'ecdysone 20-monoxygénase, dans différents organes périphériques (corps gras et tubes de Malpighi) (Toivonen & Partridge, 2009; Yamanaka *et al.*, 2013). La 20E, contrôle la reproduction (Toivonen & Partridge, 2009), l'embryogénèse et le développement post-embryonnaire (Cranna & Quinn, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2013) ; La 20E initie les différentes mues mais la nature de la mue (larvaire ou nymphale) est déterminée par la présence ou l'absence de l'HJ dont le rôle est le maintien des caractères larvaires et l'inhibition de la métamorphose (Cassier *et al.*, 1997; Dubrovsky, 2005; Cheng *et al.*, 2014). Au cours de la métamorphose, la 20E se lie à un récepteur hétérodimère (EcR- ultraspiracle ou USP) qui active directement un petit groupe de gènes précoces: BR-C, E74 et E75 (Fig. 15) ; les protéines produites par ces gènes précoces activent un plus grand groupe de gènes tardifs qui contrôlent les différents aspects de la métamorphose (Dubrovsky, 2005 ; Kozlova & Thummel, 2003 ; Yamanaka *et al.*, 2013). Dès l'apparition du stade adulte, la 20E et l'HJ agissent ensuite de manière conjointe pour le contrôle de la reproduction (Gruntenko & Rauschenbach, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2013).

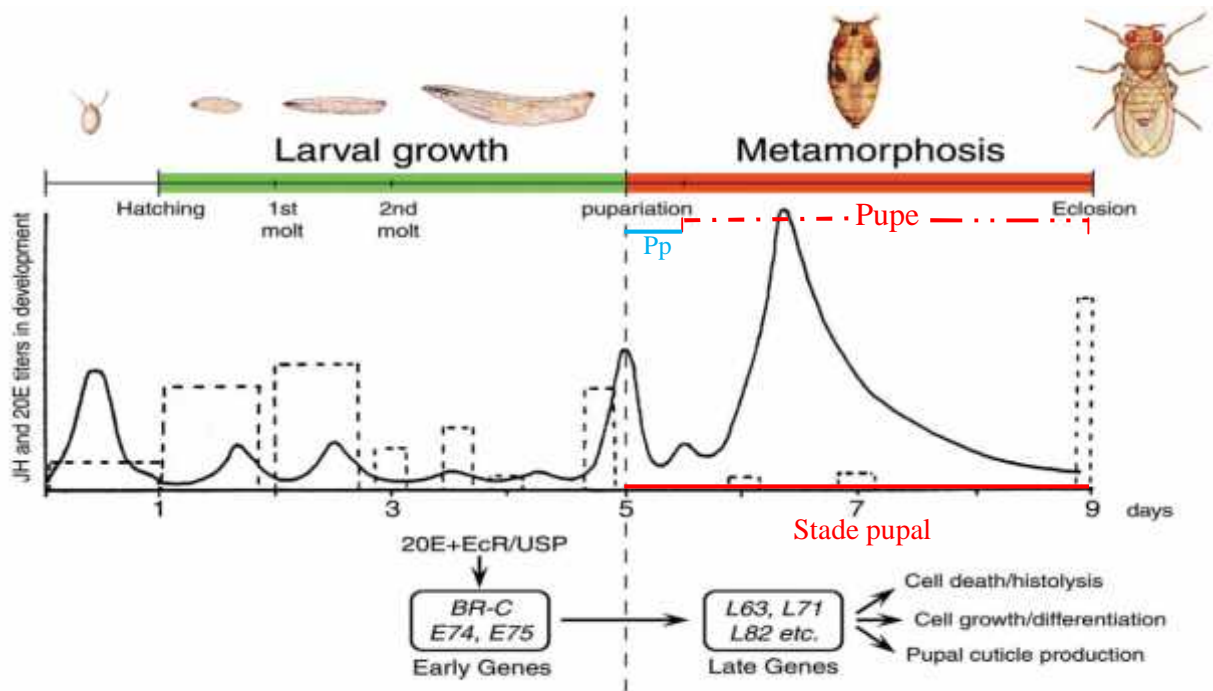


Figure 15 : Taux d'hormone juvénile (JH) et de 20-hydroxyecdysone (20E) au cours du développement de *D. melanogaster* (Dubrovsky, 2005). La 20 E initie toutes les transitions de développement, tels que de la larve à la larve, de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte tandis que l'HJ détermine le type de transition et la nature de mue ; Pp : prépuces.

20E —

JH

Toute interférence dans l'homéostasie de l'HJ et de la 20 E, avec des sources exogènes de ces mêmes hormones mais aussi avec leurs agonistes ou antagonistes, peut conduire à une perturbation dans le développement et la métamorphose (Dhadialla *et al.*, 2005; 2010 ; Smagge *et al.*, 2012) ; ainsi, l'azadirachtine, antagoniste de la 20E et de l'HJ, peut avoir un impact négatif dans ces processus physiologiques.

1. Effets de l'Huile de Neem et du Neem Azal sur l'inhibition de la mue adulte

Deux formulations commerciales de l'azadirachtine (Huile de Neem et le Neem-Azal), testées, par application topique, chez *D. melanogaster* sur des pupes nouvellement exuviées, induisent une inhibition de la mue adulte. L'utilisation de l'Huile de Neem et du Neem-Azal entraîne l'apparition de différents types morphologiques (Senthil Nathan *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2014) comme des adultes malformés (ailes), des mues partielles mais aussi des mues bloquées. Les doses d'inhibition de la mue adulte, les DI_{25} et DI_{50} sont respectivement de l'ordre de 0,67 et 1,17 μg pour l'Huile de Neem et de 0,59 et 1,10 μg pour le Neem Azal ; ces valeurs correspondent aux concentrations d'inhibition (CI_{25} et CI_{50}) de la mue adulte qui sont de 677 et 1170 ppm pour l'Huile de Neem et de 595 et 1106 ppm pour le Neem Azal. La comparaison des DI_{25} et DI_{50} , entre les deux produits testés, révèle une toxicité similaire chez *D. melanogaster* qui pourrait s'expliquer par le stade où se réalise le traitement; en effet, les pupes ne s'alimentent pas et la présence de substances antiappétantes (nimbine et salanine) dans l'Huile de Neem n'induit donc pas plus de toxicité. La toxicité de l'azadirachtine, largement reportée dans la bibliographie, varie en fonction de l'ordre de l'insecte, du stade de développement, du mode d'application (Ingestion, Topique) mais aussi, de la formulation commerciale utilisée (Tomé *et al.*, 2013; Abedi *et al.*, 2014 a; Koodalingam *et al.*, 2014). Chez les larves de *D. melanogaster*, l'application des extraits de Neem, par ingestion, montre une CI_{50} de 24000 ppm (Anjum *et al.*, 2010) ; ainsi, et malgré le mode d'application différent, le stade larvaire semble être moins sensible à l'azadirachtine par rapport au stade nymphal testé. Néanmoins, des travaux en cours dans notre équipe, indiquent que les larves et les adultes de *D. melanogaster* semblent être, au contraire, plus sensibles au Neem Azal (application topique) comparativement au stade nymphal (résultats non publiés, communication personnelle).

La toxicité de l'azadirachtine (NeemAzal) a été rapportée chez d'autres espèces de Diptères, comme le moustique *A. aegypti*, où chez les pupes une CL_{50} de 4,77 ppm révèle une forte sensibilité (Koodalingam *et al.*, 2014). D'autres travaux indiquent que les concentrations

d'inhibition de la mue adulte (CI_{50}), sont de l'ordre de 0,398, 0,249, 0,048 et 0,006 ppm respectivement chez *Anopheles albimanus*, *A. aegypti*, *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles stephensi* après traitement des larves de moustique avec plusieurs formulations commerciales de l'azadirachtine (Alouani *et al.*, 2009 ; Gunasekaran *et al.*, 2009). La littérature cite également l'efficacité de cette molécule chez les Lépidoptères comme *Tuta absoluta* avec une CL_{50} de 10,09 ppm (Tomé *et al.*, 2013) , chez les Hémiptères comme *Nilaparvata lugens* avec une CL_{50} de 0,47 ppm (Senthil Nathan *et al.*, 2008) ou encore chez les Hyménoptères comme *Habrobracon hebetor* avec une CL_{50} de 43,5 ppm (Abedi *et al.*, 2014 a). Par ailleurs, l'azadirachtine inhibe le taux de l'exuviation nymphale chez *P. interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012) et réduit de manière significative l'émergence des adultes chez *Helicoverpa armigera* (Ahmad *et al.*, 2015). Il est important de noter que le taux de pénétration à travers la cuticule, l'absorption des insectes, le transport dans les tissus de l'organisme, le métabolisme (Besard *et al.*, 2011) mais aussi la régulation intracellulaire de la membrane plasmique des récepteurs ou encore les canaux ioniques ciblés par les insecticides peuvent jouer un rôle crucial pour expliquer les différences de sensibilité des insectes aux pesticides (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010).

Chez *D. melanogaster*, le stade pupal (où se réalise le traitement) se caractérise par le plus important pic de 20E qui est strictement corrélé au développement des structures de l'adulte (Quinn *et al.*, 2012). A cette étape du développement, la 20E contrôle les différents aspects de la métamorphose tels que l'histolyse des tissus larvaires, la différenciation des tissus de l'adulte et la production de la cuticule (Fig. 15) (Dubrovsky, 2005). Ainsi, l'inhibition de la mue chez les adultes de *D. melanogaster*, leurs malformations et la perturbation de la métamorphose semblent être liés à l'action antagoniste de l'azadirachtine sur la 20E ; en effet, les effets négatifs induits par l'azadirachtine, pourraient s'expliquer par plusieurs processus. Premièrement, l'azadirachtine est connue pour avoir une action inhibitrice sur le système endocrinien et neuroendocrinien (Morgan, 2009) ; selon la littérature, l'inhibition de la mue pourrait être due à un blocage de la synthèse et la libération des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques *via* l'action spécifique de l'azadirachtine sur la libération de l'hormone prothoracicotropique (PTTH) (Mordue *et al.*, 2005). Deuxièmement, l'azadirachtine peut affecter directement la production de l'enzyme responsable de la conversion de l'ecdysone (E) en 20E au niveau du corps gras et de l'intestin moyen (Mordue *et al.*, 2005). Troisièmement, l'action antimitotique de l'azadirachtine peut perturber la formation de nouveaux organes adultes comme les yeux et les ailes, au cours de

la métamorphose de *D. melanogaster* (Anuradha *et al.*, 2007). Enfin, l'azadirachtine peut aussi interférer avec le système nerveux central de la Drosophile *via* l'inhibition de la transmission cholinergique excitatrice en bloquant les canaux de calcium (Qiao *et al.*, 2014).

L'application de l'Huile de Neem et du Neem Azal, aux doses d'inhibition de la mue adulte (DI₂₅ et DI₅₀) perturbe la croissance pondérale au cours du stade nymphal. La diminution de poids chez les nymphes de *D. melanogaster* (qui ne nourrissent pas) pourrait s'expliquer par l'utilisation des réserves énergétiques acquises au cours des stades larvaires (Boggs, 2009) pour détoxifier le produit toxique. Par ailleurs, l'inhibition des structures de l'adulte peut aussi expliquer la diminution dans la croissance pondérale comparativement aux témoins. Des résultats similaires ont été rapportés par Lai *et al.*, (2014) chez les larves de *D. melanogaster* traitées à l'azadirachtine, chez les larves et les pupes de *H. armigera* traitées avec le BioNeem (Abedi *et al.*, 2014 b) ou encore chez les pupes de *H. armigera* après traitement des larves avec plusieurs formulations commerciales d'azadirachtine (Neem Azal, Huile de Neem et Neemmix) (Ahmad *et al.*, 2015).

2. Effets du Neem Azal sur la GSTs et la catalase

Le mécanisme de détoxification des xénobiotiques impliquent plusieurs types d'enzymes qui dégradent les insecticides en métabolites moins toxiques (Soderlund, 1997). Le processus de détoxification 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 glutathion-S-transférases (GSTs) qui catalyse la conjugaison des molécules fonctionnalisées à des substrats endogènes afin de faciliter leur excréation (Li, 2009; Misra *et al.*, 2011). Les glutathion S-transférases 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 détoxification des substances endogènes mais aussi 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. 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) (Goyal & Basak, 2010 ;

Mamidala *et al.*, 2011 ; Hu *et al.*, 2015). Les systèmes cellulaires de défenses antioxydants dans les organismes biologiques sont altérés lorsqu'ils sont exposés aux polluants environnementaux et aux pesticides ; cependant, les niveaux d'antioxydants dans les organismes vivants peuvent augmenter de manière à restaurer le déséquilibre causé par les dommages oxydatifs (Yildirim *et al.*, 2011). Les teneurs en enzymes antioxydants peuvent donc être utilisées comme biomarqueurs du stress oxydatif (Livingstone, 2001). L'activité de la catalase n'est pas spécifique à un groupe de contaminants, mais au stress oxydatif et peut être induite par une large gamme de xenobiotiques (Badiou-Bénéteau *et al.*, 2012 ; Chakrabarti *et al.*, 2015).

Chez les séries témoins de *D. melanogaster*, l'activité spécifique des GSTs baisse dès 72 heures et cette diminution peut être liée à l'implication de cette enzyme dans la biosynthèse des hormones mais aussi dans le transport intracellulaire (Enayati *et al.*, 2005; Board & Menon, 2013). Le Neem Azal, testé chez les pupes de *D. melanogaster* aux deux doses d'inhibition de la mue adulte (DI₂₅ ; DI₅₀) entraîne une augmentation hautement significative de l'activité spécifique de GSTs dès 48 heures après traitement. Cette augmentation très significative comparativement aux témoins pourrait s'expliquer par une induction du processus de détoxification, réaction de l'organisme face à l'entrée du xénobiotique. L'augmentation de l'activité spécifique des GSTs a aussi été notée chez d'autres insectes traités, avec différentes formulations commerciales d'azadirachtine, comme chez les larves de *Xanthogaleruca luteola* (Coléoptère) traités avec l'Achook (Valizadeh *et al.*, 2013), chez les adultes de *Blattella germanica* traités avec l'azadirachtine (Tine, 2013) ou encore chez les larves de *H. armigera* (Lépidoptère) traités avec l'Huile de Neem (War *et al.*, 2014). En outre, chez les pupes de *D. melanogaster*, le spinosad, neurotoxique, présente le même effet (Chaabane *et al.*, 2012).

L'induction du système des GSTs chez *D. melanogaster* est corrélée avec une augmentation de l'activité spécifique de la CAT après traitement avec le Neem Azal. Chez les séries témoins l'augmentation de l'activité spécifique de CAT, observée à 48 et 72 heures, pourrait être liée au processus de la métamorphose comme la division et la différenciation cellulaire (Puig & Mattila, 2011). Les valeurs de la catalase, enregistrées chez les pupes de *D. melanogaster* traitées au Neem Azal, montrent une augmentation comparativement aux séries témoins; la hausse des activités spécifiques de la CAT, démontrant un stress oxydatif, est observée à 24, 48 et 72 heures après traitement. Cependant, l'augmentation de l'activité des GSTs est observée seulement dès 48 heures après traitement; par conséquent, l'absence

d'effet du Neem Azal sur l'activité des GSTs à 24 heures mais la présence d'un stress oxydatif au même moment pourrait être expliquée par l'action antagoniste de l'azadirachtine sur la 20E endogène et sur son pouvoir antioxydant. Cette hypothèse semble appuyée par les résultats de traitement combinée où l'apport de 20E exogène après l'application du Neem Azal restaure les valeurs normales de la CAT; de la même manière les GSTs retrouvent aussi des valeurs physiologiques de base. Ainsi la 20 E exogène réprime le système des GSTs et induit une protection antioxydante systémique contre le stress oxydatif causé par l'azadirachtine. La 20E exogène agit comme un déclencheur d'activation du système antioxydant (Krishnan *et al.*, 2007) ; le pouvoir antioxydant de la 20 E a été démontrée *in vivo* chez *Pyrrhocoris apterus* après traitement avec le paraquat (pyridine) (Krishnan *et al.*, 2007) ou encore *in vitro* dans les cellules de neuroblastome de rat après l'exposition à H₂O₂ (Hu *et al.*, 2012). Le mécanisme du pouvoir antioxydant de 20 E chez les insectes n'est pas encore clairement déterminé (Krishnan *et al.*, 2007).

3. Effets du Neem Azal sur la reproduction

Chez les insectes, l'ovaire est formé d'ovarioles dont le nombre varie selon les espèces (Markow & O'Grady, 2007; Sarikaya *et al.*, 2012) et dans chaque ovariole, deux régions sont observées : le germarium et le vitellarium (Cassier *et al.*, 1997). Le germarium est le siège de la multiplication des ovogonies qui donneront les ovocytes ; le vitellarium permet aux ovocytes, entourés par une assise de cellules folliculaires, d'accumuler des réserves (vitellus) puis d'acquérir, ensuite, les enveloppes protectrices de l'œuf (enveloppe vitelline et chorion) secrétées par le follicule (Swevers *et al.*, 2005). Chez *D. melanogaster*, l'ovariole est de type méroïstique polytrophique (Belles & Piulachs, 2015) et la maturation des ovocytes dépend majoritairement de l' HJ (Postlethwait & Shirk, 1981; Bownes, 1986; Lasko, 1994 ; Raikhel *et al.*, 2005; Swevers *et al.*, 2005). Le développement ovarien comprend 14 stades (Kozlova & Thummel, 2000 ; Swevers *et al.*, 2005) et la vitellogenèse est divisée en 3 processus distincts qui sont la prévitellogenèse, la vitellogenèse et la post-vitellogenèse. **La prévitellogenèse** débutant du stade 1 au stade 7 correspond au développement des cellules folliculaires. **La vitellogenèse** qui démarre dès le stade 8 coïncide avec l'exuviation adulte et permet le dépôt des vitellogenines dans l'ovocyte et l'accumulation des réserves énergétiques et plastiques (Swevers *et al.*, 2005) et enfin **la post-vitellogenèse** qui s'étale du stade 9 à 10 et qui correspond à une augmentation importante dans la taille de l'ovocyte en raison de l'incorporation des protéines. Pendant la vitellogenèse, la croissance de l'ovocyte se fait par

endocytose des protéines, synthétisées à partir de deux sources, le corps gras (vitellogénines) et les ovaires où la synthèse est réalisée par les cellules épithéliales folliculaires (Swevers *et al.*, 2005). Chez *D. melanogaster*, la vitellogenèse est sous le contrôle principal de la 20E mais aussi de l'HJ, (Wang *et al.*, 2004, Bellés & Maestro, 2005 ; Swevers *et al.*, 2005) ; en outre, l'interaction entre ces deux hormones est essentielle dans la reproduction chez les mâles et chez les femelles de la drosophile (Gade *et al.*, 1997 ; Gruntenko & Rauschenbach 2009).

3.1. Effets du Neem Azal sur les vitellogénines

Chez les femelles témoins de *D. melanogaster* le contenu en vitellogénines dans le corps gras et les ovaires augmente significativement à 12 et 24 heures avec un contenu plus important au niveau des ovaires ; ceci est relié à leur synthèse dans les deux compartiments (corps gras et ovaires) mais aussi à la captation par les ovaires des vitellogénines synthétisées par le corps gras (Swevers *et al.*, 2005). Le Neem Azal, administré aux doses d'inhibition de la mue adulte (DI₂₅ et DI₅₀) chez les pupes de *D. melanogaster* affecte la vitellogenèse chez les adultes femelles; en effet, l'évaluation des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires, montre une inhibition dans leur contenu, au cours des premières 24 heures, correspondant à la vitellogenèse proprement dite. Cette réduction dans le contenu en vitellogénines dans le corps gras et les ovaires présente une relation dose-réponse et est observée à toutes les heures testées. Ceci est en conformité avec la littérature où il est noté que l'azadirachtine peut affecter le processus de reproduction chez divers insectes *via* les vitellogénines (Mordue *et al.*, 2005); cet antagoniste des ecdystéroïdes et de l'HJ inhibe la synthèse des vitellogénines et leur incorporation par l'ovocyte chez *Labidura riparia* (Sayah *et al.*, 1996), *Chrysoperla carnea* (Medina *et al.*, 2004), ou encore chez *Rhipicephalus sanguineus* (Denardi *et al.*, 2011). L'azadirachtine entraîne, similairement, une diminution dans le contenu en protéines ovariennes chez *B. orientalis* suggérant une inhibition dans la synthèse des vitellogénines et/ou de leur captation par l'ovaire (Tine *et al.*, 2011). Le mode d'action de ce pesticide naturel est similaire aux autres types de régulateurs de croissance connus. En effet, l'application d'analogues de l'hormone juvénile, le methoprène ou encore le pyriproxifène entraînent une réduction dans le contenu en vitellogénines et vitellines chez divers insectes (Pinto *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2010) ; les mêmes effets sont observés avec les agonistes des ecdystéroïdes (Sridhara & Lee, 2013; Mordue *et al.*, 2005). Par ailleurs, un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le teflubenzuron, diminue la synthèse des vitellogénines et leur

incorporation par les ovocytes chez *Locusta migratoria* (Acheuk *et al.*, 2012). D'autres pesticides non polluants, comme le spinosad ou l'indoxacarbe, à mode d'action neurotoxique ont le même effet chez *B. germanica* ou *Blattella orientalis* (Tine, 2013 ; Maiza *et al.*, 2013).

Chez la drosophile, la 20E et l'HJ jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la vitellogenèse chez les adultes de *D. melanogaster* (Gilbert *et al.*, 1998 ; Wismar *et al.*, 2000 ; Ganter *et al.*, 2007); les deux hormones stimulent la production des vitellogénines dans le corps gras mais aussi leur absorption par les ovocytes permettant la croissance rapide des follicules vitellogéniques (Richard *et al.*, 1998). Parallèlement à la synthèse des vitellogénines, l'HJ contrôle également la transcription des gènes des vitellogénines et leur synthèse (Hoffman et Serge, 1996; Li *et al.*, 2003 , 2004 ; Tufail *et al.*, 2014). Les deux hormones montrent une dualité d'action dans le contrôle de la vitellogenèse en l'activant ou en l'inhibant (Swevers *et al.*, 2005 , Rybcznski, 2005; Huang *et al.*, 2008) mais jouent surtout un rôle essentiel dans le maintien de l'expression des gènes des vitellogénines (Tufail *et al.*, 2014). Chez *D. melanogaster*, l'activité ovarienne nécessite aussi le double contrôle hormonal HJ et 20E (Wang *et al.*, 2004 ; Swevers *et al.*, 2005) ; les ovaires des femelles sont le siège de production des ecdystéroïdes et cette synthèse est aussi stimulée par l'HJ (Schwartz *et al.*, 1989 ; Riddiford, 1993; Gilbert *et al.*, 2002). Les effets inhibiteurs du Neem Azal sur la vitellogenèse peuvent être donc expliqués par le fait que l'azadirachtine agit comme antagoniste de ces deux hormones (Stark *et al.*, 1990; Stark *et al.*, 1992 ; Mordue *et al.*, 2005). La littérature note que l'azadirachtine affecte la synthèse des ecdystéroïdes ovariens et conduit à une altération de l'ovogenèse et de la croissance ovocytaire chez *L. migratoria* et *Rhodnius prolixus* (Mordue *et al.*, 2005). Par ailleurs, une étude récente montre que l'azadirachtine exerce un effet neurotoxique chez *D. melanogaster* (Qiao *et al.*, 2014), conduisant probablement à des effets secondaires sur les processus de régulation neuroendocrine *via* les neuropeptides (allatostatines, allatotropines, PTTH...) qui contrôlent la régulation hormonale de la reproduction. L'action antagoniste de l'azadirachtine sur les vitellogénines est confirmée par l'application exogène de 20 E qui conduit à une restauration des valeurs physiologiques des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires. Pour les ovaires, la réponse biologique notée varie en fonction de la dose et le moment de l'application de la 20E ; ce résultat pourrait être expliqué par une interaction avec les hormones endogènes de par la régulation endocrine ou par des dysfonctionnements du fait de l'interaction entre l'HJ et la 20E. En effet, un juste équilibre entre ces deux hormones est nécessaire pour le

déroulement normal de la vitellogenèse (Swevers *et al.*, 2005; Gruntenko & Rauschenbach, 2009).

3.2. Effets du Neem Azal sur la descendance

Les résultats montrent également une diminution dans la fécondité et la fertilité en réduisant le nombre des descendants (œufs, larves, pupes et d'adultes) de la génération F1 provenant de « parents » traités à l'Huile de Neem et le Neem Azal; cette baisse dans la descendance présente une relation dose-réponse et un effet sexe (femelle plus sensible que le mâle). Cet impact de l'azadirachtine sur la fécondité et/ou la fertilité est aussi retrouvé chez *L. migratoria* (Mordue *et al.*, 2005), *M. domestica* (Ghoneim *et al.*, 2007), *S. littoralis* (Pineda *et al.*, 2009), *Lobesia botrana* (Irigaray *et al.*, 2010) et *H. armigera* (Abedi *et al.*, 2014 b; Ahmad *et al.*, 2015). D'autres pesticides naturels à action neurotoxique comme le spinosad et l'indoxacarbe peuvent également réduire la fécondité et la fertilité chez les insectes (Galvan *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2013; Maïza *et al.*, 2013).

La fécondité et la fertilité, directement liés à l'ovogénèse et la vitellogenèse, sont des processus soumis au même contrôle endocrine et peuvent donc être affectés de la même manière. L'azadirachtine pourrait affecter chez les mâles et les femelles le système reproducteur, la vitellogenèse ou encore la spermatogénèse ; en effet, il est cité des altérations morphologiques des spermatocytes et des ovocytes, une importante dégénérescence des cellules folliculaires et des spermatocytes mais aussi une fragmentation dans les vésicules germinales et l'inversion de leur localisation (Mordue *et al.*, 2005 ; Lucantoni *et al.*, 2006; Ghazawi *et al.*, 2007; Denardi *et al.*, 2010; 2011 ; Remedio *et al.*, 2015). Ces effets de l'azadirachtine pourraient donc perturber la vitellogenèse et la spermatogénèse et induire une diminution dans la fertilité et la fécondité des insectes. La réduction de ces processus pourrait être aussi liée à l'interférence de l'azadirachtine avec la synthèse des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires et/ou leur absorption par les ovocytes (Swevers *et al.*, 2005) ; Ces effets sur la vitellogenèse pourraient être liés à la perturbation au niveau de l'hormone juvénile et de la production des ecdystéroïdes ovariens (Mordue *et al.*, 2005). Chez les mâles, les ecdystéroïdes peuvent être impliqués dans la maturation du système reproducteur mâle, la régulation de la spermatogénèse et la différenciation des spermatocytes (Dumser, 1980) ; par ailleurs, l'HJ stimule la synthèse des protéines dans les glandes accessoires (Wilson *et al.*, 2003). La réduction de la fertilité chez les mâles, pourrait être liée à un blocage de la division cellulaire dans le développement des spermatocytes menant à des testicules immatures et

significativement plus petits (Mordue *et al.*, 2005). Par ailleurs, la diminution dans la fécondité pourrait être due aussi à l'action de l'azadirachtine sur le comportement d'accouplement où il entraîne un prolongement dans la période de latence avant l'accouplement chez *Neoseiulus baraki* (Lima *et al.*, 2015). Des résultats similaires ont été observés chez *Ephestia kuehniella* où les auteurs attribuent la réduction de la fécondité et de la fertilité à une action des agonistes des ecdystéroïdes sur la vitellogenèse mais également sur la production et la qualité des spermatozoïdes et sur le comportement sexuel (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012 ; Bouzeraa & Soltani-mazouni, 2012).

L'impact de l'azadirachtine, chez *D. melanogaster*, pourrait alors entraîner une perturbation de l'ovogenèse, de la vitellogenèse mais aussi des diverses étapes de la reproduction. Par conséquent, la réduction dans le contenu des vitellogénines dans le corps gras et les ovaires mais aussi la baisse du nombre d'individus dans la descendance chez *D. melanogaster* peuvent être expliquées par l'interférence de l'azadirachtine avec les principales hormones de la reproduction (hormone juvénile et ecdystéroïdes) ou encore avec d'autres neuropeptides (Mordue *et al.*, 2005) impliqués dans le contrôle endocrinien de ce processus.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a évalué l'effet de deux formulations commerciales de l'azadirachtine (Huile de Neem et Neem Azal), antagoniste de l'hormone juvénile et des ecdystéroïdes, dont le mécanisme d'action reste encore à l'étude.

Les essais insecticides réalisés révèlent une toxicité similaire (DI comparables) entre l'Huile de Neem et le Neem Azal et ce, malgré la différence dans leur composition ; les doses sublétales et létales (DI₂₅ ; DI₅₀), déterminées à partir de la régression non linéaire sont de 0,68 et 1,17 µg pour l'Huile de Neem et de 0,59 et 1,10 µg pour le Neem Azal. Les deux formulations commerciales affectent de manière comparable la croissance pondérale et le nombre d'individus (œufs, larves, pupes, adultes) issus de couples adultes qui ont survécu au traitement des nymphes. L'absence de différence entre les deux molécules peut être expliquée par le fait que les anti-appétants (salanine et nimbine), entrant dans la composition de l'Huile de Neem, n'ont pas d'effets sur le stade testé (les pupes ne s'alimentent pas).

Le Neem Azal, utilisé aux doses sublétales (DI₂₅ : 0,59 µg) et létales (DI₅₀ : 1,10 µg), montre, avec une relation dose réponse, un impact sur les deux marqueurs de toxicité évalués (GSTs et Catalase). Le stress oxydatif enregistré est parfaitement corrélé avec le mécanisme de détoxification qui a lieu dès 48 heures ; cependant, à 24 heures, le stress oxydatif observé, semble alors lié à l'action antagoniste de l'azadirachtine sur la signalisation de la 20 E ; hormone connue pour son pouvoir antioxydant. Le Neem Azal, évalué sur les vitellogénines, marqueurs de reprotoxicité, induit une diminution avec une relation dose-réponse à toutes les heures testées (6, 12, 18, 24 heures). La réduction dans le contenu en vitellogénines, observée dans les deux compartiments (corps gras, ovaires), peut s'expliquer par l'effet antagoniste de l'azadirachtine sur la 20 hydroxyecdysone et l'hormone juvénile, principales hormones impliquées dans la synthèse des vitellogénines. L'azadirachtine montre donc un impact négatif sur le contrôle endocrine de la reproduction mais les interactions entre les diverses hormones et neurohormones restent à définir.

Le traitement combiné Neem Azal et 20 E restaure les normes physiologiques pour les divers paramètres testés confirmant ainsi l'action antagoniste du pesticide sur le stress oxydatif et sur les vitellogénines ; l'action antioxydante de la 20E explique également le retour à la normale des valeurs de l'activité spécifique des GSTs. L'interaction entre la 20E endogène et exogène peut sans doute expliquer les sensibles variations entre les doses testées et les périodes d'application de la 20E ; par ailleurs, l'intervention de l'hormone juvénile dans

la synthèse des vitellogénines et l'interaction connue de la 20E et de l'hormone juvénile ne doivent pas être écartées.

Ainsi, à l'avenir il serait intéressant d'évaluer les impacts d'un traitement combiné azadirachtine-hormone juvénile suivi d'un traitement azadirachtine-hormone juvénile-20E afin de mieux comprendre leur interaction.

RESUMES

RESUME

L'Huile de Neem et le Neem Azal, ont été utilisées, *in vivo* par application topique, sur des nymphes nouvellement exuviées de *D. melanogaster*. Dans un premier temps, les deux formulations commerciales ont été évaluées sur l'inhibition de l'émergence adulte, la croissance pondérale et le suivi de la descendance. Le Neem Azal, a été testé, ensuite, en traitement simple sur des biomarqueurs de toxicité, glutathion S-transférases (GSTs) et catalase (CAT) mais aussi de reprotoxicité, les vitellogénines. Un traitement combiné Neem Azal-20E est ensuite effectué afin de préciser l'action antagoniste de l'azadirachtine sur le stress oxydatif et la reproduction.

L'Huile de Neem et le Neem Azal entraînent une inhibition de l'émergence adulte avec une relation dose-réponse. Les doses d'inhibition (DI) DI_{25} et DI_{50} déterminées, grâce à une régression non linéaire, sont de l'ordre de 0,68 et 1,17 μg pour l'Huile de Neem et de 0,59 et 1,10 μg pour le Neem Azal. Les intervalles de confiance déterminés révèlent que les deux formulations ont une toxicité comparable. L'Huile de Neem et le Neem Azal perturbent le développement de *D. melanogaster* en entraînant une diminution dans le poids des pupes dès le second jour du stade nymphal. Les deux molécules présentent, également, un impact négatif sur la descendance au cours de la première génération en réduisant le nombre d'individus dans tous les stades de développement (œufs, larves, pupes et adultes). Cette réduction de la fécondité et de la fertilité est observée pour les différents couples constitués, après traitement des pupes, excepté pour le couple où seul le mâle provient d'un traitement à la faible dose.

Le Neem Azal, testé à la DI_{25} et à la DI_{50} , induit un mécanisme de détoxification qui est dose-dépendant; en effet, une augmentation de l'activité spécifique des GSTs est enregistrée à 48 et 72 heures après traitement. Une induction du stress oxydatif, notée par l'augmentation de la CAT est observée dès 24 heures avec une relation dose-réponse. Le Neem Azal (DI_{25} , DI_{50}), appliqué le jour de l'exuviation nymphale, perturbe, également, la vitellogenèse chez les femelles adultes de *D. melanogaster*; le contenu en vitellogénines, dans le corps gras et les ovaires révèle une diminution dose-dépendante, à 6, 12, 18 et 24 heures après émergence. La 20 hydroxecdysone ou 20E exogène (0,25 et 0,5 μg) appliquée 24 ou 48 heures après le Neem Azal, restaure les normes physiologiques des GSTs, de la CAT et des vitellogénines aussi bien dans les corps gras que dans les ovaires.

La 20E semble donc compenser les effets dépressifs induits par l'azadirachtine chez *D. melanogaster*. Ainsi, l'action antagoniste du pesticide sur les vitellogénines et le stress oxydatif, deux processus contrôlés par la 20E, semble être confirmée.

Mot Clés : *D. melanogaster*, Toxicité, Azadirachtine, 20-Hydroxyecdysone, Stress oxydatif, Reproduction.

ABSTRACT

Neem Oil and Neem Azal, two commercial formulations, have been used, *in vivo* by topical application, on newly ecdysed pupae of *D. melanogaster*. In the first bioassays Neem oil and Neem Azal, have been evaluated on the inhibition of adult emergence, weight growth and the follow up of the progeny. The Neem Azal, has been tested, then, on biomarkers of toxicity glutathion S-transferase (GSTs) and catalase (CAT), but also of reprotoxicity by evaluating its effects on vitellogenins. A combined treatment NeemAzal-20E has then been made in order to specify the antagonist action of azadirachtin on the oxidative stress and reproduction.

Neem Oil and Neem Azal cause an inhibition of adult emergence with a dose-response relationship. Inhibition doses (ID) ID₂₅ and ID₅₀, determined, by a nonlinear regression, were of 0.68 and 1.17 µg for Neem Oil and 0.59 and 1.10 for Neem Azal. The confidence intervals determined reveals that the two formulations have comparable toxicity. Neem Oil and Neem Azal disrupts the development of *D. melanogaster* by causing a decrease in the weight of pupae from the second day of the pupal stage. The two molecules have, also, a negative impact on the progeny during the first generation by reducing the number of individuals in all developmental stages (eggs, larvae, pupae and adults). This reduced of the fecundity and fertility is observed for various constituted couples, previously treated as pupae, excepted for the couple when only the males are treated at the lowest dose.

The Neem Azal, tested at ID₂₅ and ID₅₀, induced a mechanism of detoxification; which is dose-dependent; indeed, an increase of the specific activity of GSTs is recorded at 48 and 72 hours after treatment. An Induction of the oxidative stress, noted by the increase of the CAT is observed from 24 hours with a dose-response relationship. The Neem Azal (ID₂₅, ID₅₀), applied the day of pupal moulting, disturbs, also, the vitellogenesis, in adults females of *D. melanogaster*; the contents of vitellogenins, in fat body and ovaries reveals a decrease dose-dependent, at 6, 12, 18 and 24 hours after emergence. The 20 hydroxyecdysone or exogenous 20E (0.25 and 0.5 µg) applied 24 or 48 hours after the Neem Azal, restores the physiological standards of GSTs, CAT and vitellogenins as well in fat body that in ovaries.

The 20 hydroxyecdysone seems to compensate the depressive effects induced by azadirachtin on *D. melanogaster*. Thus, the antagonist action of the pesticide on the

vitellogenins and oxidative stress, two processes controlled by the 20 hydroxyecdysone seems to be confirmed.

Key Words: *D. melanogaster*, Toxicity, Azadirachtin, 20-Hydroxyecdysone, Oxidative Stress, Reproduction.

زيت النيم النيم اثنتين من المستحضرات التجارية تم استخدامها بواسطة التطبيق الموضوعي يوم إنسلاخ العذراء *D. melanogaster*. هذه تم تقييم زيت النيم النيم تثبيط إنسلاخ الحشرة، بسيطة على السمية الجلوتاثيون-S-ترانسفيراز (GST_S) (CAT) السمية التناسلية vitellogénines. بغية توضيح إجراءات عدائية azadirachtine الإجهاد التأكسدي بين النيم 20 Hydroxyecdysone (20E) الجلوتاثيون-S- ترانسفيراز (GST_S) (CAT) vitellogénines. زيت النيم النيم تثبيط بين تثبيط (DI₂₅ et DI₅₀) تحديدها الغير هي 0,68 1,17 µg زيت النيم 0,59 1,10 µg لنيم . النتائج الإحصائية بينت التركيبات لهما السمية متشابهة. زيت النيم و النيم إلى تعطيل دورة التطور *D. melanogaster* العذراء في اليوم الثاني من طور العذراء. لجزيئين لهما أيضا تأثير جميع (ويضات يرفقات، هذا حيث ملاحظتها جميع الذين النيم شبه ممية (DI₂₅) الممية (DI₅₀) تنشيط آلية بين GST_S 48 72 تسجيل زيادة الإجهاد التأكسدي ملاحظته طريق CAT 24 بين نيم أزال (DI₅₀ DI₂₅)، طبق يوم تعطيل ين المح أيضا *D. melanogaster* vitellogénins في الدهون الجسم و المبيضين كشف عن انخفاض مع وجود علاقة بين الجرعة و الاستجابة في 6 12 18 24 ساعة بعد ظهور تطبيق 20E (0,25 et 0,50 µg) 24 48 ساعة بعد النيم أزال، المعايير الفسيولوجية لل GST_S CAT vitellogénines في كل من الدهون الجسم و المبيضين. يبدو 20E تعويض *D. melanogaster* azadirachtine هكذا، عدائية للمبيد vitellogénines الإجهاد التأكسدي العمليتين تسيطر عليها 20E يبدو أنها .

مفتاحية: *D. melanogaster* Azadirachtine 20 Hydroxyecdysone السمية الإجهاد التأكسدي.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, N., Shad, S.A. & Razaq, M. 2012. Fitness cost, cross resistance and realized heritability of resistance to imidacloprid in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic Biochem Physiol.* **103**(3): 181–188.
- Abbas, N., Khan, H. & Shad, S.A. 2015. Cross-resistance, stability, and fitness cost of resistance 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.
- Abedi, Z., Saber, M., Gharekhani, G., Mehrvar, A. & Kamita, S.G. 2014 a. Lethal and sublethal effects of azadirachtin and cypermethrin on *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *J Econ Entomol.* **107**(2): 638- 645.
- Abedi, Z, Saber, M., Vojoudi, S, Mahdavi, V. & Parsaeyan, E. 2014 b. Acute, sublethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J Insect Sci.* **14**:30.
- Abhilash, P.C. & Singh, N. 2009. Pesticide use and application: An Indian scenario. *J Hazard Mater.* **165**(1-3): 1-12.
- Acheuk, F., Cusson, M., Doumandji-Mitiche, B. 2012. Effects of a methanolic extract of the plant *Haplophyllum tuberculatum* and of teflubenzuron on female reproduction in the migratory locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Oedipodinae). *J Insect Physiol.* **58**(3): 335-341.
- Aggarwal, N. & Brar, D.S. 2006. Effects of different neem preparations in comparison to synthetic insecticides on the whitefly parasitoid *Encarsia sophia* (Hymenoptera: Aphelinidae) and the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) on cotton under laboratory conditions. *J Pest Sci.* **79**(4): 201-207.
- Ahmad, M. & Arif, M.I. 2010. Resistance of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to endosulfan, organophosphorus and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Crop Prot.* **29**(12): 1428-1433.
- Ahmad, S., Ansari, M.S. & Muslim, M. 2015. Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Corp prot.* **68**: 72-78.
- Akca, I., Tuncer, C., Guler, A. & Saruhan, I. 2009. Residual Toxicity of 8 Different Insecticides on Honey Bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). *J Anim Vet Adv.* **8**(3): 436-440.
- Alouani, A., Rehim, N. & Soltani, N. 2009. Larvicidal activity of a neem tree extract (azadirachtin) against mosquito larvae in the republic of Algeria. *Jordan J Biol Sci.* **2**(1): 15-22.

- Amira, K., Boudjelida, H. & Farine, J.P. 2013.** Effect of an Insect Growth Regulator (Halofenozide) on the Cuticular Hydrocarbons of *Culex pipiens* Larvae . *Afr Entomol.* **21**(2): 343-348.
- Andreu, J., Albert, S. & Magi, R. 2000.** Antifeedant activity of *Melia azadirachta* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Phytoparasitica.* **28**(4): 311-319.
- Anjum, S.I., Yousf, M.J., Ayaz, S. & Siddiqui, B.S. 2010.** Toxicological evaluation of chlorpyrifos and neem extract (biosal b) against 3rd instars larvae of *Drosophila melanogaster*. *J Anim Pl Sci.* **20**(1): 9-12.
- Anuradha, A., Annadurai, R.S. & Shashidhara, L.S. 2007.** Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. *Insect Biochem Mol Biol.* **37**(6): 627-634.
- Aribi, N., Quennedy, A., Soltani, N. & Delbecque, J.P. 1999.** L'initiation de la métamorphose chez *Zophobas atratus* (Coléoptera : Tenebrionidae) : effets des ligatures et des régulateurs de croissance. *Ann Soc Entomol Fr.* **35**: 59-64.
- Aribi, N., Smagghe, G., Lakbar S., Soltani-Mazouni, N. & Soltani, N. 2006.** Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Pest Biochem Physiol.* **84** (1): 55-62.
- Badiou-Bénéteau, A., Carvalho, S.M., Brunet, J-L., Carvalho, G.A., Buleté, A., Giroud, B. & Belzunces, L.P. 2012.** Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicol Environ Saf.* **82**: 22-31.
- Bai, H., Gelman, D.B. & Palli, S.R. 2010.** Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Pest Manag Sci.* **66**(9): 936-943.
- Banerjee, A., Manna, S. & Saha, S.K. 2014.** Effect of aqueous extract of *azadirachta indica* A. Juss (neem) leaf on oocyte maturation, oviposition, reproductive potentials and embryonic development of a freshwater fish ectoparasite *Argulus bengalensis* Ramakrishna, 1951 (Crustacea:Branchiura). *Parasitol Res.* **113**(12): 4641-4650.
- Banken, J.A.O. & Stark, J.D. 1997.** Stage and age influence on the susceptibility of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) after direct exposure to Neemex, a neem insecticide. *J Econo Entomy.* **90**(5): 1102-1105.
- Barbosa, W.F., De Meyer, L., Guedes, R.N. & Smagghe, G. 2015.** Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology.* **24**(1): 130-142.
- Bellés, X. & Maestro, J.L. 2005.** Endocrine peptides and insect reproduction. *Invertebr Repr 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.
- Besard, I., Mommaerts, V., Abdu-Alla, G. & Smaghe, 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.
- Board, P.G. & Menon, D. 2013.** Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta*. **1830**(5): 3267-3288.
- Boggs, C.L. 2009.** Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct Ecol*. **23**(1): 27-37.
- Bouharmont, J., Masson, P.L. & Van Hove, C. 2007.** Biologie. Révision scientifique de Charles- Marie Evrard. Edition *De Boeck université*. **386**: 1250.
- Bouzeraa, H. & Soltani-mazouni, N. 2012.** Effets du méthoxyfénoside et du tébufénoside sur le développement et quelques paramètres de la reproduction d'*Ephestia kuehniella* après traitement des mâles et des femelles. *Bull Soc zool Fr*. **137**(1-4): 153-163.
- Bownes, M. 1986.** Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein). *Annu Rev Entomol*. **31**: 507-531.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities on protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**(1-2): 248-254.
- Bruce, T.J.A. 2010.** Tackling the threat to food security caused by crop pests in the new millennium. *Food Sec*. **2**: 133-141.
- Cantrell, C.L., Dayan, E.F. & Duke, S.O. 2012.** Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod*. **75**(6): 1231-1242.
- Capinera, J.L. & Froeba, J.G. 2007.** Behavioral responses of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) to Azadiractin (Neem)-treated host plants. *J Econ Entomol*. **100**(1): 117-122.
- Casida, J.E. & Durkin, K.A. 2013.** Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol*. **58**: 99-117.
- 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, 354.
- Chaabane, M., Benchaabane, S., Kilani-Morakchi, S. & Aribi, N. 2012.** Physiotoxicité du spinosad, évaluée sur deux générations chez une espèce invasive *Tuta absoluta* (Lepidoptera) et chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Bull Soc Zool Fr*. **137**(1-4): 57-68.

- Chakrabarti, P., Rana, S., Sarkar, S., Smith, B. & Basu, P. 2015.** Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. *Apidologie*. **46**(1): 107–129.
- Cheng, D., Peng, J., Meng, M., Wei, L., Kang, L., Qian, W. & Xia, Q. 2014.** Microarray analysis of the juvenile hormone response in larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*. *Int J Genomics*. ID 426025.
- 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.
- 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 sciences*. **22**(3): 241-243.
- Comoretto, L. & Chiron, S. 2005.** Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Sci Total Environ*. **349**(1-3): 201-210.
- Cordeiro, E.M.G., Corrêa, A.S., Venzon, M. & Guedes, R.N.C. 2010.** Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. *Chemosphere*. **81**(10): 1352–1357.
- Cranna, N. & Quinn, L. 2009.** Impact of steroid hormone signals on *Drosophila* cell cycle during development. *Cell Division*. **4**: 3.
- da Costa, J.T, Forim, M.R, Costa, E.S, De Souza, J.R, Mondego, J.M. & Junior, A.L.B. 2014.** Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. *J Stored Prod Res*. **56**(1): 49-53.
- Daas-Maamcha, O., Houd-Chaker, K., Maryam, S., Dass, T. & Scaps, P. 2013.** Effects of an ecdysteroid analog (RH-0345) on the ovarian and testicular components of *Eupolybothrus nudicornis* (Myriapoda : Chilopoda). *Jordan J Biol Sci*. **6**(2): 91-98.
- de Almeida, G.D., Zanuncio, J.C., Senthil-Nathan, S., Pratissoli, D., Polanczyk, R.A., Azevedo, D.O. & Serrão, J.E. 2014.** Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Invertebrate Surviv J*. **11**: 79-86.
- Denardi, S.E., Bechara, G.H., Oliveira, P.R. & Camargo-Mathias M.I. 2010.** Azadirachta indica A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Exp Parasitol*. **126**(4): 462–470.
- Denardi, S.E., Bechara, G.H., Oliveira, P.R., Nunes, E.T. & Camargo-Mathias, M.I. 2011.** Inhibitory Action of Neem Aqueous Extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the Vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Ticks. *Microsc Res Techn*. **74**(10): 889-899.

- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A. & Smaghe, 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. & Smaghe, G. 2010.** Insect growth and development-disrupting insecticides. In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds). *Insect Control*. Elsevier, New York. USA. 121-166.
- Dimetry, N.Z. 2014.** Different plant families as bioresource for pesticides. In : Singh, D. (Ed). *Advances in Plant Biopesticides*. Springer, New York, Dordrecht, London. 1-20.
- Dubrovsy, E.B. 2005.** Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol Metab.* **16**(1): 6-11.
- Dumser, J.B. 1980.** The regulation of spermatogenesis in insects. *Annu Rev Entomol.* **25**: 341–369.
- El Ouar, I., Aribi, N. & Soltani-Mazouni, N. 2010.** Dosage des ecdystéroïdes chez *Ephestia kuehniella*. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série, Zoologie, Rabat.* **47**(1): 137–140.
- Enayati, A.A., Ranson, H. & Hemingway, J. 2005.** Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol.* **14**(1): 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.
- FAO.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT; 2012. [www.faostat.fao.org].
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L.P. & Elsner, M. 2013.** Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science.* **341**(6147): 752-758.
- Fisher, R.A. & Yates, F. 1957.** Statical tables for biological agricultural and medical research. 5^{eme} edition, Olivier et Boyd .London. 64-66
- Gäde, G., Hoffmann, K. H. & Spring, J.H. 1997.** Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future direction. *Physiol rev.* **77**(4): 963-1032.
- Galvan, T.L., Koch, R.L. & Hutchison, W.D. 2005.** Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol Control.* **34**(1): 108-114.
- Gangé, F., Pardos, M. & Blaise, C. 1999.** Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. *Bull Environ Contam Toxicol.* **62**(6): 723- 730.

- Ganter, G.K., Walton, K.L., Merriman, J.O., Salmon, M.V., Brooks, K.M., Maddula, S. & Kravitz, E.A. 2007.** Increased male-male courtship in ecdysone receptor deficient adult flies. *Behav Genet.* **37**(3): 507–512.
- Ghanim, M. & Ishaaya, I. 2010.** Insecticides with novel modes of action: mechanism and resistance management. In: Ishaaya, I. & Degheele, D. (eds). *Insecticides with novel modes of action: mechanism and application*. Springer, Berlin. 385–407
- Ghazawi, N.A., El-Shranoubi, E.D., El-Shazly, M.M. & Abdel Rahman, K.M. 2007.** Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). *J Orthopt Res.* **16**(1): 57-65.
- Ghoneim, K.S., Amer, M.S., Bream, A.S., AL-Dali, A.G. & Hamadah, K.H.S.H. 2007.** Effectiveness of Margosan-O and Jojoba on Some Reproductive Aspects of the House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Int J Agri Biol.* **9**(2): 338-341
- Ghormade, V., Deshpande, M.V. & Paknikar, K.M. 2011.** Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnol Adv.* **29**(6):792–803.
- Gilbert, L.I., Rybczynski, R. & Warren, J.T. 2002.** Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol.* **47**: 883–916.
- Gilbert, L.I., Serafin, R.B., Watkins, N.L. & Richard, D.S. 1998.** Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *J Insect Physiol.* **44**(7-8): 637-644.
- Gontijo, L.M., Celestino, D., Queiroz, O.S., Guedes, R.N.C. & Picanço, M.C. 2015.** Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of pirate bug predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Fla Entomol.* **98**(1): 59-64.
- Goudey-Perrière, F. & Perrière, C. 1974.** Guide de travaux pratiques de Zoologie et de Biologie Animale. Parais, *Centre de documentation universitaire*. Vol **2**.
- Govindarajan, M. & Rajeswary, M. 2015.** Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* **114**(5): 1949-1961.
- Goyal, M.M. & Basak, A. 2010.** Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell.* **1**(10): 888-897.
- Griffiths, A.J.F., Miller J. H., Suzuki D. T., Sanlaville C., Lewontin R. C. & Gelbart W. M. 2002.** Introduction à l'analyse génétique. 3^{ème} édition *De Boeck Université*. 860 p.
- Gruntenko, N. & Rauschenbach, I. 2009.** 20-hydroxyecdysone, juvenile hormone and biogenic amines: Mechanisms of interaction in control of *Drosophila* reproduction

- under normal and stressful conditions. In: Smagghe, G. (Ed). *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 317–332.
- Gunasekaran, K., Vijayakumar, T. & Kalyanasundaram, M. 2009.** Larvicidal & emergence inhibitory activities of NeemAzal T/S 1.2 per cent EC against vectors of malaria, filariasis & dengue. *Indian J Med Res.* **130**(2): 138-145.
- 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.
- Hiruma, K. & Kaneko, Y. 2013.** Hormonal Regulation of Insect Metamorphosis with Special Reference to Juvenile Hormone Biosynthesis. *Curr Top Dev Biol.* **103**: 73-100.
- Hoffmann, K.H. & Sorge, D. 1996.** Vitellogenin levels in allectomized female crickets *Gryllus bimaculatus* de geer (Ensifera, Gryllidae). *Arch Insect Biochem Physiol.* **32**: 549-558.
- Hoffmann, K.H. & Lorenz, M.W. 1998.** Recent advances in Hormones in Insect pest control. *Phytoparasitica* **26**(4): 323-330.
- Hu, J., Luo, C.X., Chu, W.H., Shan, Y.A., Qian, Z-M., Zhu, G., Yu, Y.B. & Feng, H. 2012.** 20-Hydroxyecdysone Protects against Oxidative Stress-Induced Neuronal Injury by Scavenging Free Radicals and Modulating NF-kB and JNK Pathways. *PLoS ONE* **7**(12): e50764.
- Hu, J., Feng, F., Zhu, S., Sun, L., Li, G., Jiang, N., Shang, Z. & Niu, Y. 2015.** Catalase C-262T polymorphism and risk of prostate cancer: Evidence from meta-analysis. *Gene.* **558**(2): 265-270.
- Huang, J-F., Shui, K-J., Li, H-Y., Hu, M-Y. & Zhong, G-H. 2011.** Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* S1-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. *Pestic Biochem Phys.* **99**(1): 16-24.
- Huang, X, Warren, J.T. & Gilbert, L.I. 2008.** New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J Genet Genomics.* **35**(1): 1-10.
- Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Hirata, K., Nishiwaki, H., Morimoto, T., Akamatsu, M., Ashikawa, Y., Kuroba, S., Mega, R., Kuramitsu, S., Sattelle, D. & Mastuda, K. 2008.** Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invert Neurosci.* **8**(2): 71-81.
- Irigaray, F.J., Moreno-Grijalba, F., Marco, V. & Pérez-Moreno, I. 2010.** Acute and reproductive effects of Align®, an insecticide containing azadirachtin, on the grape berry moth, *Lobesia botrana*. *J Insect Sci.* **10**:33.

- 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. 2001.** Biochemical processes related to insecticide action: An overview. In: Ishaaya, I. (Ed). *Biochemical sites of insecticides action and resistance*. Springer. Berlin. 1–16.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol.* **51**: 45-66.
- Joly, D. 2006.** La drosophile: Un insecte au service de la science. <http://www.savoirs.essonne.fr/thematiques/la-vie/biologie-genetique/la-drosophile-un-insecte-au-service-de-lascience/complement/resources/?cHash=ab7555b73af538a1163fdcce962ac156>.
- Jouandin, P. 2013.** Rôle de la voie de signalisation Insuline dans le couplage des informations nutritionnelles et développementales au cours de l'ovogenèse chez la drosophile. Thèse de Doctorat. Université de Nice Sophia-Antipolis. 226 p.
- Jowett, T. & Postlethwait, J.H. 1980.** The regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body by 20-hydroxy-ecdysone and a juvenile hormone analogue. *Dev Biol.* **80**(1): 225–234.
- Kaakeh, W., Scharf, M.E. & Bennett, G.W. 1997.** Comparative contact activity and residual life of juvenile hormone analogs used for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control. *J Econ Entomol.* **90**(5): 1247-1253.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Ruditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I. & Morin, S. 2008.** Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem Mol Biol.* **38**(6): 634-644.
- Kaufman, P.E., Nunez, S.C., Geden, C.J. & Scharf, M.E. 2010.** Selection for resistance to imidacloprid in the house fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol.* **103**(5): 1937–1942.
- Kavi, L.A.K., Kaufman, P.E. & Scott J.G. 2014.** Genetics and mechanisms of imidacloprid resistance in house flies. *Pestic 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**:148-154.
- Kilani-Morakchi, S., Badi, A., Aribi, N., Farine, J.P. & Soltani, N. 2014.** Toxicity of Tebufenozide, an Ecdysteroid Agonist, to *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *Afr Entomol.* **22**(2): 337-342.

- Kirst, H.A. 2010.** Spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J Antibiot. (Tokyo)*. **63**(3): 101-111.
- Kohler, H.R. & Triebkorn, R. 2013.** Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. *Science*. **341**(6147): 759–765.
- Koodalingam, A., Deepalakshmi, R., Ammu, M. & Rajalakshmi, A. 2014.** Effects of neemazal on marker enzymes and hemocyte phagocytic activity of larvae and pupae of the vector mosquito *aedes aegypti*. *J Asia-Pacific Entomol*. **17**(2): 175-181.
- Koriem, K.M.M. 2013.** Review on pharmacological and toxicological effects of oleum azadirachti oil . *Asian Pac J of Trop Biomed*. **3**(10): 834–840.
- Kozlova, T. & Thummel, C.S. 2000.** Steroid regulation of Post-embryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab*. **11**(7): 276-280.
- Kozlova, T. & Thummel, C.S. 2003.** Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*. **301**(5641): 1911-1914.
- Krishnan, N., Ve e a, J., Kodrik, D. & Sehnal, F. 2007.** 20-Hydroxyecdysone prevents oxidative stress damage in adult *Pyrrhocoris apterus*. *Arch Insect Biochem Physiol*. **65**(3): 114-124.
- Kristensen, M., Hansen, K.K. & Jensen, K.M. 2005.** Cross-resistance between Dieldrin and Fipronil in *German Cockroach* (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol*. **98**(4): 1305-1310.
- 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.
- Kumar, S., Raman, R.P., Pandey, P.K., Mohanty, S., Kumar, A. & Kumar, K. 2013.** Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish. Shellfish. Immunol*. **34** (2): 564-573.
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J.T. & Rees, H. 2005.** Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier, Oxford, UK. **3**: 125–195
- Lai, D., Jin, X., Wang, H., Yuan, M. & Xu, H. 2014.** Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *J Biotechnol*. **185**: 51-56.
- Lasko, P.F. 1994.** Molecular Genetics of *Drosophila* Oogenesis. R.G. Landes Company, Austin, TX.
- Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C. & Lapied, B. 2010.** How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated

- JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons?. *J Pharmacol Exp Ther.* **333**(1): 264-272.
- Li, X. 2009.** Glutathione and Glutathione-S-Transferase in detoxification mechanisms. In: Ballantyne, B., Marrs, T. & Syversen, T. (Eds). *General and Applied Toxicology, (Third Edition)*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 411-423.
- Li, Y., Unnithan, G.C., Veenstara, J.A., Feyerisen, R. & Noriega, F.G. 2003.** Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti in vitro*: Effect of fanesoic acid and Aedesallatotropin. *J Exp Biol.* **206**:1825-1832.
- Li, Y., Hernandez-Martinez, S. & Noriega, F.G. 2004.** Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in mosquitoes, effect of allatostatic head factors, PISCF and YXFCL-Amid-allatostatins. *Regul pept.* **118**(3): 175-182.
- Lim, T.K. 2014.** *Azadirachta indica*. In: Lim, T.k (Eds). *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*. Springer, Dordrecht, Netherlands. **8**: 409-455.
- Lima, D.B., Melo, J.W., Guedes, N.M., Gontijo, L.M., Guedes, R.N. & Gondim, M.G. Jr. 2015.** Bioinsecticide-Predator Interactions: Azadirachtin Behavioral and Reproductive Impairment of the Coconut Mite Predator *Neoseiulus baraki*. *PLoSOne.* **10**(2): e0118343.
- Livingstone, D-R. 2001.** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull.* **42**: 656-666.
- Long, E.R. 2000.** Degraded sediment quality in US estuaries: A review of magnitude and ecological implications. *Ecol Appl.* **10** (2): 338-349.
- Lucantoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P. & Habluetzel, A. 2006.** Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue Cell.* **38**(6): 361-371.
- Lynn, O.M., Kim, J-E. & Lee, K-Y. 2012.** Effects of azadirachtin on the development and gene expression of fifth instar larvae of Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *J Asia-Pacific. Entomol.* **15**(1): 101-105.
- Maiza, A., Aribi, N., Smagghe, G., Kilani-Morakchi, S., Bendjedid, M. & Soltani, N. 2013.** Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad and indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*. *Bull Insectology.* **66**(1): 11-20.
- Mamidala, P., Jones, S.C. & Mittapalli, O. 2011.** Metabolic resistance in bed bugs. *Insects.* **2**(1): 36-48.
- Markow, A. & O'Grady, P.M. 2007.** Drosophila biology in the genomic age. *Genetics.* **177**(3): 1269-1276.

- Matsuura, A. & Nakamura, M. 2014.** Development of neonicotinoid resistance in the cotton aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) in Japan. *Appl Entomol and Zool.* **49**(4) : 535-540.
- McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J.P., Beckstead, R.B., Warren, J.T., Thummel, C.S., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I. & O'Connor, M.B. 2007.** Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev Cell.* **13**(6): 857-871.
- Mckay, T., Bianco, T., Rhodes, L. & Barnett, S. 2013.** Prevalence of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) in mosquitoes from northeast Arkansas, the United States. *J Med Entomol.* **50**(4): 871-878.
- Medina, P., Smaghe, G., Budia, F., Tirry, L. & Viñuela, E. 2003.** Toxicity and absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after Topical Application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ Entomol.* **32**(1): 196-203.
- Medina, P., Budia, F., Del Estal, P. & Viñuela, E. 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *J Econ Entomol.* **97**(1): 43-50.
- Meigen, J.W. 1830.** Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. *Hamm.* **6**: 401.
- Menasria, T., Moussa, F., El-Hamza, S., Tine, S., Megri, R. & Chenchouni, H. 2014.** Bacterial load of German cockroach (*Blattella germanica*) found in hospital environment. *Pathog Glob Health.* **108**(3):141-147.
- Mertz, F.P. & Yao, R.C. 1990.** *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. 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.
- Mordue, A.J. & Blackwell, A. 1993.** Azadirachtin: an update. *J Insect Physiol.* **39**(11): 903-924.
- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D. & Nisbet, A.J. 2005.** Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, UK. **6**: 117–135.
- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D. & Nisbet, A.J. 2010.** Addendum: Azadirachtin, a natural product in insect control: An update. In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds). *Insect Control*. Elsevier, Oxford, UK. 204–206.
- Morgan, E.D. 2009.** Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg Med Chem.* **17**(12): 4096-4105.

- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher U., Salgado, V.L. & Kausman, M. 2003.** Thiamethoxamis a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pest Biochem Physiol.* **76**: 55-69.
- Oberlander, H. & Silhacek, D.L. 1998.** New perspectives on the mode of action of benzoylphenyl urea insecticides. In: Ishaaya, I. & Degheele, D. (Ed). *Insecticides with Novel modes of action: Mechanism and Application.* Springer. 92-105.
- Ono, H., Rewitz, K. F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J.T., Marqués, G., Shimell, M.J., Gilbert, L.I. & O'Connor, M.B. 2006.** Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev Bio.* **298**(2): 555–570.
- 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.
- Parvathi, D.V., Amritha, A. S. & Paul, S.F.D. 2009.** Wonder animal model for genetic studies - *Drosophila melanogaster* – its life cycle and breeding methods – a review. *Sri Ramachandra Journal of Medicine.* **2**(2): 33-38.
- Petryk, A., Warren, J.T., Marqués, G., Jarcho, M.P., Gilbert, L.I., Kahler, J., Parvy, J-P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C. & O'Connor, M.B. 2003.** Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad of Sc U S A.* **100**(24): 13773–13778.
- Pineda, S., Martínez, A.M., Figueroa, J.I., Schneider, M.I., Del Estal, P., Viñuela, E., Gómez, B., Smagghe, G. & Budia, F. 2009.** Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol.* **102**(4):1490-1496.
- Pinho, A.I., Wallau G.L., Nunes, M.E.M., Leite N.F., Tintino S.R., da Cruz L.C., da Cunha F.A.B., da Costa J.G.M., Coutinho H.D.M., Posser T. & Franco J.L. 2014.** Fumigant activity of the *Psidium guajava* var. pomifera (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* Article ID 696785. 8 p.
- Pinto, L.Z., Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. 2000.** Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect. Physiol.* **46**(2): 153-160.
- Postlethwait, J.H., Bownes, M. & Jowett, T. 1980.** Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* **79**(2): 379–387.
- Postlethwait, J.H. & Shirk, P.D. 1981.** Genetic and endocrine regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Amer Zool.* **21**: 687–700.
- Puig, O. & Mattila, J. 2011.** Understanding Forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxid Redox Signal.* **14**(4): 635-647.

- Qi B., Gordon, G. & Gimme W. 2001.** Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol Control*. **22**(2): 185–190.
- Qiao, j., Zou, X., Lai, D., Yan, Y., Wang, Q., Li, W., Deng, S., Xu, H. & Gu, H. 2014.** Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. *Pest Manag Sci*. **70**(7): 1041-1047.
- Quinn, L., Lin J., Cranna N., Lee J.E.A., Mitchell N. & Hannan R. 2012.** Steroid hormones in *Drosophila*: How ecdysone coordinates developmental signalling with cell growth and division. In: Abduljabbar, H. (Ed). *Steroid – Basic Science*. Intech, Rijeka. 141-168.
- Raikhel, A.S., Brown, M. R. & Belles, X. 2005.** Hormonal control of reproductive processes In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford. UK. **3**: 433–491.
- Rand, M.D., Montgomery, S.L., Prince, L. & Vorobjikina, D. 2014.** Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model. *Curr Protoc Toxicol*. **59**: 1.12.1–1.12.20.
- Rehan, A. & Freed, S. 2014.** Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Corp Prot*. **56**:10-15.
- Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholetto, L.A., Oliveira, P.R. & Camargo-Mathias, M.I. 2015.** Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res*. **114**(2): 431-344.
- 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.
- Richard, D.S., Watkins, N.L., Serafin, R.B., & Gilbert, L.I. 1998.** Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *J Insect Physiol*. **44**(7-8): 637–644.
- Riddiford, L.M. 1993.** The development of *Drosophila melanogaster*, vol. **2**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 899–939.
- 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.
- Rybczynski, R. 2005.** Prothoracicotropic hormone. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, UK. 61–123.

- Sahu, S.S., Gunasekaran, K., Raju, H.K., Vanamail, P., Pradhan, M.M. & Jambulingam, P. 2014.** Response of malaria vectors to conventional insecticides in the southern districts of Odisha State, India. *Indian J Med Res.* **139** (2): 294-300.
- Salgado, V.L. 1997.** The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth.* **52** (1): 35-44.
- Salgado, V.L. & Sparks, T.C. 2005.** The spinosyns: Chemistry, biochemistry, mode of action and resistance. In Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, Oxford, UK. **6**: 137-173.
- Sarikaya, D.P., Belay, A.A., Ahuja, A., Dorta, A., Green, D.A. 2nd & Extavour, C.G. 2012.** The roles of cell size and cell number in determining ovariole number in *Drosophila*. *Dev Biol.* **363**(1): 279-289.
- Sayah, F., Fayet, C., Idiomar, M. & Karlinsky, A. 1996.** Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermaptera). *Tissue Cell.* **28**(6):741-749.
- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol.* **35**: 271-297.
- Schmutterer, H. & Singh, R.P. 1995.** List of insect pests susceptible to neem products. In: Schmutterer H. (Ed). *The Neem Tree Azadirachta indica* A. Juss, And other Meliaceae Plants. VHC, Verlag, Weinheim Germany. 696.
- Schwartz, M.B., Kelly, T.J., Woods, C.W. & Imberski, R.B. 1989.** Ecdysteroid fluctuations in adult *Drosophila melanogaster* caused by elimination of pupal reserves and synthesis by early vitellogenic ovarian follicles. *Insect Biochem.* **19**(3): 243-249.
- Scudeler, E.L. & Santos, D.C.D. 2013.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). *Micron.* **44**: 125-132.
- Scudeler, E.L., Padovani, C.R. & Santos, D.C. 2014.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis. *Acta Histochem.* **116**(5): 771-780.
- Seifert, J. 2014.** Neonicotinoids. In: Wexler, P. (Ed). *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Elsevier, Oxford. **3**: 477-481.
- Senthil Nthan, S., Chung, P.G. & Murugan, K. 2004.** Effect of botanicals and bacterial toxin on the gut enzyme of *Cnaphlocrocis medinalis*. *Phytoparasitica.* **32**(5):433-443.
- Senthil Nthan, S., Kalaivani, K., Murugan, K. & Chung, P.G. 2005.** The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphlocrocis medinalis* (Guinée) the rice leaf folder. *Pestic Biochem Physiol.* **81**(2): 113-122.

- Senthil Nthan, S., Kalaivani, K. & Murugan, K. 2006.** Effect of biopesticides on the lactate dehydrogenase (LHD) of the rice leaffolder, *Cnaphlocrocis medinalis* (Guinée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicol Environ Saf.* **65**(1): 102-107.
- Senthil-Nathan, S., Choi, M.Y., Seo, H.Y., Paik, C.H., Kalaivani, K. & Kim, J.D. 2008.** Effect of azadirachtin on acetylcholine esterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Sta^l). *Ecotoxicol Environ Saf.* **70**(2): 244–250.
- Shaurub, el-SH., Abd El-Meguid. A., & Abd El-Aziz, N.M. 2014.** Quantitative and ultrastructural changes in the haemocytes of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) treated individually or in combination with *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV) and azadirachtin. *Micron.* **65**: 62-68.
- 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.
- 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.
- Shu, B., Wang, W., Hu, Q., Huang, J., Hu, M. & Zhong, G. 2015.** A comprehensive study on apoptosis induction by azadirachtin in *Spodoptera frugiperda* cultured cell line sf9. *Arch Insect Biochem Physiol.* doi: 10.1002/arch.21233.
- Smaghe, G., Gomez, L.E. & Dhadialla, T.S. 2012.** Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. In: Dhadialla, T.S. (Ed). *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, Burlington, MA, USA. **43**: 163–249.
- Soderlund, D. M. 1997.** Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Sjut, V. (Ed). *Molecular mechanisms of resistance to agrochemicals: Chemistry of plant protection*. Springer, Berlin Heidelberg, New York. **13**: 21-56.
- Soltani-Mazouni, N., Hami, M. & Gramdi, H. 2012.** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia Kuehniella* Zeller. *Invertebr Repr Dev.* **56**(2): 157-163.
- Sporleder, M. & Lacey, L.A. 2013.** Biopesticides. In: Giordanengo, P. Vincent, C. Alyokhin, A. (Eds). *Insect pests of potato: Global perspectives on biology and management*. Elsevier, Oxford, UK. 463-497.
- Sridhara, S. & Lee, V.H. 2013.** Tebufenozide disrupts ovarian development and function in silkmoths. *Insect Biochem Mol Biol.* **43**(12): 1087-1099.
- Stark, J.D., Vargas, R.I. & Thalman, R.K. 1990.** Azadirachtin: effects on metamorphosis, longevity and reproduction of three *tephritid* fruit fly species. *J Econ Entomol.* **83**(6): 2168-2174.

- Stark, J.D., Wong, T.T.Y., Vargas, R.I. & Thalman, R.K. 1992.** Survival, Longevity and reproduction of tephritid fruit fly parasitoids (Hym. Braconidae) reared from fruit flies exposed to azadirachtine. *J Econ Entomol.* **85**: 1125-1129.
- Sturtevant, A. H. 1913.** The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology.*, **14** (1): 43-59.
- 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.
- Swevers, L., Raikhel, A.S., Sappington, T.W., Shirk, P. & Iatrou, K. 2005.** Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, U.K. **6**: 87–156. Ok
- Tavernier, R. & Lizeaux, C. 2002.** Sciences vie de la Terre Terminale S- Spec. *Maisonneuve & Larose*. paris, France. 255 p.
- Tine, S. 2013.** Etude de la biodiversité des blattes dans la région semi-arides et arides et évaluation de l'impact d'insecticides chez *Blattella germanica* et *Blatta orientalis* (Dictyoptera, Blattellidae). Université Badji Mokhtar Annaba. 202 p.
- Tine, S., Aribi, N. & Soltani, N. 2011.** Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *Afr J Biotechnol.* **10**(85): 19816-19824.
- 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. & Guedes, R.N.C. 2013.** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Prot.* **46**: 63-69.
- Tufail, M., Nagaba, Y., Elgendy, A-M. & Takeda, M. 2014.** Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomol Sci.* **17**(3): 269–282.
- US-EPA.** Pesticide industry sales and usage reports. Washington, D.C. : U.S. Environmental Protection Agency; 2011. Available from: <http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/>.
- Valizadeh, B., Sendi, J.J., Zibae, A. & Oftadeh, M. 2013.** Effect of Neem based insecticide Achook[®] on mortality, biological and biochemical parameters of elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* Mull (Col.: Chrysomelidae). *J Crop Prot.* **2**(3): 319-330.
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Zhang, W. & Wang, K. 2009.** 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., Liu, H.Y., Xin, Z. & Xue, M. 2013.** Lethal and sublethal effects of spinosad on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol.* **106**(4): 1825-1831.
- 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 of invertebrates*, Part B: Progress in vitellogenesis. Science Publishers, Enfield, USA/Plymouth, UK. **12**: 69-94.
- Wang, Z., Cheng, X., Meng, Q., Wang, P., Shu, B., Hu, Q., Hu, M. & Zhong, G. 2015.** Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **4**(64): 126-135.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Hussain, B., Ahmad, T., War, M.Y. & Ignacimuthu, S. 2014.** Efficacy of a combined treatment of neem oil formulation and endosulfan against *Helicoverpa armigera* (Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int J Insect Sci.* **6**: 1-7.
- White, N.J., Pukrittayakamee S., Hien T.T., Faiz M.A., Mokuolu O.A., & Dondorp, A.M. 2014.** paludisme. *Lancet.* **383**(9918): 723-735.
- Wilson, T.G., DeMoor, S. & Lei, J., 2003.** Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the Methoprene-tolerant (27) mutant phenotype. *Insect Biochem Mol Biol.* **33**(12): 1167-1175.
- Wismar, J., Habtemichael, N., Warren, J.T., Dai, J.D. Gilbert, L.I. & Gateff, E. 2000.** The mutation without children (rgl) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* **226**(1): 1-17.
- Yamanaka, N., Rewitz, K.F. & O'Connor, M.B. 2013.** Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu Rev Entomol.* **58**: 497-516.
- Yang, M.L., Zhang, J.Z., Zhu, K.Y., Xuan, T., Liu, X.J., Guo, Y.P. & Ma, E.B. 2009.** Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Arch Insect Biochem Physiol.* **71**(1): 3-15.
- Yildirim, N-C., Benzer, F. & Danabas, D. 2011.** Evaluation of environmental pollution at Munzur river of Tunceli applying oxidative stress biomarkers in *Cappota trutta* (Heckel, 1843). *J Ann Plant Sci* **21**(1): 66-71.
- Yin, X-H., Wu, Q-J., Li, X-F., Zhang, Y-J. & Xu, B-Y. 2008.** Sublethal effects of spinosad on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Corp prot.* **27**(10):1385-1391.

Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H. & Niwa, R. 2006. Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development*. **133**(13): 2565–2574.

ANNEXE

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Production scientifique

Publication :

1. **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.
2. **Boulahbel, B.**, Aribi, N, Kilani-Morakchi, S., & Soltani, N. 2015. Activity of Neem Oil in *Drosophila melanogaster*: Toxicity and delayed effect on the progeny. Soumise au journal « Archives of Phytopathology and Plant Protection ».

Communications Internationales et Nationales :

Communications Internationales :

1. **Boulahbel, B.**, Benssabaa, F., Kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2012. Toxicité d'huile de neem et du neem azal chez un modèle de référence *Drosophila melanogaste* (Diptera). Les 3^{èmes} journées scientifiques de l'ATT, Tabarka, Tunisie 03-05 Février 2012.
2. Benssabaa, F., **Boulahbel, B.**, Kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2012. Toxicité d'un régulateur de croissance des insectes le pyriproxyfène chez un modèle de référence *Drosophila melanogaste* (Diptera). Les 3^{èmes} journées scientifiques de l'ATT, Tabarka, Tunisie 03-05 Février 2012.
3. **Boulahbel, B.**, Kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2013. Evaluation de l'azadirachtine sur la croissance pondérale et l'activité des glutathion S-transférases chez *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830). 24^{ème} Forum des Sciences Biologiques et de Biotechnologie, Sousse, Tunisie 25-28 mars 2013.
4. **Boulahbel, B.**, kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2013. Toxicité de deux insecticides naturels issus du neem (*Azadirachta indica*) chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (Diptera). 5^{ème} Symposium International des Plantes Aromatiques et Médicinales, SIPAM5, Marrakech, Maroc, 14-16 Nov. 2013.
5. **Boulahbel, B.**, Kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2014. Activité d'un pesticide naturel, l'azadirachtine chez *Drosophila melanogaster* (Diptera): toxicité et suivi de la descendance. II^{ème} Congrès de L'Association Tunisienne de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, Tabarka, Tunisie, 18-20 Mars 2014.
6. **Boulahbel, B.**, Kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2014. Evaluation de l'azadirachtine seul et combinée à la 20-hydroxyecdysone chez *Drosophila melanogaster* (Diptera): impact sur le stress oxydatif. 8^{ème} Conférence Internationale Francophone d'Entomologie, CIFE VIII, Hammamet, Tunisie, 23-27 juin 2014.

Communications Nationales :

1. **Boulahbel, B.**, Bensebaa, F., Oulhaci, M., Djihed, S., Kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2013. Activité d'un pesticide naturel, l'azadirachtine seul et combiné au diethylmaleate (dem) chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (diptera). Journée scientifique sur l'environnement, Guelma, 26 novembre 2013.
2. Bensebaa, F., **Boulahbel, B.**, Kilani-Morakchi, S & Aribi, N., 2013. Toxicité du pyriproxifene et effet d'un synergiste le diethymaleate chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (diptera). Journée scientifique sur l'environnement, Guelma, 26 novembre 2013.

Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone

B. Boulahbel, N. Aribi*, S. Kilani-Morakchi & N. Soltani*

Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000-Annaba, Algeria

Azadirachtin, an insect growth disruptor, is known to be an antagonist of the juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone (20E). However, its mechanism of action remains to be understood. Furthermore, the effects of the interaction of azadirachtin and 20E have not been investigated. The current study examined the effect of azadirachtin topically applied alone or in combination with 20E on *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae). In initial bioassays, various doses (0.5, 1, 1.5, 2.5 and 4.5 μg) of azadirachtin was tested alone on newly ecdysed pupae and the inhibition doses (ID) of adult emergence determined. In a follow-up experiment, azadirachtin applied alone at its ID₂₅ (0.59 μg) and ID₅₀ (1.10 μg) was evaluated on catalase (CAT) and glutathion S-transferase (GST) activities, and yolk protein content in fat body and ovaries. Results showed that azadirachtin at the two tested doses increased significantly the activity of both GST at 48 and 72 hours, and CAT at 24, 48 and 72 hours following treatment. Moreover, azadirachtin treatment at these doses reduced significantly the yolk protein content in fat body and ovaries as compared to the control series. Finally, the exogenous 20E (0.25 and 0.50 μg), applied 24 or 48 h after azadirachtin treatment, relatively restored the normal values of CAT, GST and yolk protein content in fat body and ovaries. All these results indicate that exogenous 20E can compensate the depressive effects induced by azadirachtin on *D. melanogaster*.

Key words: *Drosophila melanogaster*, azadirachtin, 20-hydroxyecdysone, oxidative stress, yolk protein.

INTRODUCTION

Azadirachtin, a triterpenoid insecticide belonging to the limonoid class, is present mostly in the seeds of the neem tree (*Azadirachta indica*) (Morgan 2009) and is one of the most biologically active natural insecticides (Mordue & Blackwell 1993; Morgan 2009). This insecticide possesses a strong toxic activity against many insect pests such as Diptera, Lepidoptera, Dictyoptera and Neuroptera (Mordue *et al.* 2005; Tine *et al.* 2011; Scudeler & Santos 2013; Tomé *et al.* 2013). The conventional neurotoxins possess secondary effects on the environment (Yang *et al.* 2009; Nasirian 2010) and azadirachtin is considered as an excellent alternative (Mordue *et al.* 2005; Morgan 2009). Because of its low toxicity in the environment and rapid biodegradability, the use of azadirachtin has been widely encouraged for crop protection (Isman 2006). Different works on non-target organisms have shown side effects of azadirachtin on bees (Efrom *et al.* 2012; Barbosa *et al.* 2014); however, in aquatic organisms, azadirachtin could be used as a

potential immunostimulant and a promising agent to control fish parasites (Kumar *et al.* 2013; Banerjee *et al.* 2014). The effects of azadirachtin have been reported in different insect species (Mordue *et al.* 2005). Thus, azadirachtin interferes with chemoreception and causes damage to insect tissues such as muscle, fat body, and the gut (Capinera *et al.* 2007). It is particularly active on mitotic cells by blocking polymerization of microtubules (Mordue *et al.* 2010). Azadirachtin has antiproliferative effects and induces apoptosis in *Spodoptera litura* (Fabricius) cell walls (Huang *et al.* 2011). It blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila* (Qiao *et al.* 2014). Azadirachtin acts as a growth regulator with an antagonistic action of both juvenile hormone (JH) and moulting hormone (ecdysteroids) (Mordue *et al.* 2005; Mordue *et al.* 2010) but the mechanism of action of this pesticide remains unknown (Wang *et al.* 2014). Direct effects of azadirachtin on the various developmental processes, related to the signalling of the 20-hydroxyecdysone, have been

*Authors for correspondence. E-mails: nadia.aribi@univ-annaba.dz / noureddine.soltani@univ-annaba.dz

previously reported (Mordue *et al.* 2005); however, its action on reproduction must be detailed and its effect on other parameters related indirectly to signalling of 20E like oxidative stress have not been investigated. Therefore, more work is required to understand interaction between azadirachtin and 20E and how the action of the azadirachtin is expected to reduce anti-oxidative metabolism and vitellogenesis by reducing 20E production; seeing that 'vitellogenesis', the process of synthesis of yolk protein in the fat body and ovaries, requires the presence of both hormones JH and 20E (Jowett & Postlethwait 1980; Swevers *et al.* 2005; Tufail *et al.* 2014). The objectives of the present study were a) to determine the lethal parameters of azadirachtin, applied topically alone on *D. melanogaster* pupae, b) to examine its sublethal effect on the specific activity of GST and CAT regarding the antioxidant activity of 20E (Krishnan *et al.* 2007), c) on yolk protein content in fat body and ovaries (YP) and target of the 20E (Jowett & Postlethwait 1980; Swevers *et al.* 2005; Tufail *et al.* 2014) and, d) to test the capacity of exogenous 20E to compensate the depressive effects induced by azadirachtin by using combined treatments (azadirachtin-20E) in order specify the relationship between these two compounds.

MATERIAL AND METHODS

Insect

Drosophila melanogaster Meigen, 1830 (Canton S strain) was reared in plastic vials on an artificial medium as described by Riemensperger *et al.* (2013) and maintained in an incubator at 25 ± 2 °C under a photoperiod of 12 h light:12 h dark and a relative humidity of 70 %.

Azadirachtin and topical bioassays

A commercial formulation of azadirachtin (Neem Azal-T/S 1 % EC; Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany) was used according to Tomé *et al.* (2013) and Barbosa *et al.* (2014). The product was dissolved in acetone and topically applied (1 μ l per insect) on newly ecdysed pupae (<6 h old). Control insects were treated with acetone alone (1 μ l). Five doses (0.5, 1, 1.5, 2.5 and 4.5 μ g) were tested (three replicates per dose were done each consisting of 30 insects). The inhibition percentages of adult emergence were corrected in accordance with Abbott (1925). The inhibition doses (ID) ID₂₅ and ID₅₀ (doses causing inhibition of adult emergence

in 25 % and 50 % of the treated insects, respectively) were determined together with their corresponding 95 % fiducial limits (95 % FL) and the Hill slope.

Application of exogenous 20-hydroxyecdysone

The exogenous 20E (Sigma) was dissolved in acetone and applied topically alone or in combination with azadirachtin. Azadirachtin was applied at its ID₅₀ (1.10 μ g) on newly ecdysed pupae. The 20E was tested at two doses (0.25 and 0.50 μ g) applied topically at 24 or at 48 h after azadirachtin treatment. These two doses of 20E were chosen based on a previous study (El Ouar *et al.* 2010). Moreover, these two retained times coincide with the ascending and descending phase of the major pupal ecdysteroid peak, respectively (Kozlova & Thummel 2000).

Determination of CAT and GST activities

Newly moulted pupae of *D. melanogaster* were treated topically with azadirachtin at its ID₂₅ (0.59 μ g) and ID₅₀ (1.10 μ g) as described below. Samples were collected at different times (24, 48 and 72 h) following azadirachtin treatment. CAT activity was determined according to Claiborne (1985). Briefly, three pupae were pooled and homogenized in 1 ml of buffer phosphate (0.1 M, pH 7.4). The homogenate was centrifuged (15 000 rpm for 10 min) and then the supernatant recovered for use as the enzyme source. The assay was performed with 50 μ l of supernatant added to 750 μ l of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 200 μ l of hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.5 M). The absorbance reading was done at 240 nm after 15 s every 5 s for a period of 30 s. The GST assay was done following the procedure of Habig *et al.* (1974) as previously described by Habes *et al.* (2006) with use of reduced glutathione (GSH, 5 mM) and 1-chloro-2-4-dinitrobenzoic acid (CDNB, 1 mM). Pools of three pupae were homogenized in 1 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 6). The homogenate was centrifuged (14 000 rpm for 30 min) and the supernatant collected was used for the enzymatic assay. Hereto, 200 μ l of the resulting supernatant was added to 1.2 ml of the mixture GSH-CDNB in phosphate buffer (0.1 M, pH 7). Changes in absorbance were measured at 340 nm every minute for a period of 5 min.

Enzyme activities were expressed as μ mol per min and per mg protein. The protein amounts in the total homogenate were quantified according to Bradford (1976). CAT and GST assays were con-

ducted with 5–10 replicates each containing three pooled pupae.

Yolk protein quantification

Azadirachtin was administered by topical application at its ID_{25} ($0.59 \mu\text{g}$) and ID_{50} ($1.10 \mu\text{g}$) on newly ecdysed pupae. Subsequently, surviving female adults were collected from control and treated series at different times (6, 12, 18 and 24 h after emergence) during sexual maturation and dissected. Fat body and ovaries, synthesis sites of yolk protein (Swevers *et al.* 2005), were removed as described by Postlethwait *et al.* (1980) and Song *et al.* (1990), and used for yolk protein quantification. The extraction of yolk protein in fat body and ovaries separately was performed using Tris buffer following the procedure of Postlethwait *et al.* (1980) and Fabre *et al.* (1992). The quantification of yolk protein in fat body and ovaries was made according to Bradford (1976) in an aliquot ($100 \mu\text{l}$) using Coomassie brilliant blue G-250 (CBB) as a reagent and bovine serum albumin (BSA) as standard (Sigma). The absorbance was read at a wavelength of 595 nm.

Statistical analysis

Results are presented as means \pm standard deviation (S.D.). The homogeneity of variances was checked by Levene's test. The significance between different series was tested using Student's *t*-test at 5 % level. Data were subjected to one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* Tukey test HSD. All statistical analyses were performed using GraphPad prism version 6.01 for Windows (GraphPad software, La Jolla California, U.S.A., www.Graphpad.com) and $P < 0.05$ was considered statistically different.

RESULTS

Toxicity of azadirachtin against *D. melanogaster* pupae

Azadirachtin applied topically on newly ecdysed pupae caused inhibition of adult emergence with dose-response effects (Fig. 1). Various morphological types such as partial adult emergence, inhibition of exuviation and malformed adults were observed. Indeed, the corrected inhibition values were 19.13 ± 0.51 % for the lowest dose ($0.5 \mu\text{g}$) and 90.07 ± 3.19 % for the highest tested dose ($4.5 \mu\text{g}$). The inhibition recorded in controls was 10.89 ± 3.75 %. Statistical analysis indicated

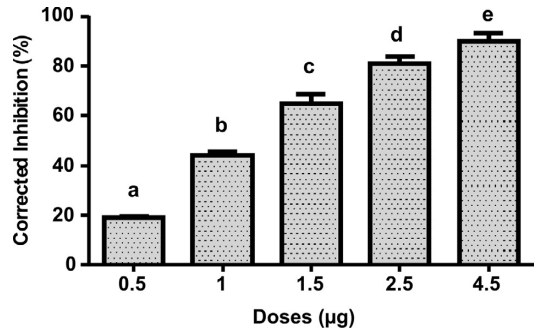


Fig. 1. Effect of azadirachtin (μg) topically applied to newly ecdysed pupae of *Drosophila melanogaster* on the adult exuviation inhibition (%) (mean \pm S.D.; $n = 3$ replicates containing each 30 pupae; values indicated by different letters are significantly different by HSD test at $P < 0.001$).

that the insecticide is toxic with a significant ($P < 0.001$) effect of doses. The Tukey HSD test indicates that there was a significant relationship between the different tested doses. The inhibition doses ($ID \mu\text{g}$) of adult emergence with their corresponding 95 % fiducial limits (95 % FL) were: ID_{10} , 0.32 (0.25–0.40); ID_{25} , 0.59 (0.51–0.69); ID_{50} , 1.10 (1.02–1.20); ID_{90} , 3.80 (3.08–4.71). The non linear regression used shows a Hill slope of 1.77 (1.47–2.07).

Effects of azadirachtin on CAT and GST activities

In the control series the specific activity of CAT varied as function the time ($P < 0.001$); thus, the activity increased to 0.65 ± 0.09 at 48 h and to $0.82 \pm 0.11 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins at 72 h. The same trend was observed in the treated series with marked effect. Azadirachtin at the two tested doses (ID_{25} and ID_{50}) increased significantly ($P < 0.001$) the specific activity of CAT at 24, 48 and 72 h following treatment, as compared to controls (Fig. 2A). A dependent dose-response was observed at 48 h ($P = 0.002$) and at 72 h ($P < 0.0011$).

Two-way ANOVA confirmed these results and showed a significant effect of the compound as function of the dose ($F_{2,57} = 85.34$; $P < 0.0001$), the time ($F_{2,57} = 166.9$; $P < 0.0001$) and between these two parameters ($F_{4,57} = 12.11$; $P < 0.0001$).

Application of 20E at two tested doses (0.25 and $0.50 \mu\text{g}$) after azadirachtin treatment restored the physiological values (Table 1) and this for the two times of 20E application (24 and 48 h). Data on specific activity of the CAT showed comparable values between control series ($0.77 \pm 0.15 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) and combined treatment ($0.63 \pm$

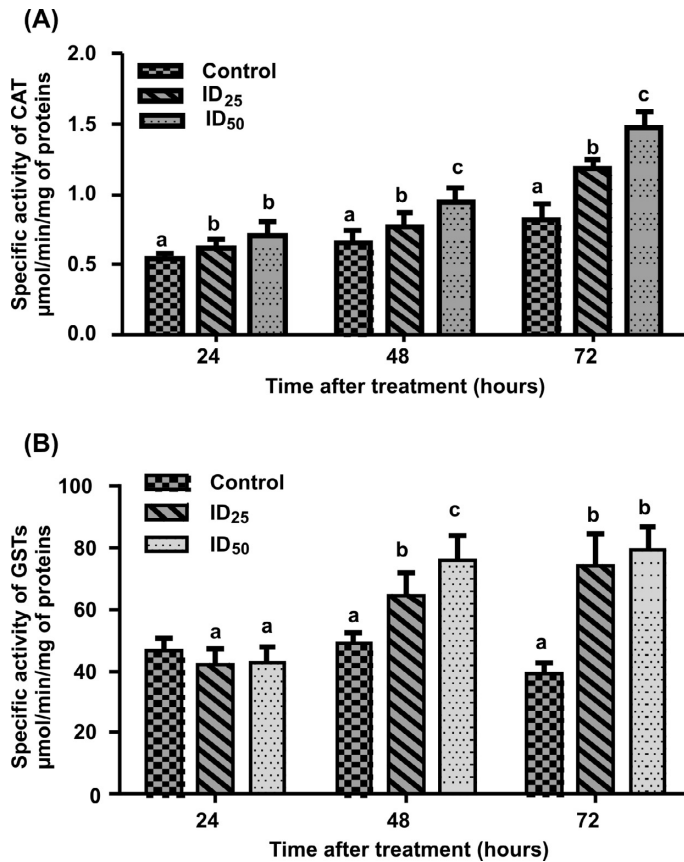


Fig. 2. Effect of azadirachtin topically applied alone on newly ecdysed pupae of *Drosophila melanogaster* on specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) of CAT (A) and GSTs (B) as function of the time (hours) following treatment (mean \pm S.D.; $n = 5-10$ replicates; for each exposure time values indicated by different letters are significantly different by t -test at $P < 0.05$).

0.10; 0.60 ± 0.12 ; 0.98 ± 0.28 ; $0.85 \pm 0.28 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) (Table 1).

Topical application of azadirachtin at their respective ID₂₅ and ID₅₀ also caused a significant increase ($P < 0.001$) in the specific GSTs activity at 48 h (64.70 ± 6.97 for ID₂₅ and $76.17 \pm 7.54 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ protein for ID₅₀), and 72 h (74.26 ± 10.2 for ID₂₅ and $79.27 \pm 7.49 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ protein for ID₅₀) after treatment as compared to controls (Fig. 2B). A dependent dose-response was observed only at 48 h ($P = 0.037$). Two way ANOVA confirms these results and indicated a significant effect of dose ($F_{2,42} = 59.72$; $P < 0.0001$), time ($F_{2,42} = 59.38$; $P < 0.0001$) and interaction dose-time ($F_{4,42} = 24.74$; $P < 0.0001$).

The exogenous application of 20E at 24 or 48 h following azadirachtin treatment shows that the system of GST is not induced compared to treat-

ment with azadirachtin applied alone. Thus, the values obtained after combined treatment (43.30 ± 2.90 and $38.03 \pm 5.01 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein for the two doses of 20E, respectively) are comparable to controls ($43.90 \pm 8.36 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) when the 20E was applied 48 h after azadirachtin (Table 1); however, when the application was made after 24 h a decrease of GSTs activity was observed (34.20 ± 1.99 and $27.39 \pm 3.38 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).

Effects of azadirachtin on yolk protein contents in fat body and ovaries

Azadirachtin was administered topically on newly ecdysed pupae at two doses (ID₂₅, ID₅₀), and its effects were evaluated on yolk protein content in surviving adults from treated pupae. In controls, the yolk protein content in fat body increased

Table 1. Effect of 20-hydroxyecdysone (20E at 0.25 and 0.50 µg) on CAT and GST activities (µmol/min/mg protein) measured 72 h following pupal exuviation as function of the time after topical application of azadirachtin (Aza at 1.10 µg) on newly ecdysed pupae of *Drosophila melanogaster* (mean ± S.D., based on 5–7 replicates).

Treatment	Specific activity of CAT (µmol/min/mg protein)	Specific activity of GSTs (µmol/min/mg protein)
Controls	0.77 ± 0.15 ab	43.90 ± 8.36 a
Aza (1.10 µg) followed by 20E (0.25 µg) 24 h after	0.63 ± 0.10 ab	34.20 ± 1.99 bc
Aza (1.10 µg) followed by 20E (0.5 µg) 24 h after	0.60 ± 0.12 a	27.39 ± 3.38 b
Aza (1.10 µg) followed by 20E (0.25 µg) 48 h after	0.98 ± 0.28 b	43.30 ± 2.90 a
Aza (1.10 µg) followed by 20E (0.5 µg) 48 h after	0.85 ± 0.28 ab	38.03 ± 5.01 ac

For all series, mean values followed by the same letter are not significantly different at 5 % level by Tukey's test of multiple comparisons.

significantly at 12 h ($P = 0.045$) and 24 h ($P = 0.043$). Azadirachtin reduced significantly the yolk protein content at all tested times. In addition, it acts with a dose-dependent effect at 6 ($P = 0.001$), 12 ($P = 0.036$) and 18 h ($P = 0.035$), respectively. At 24 h, there was no significant difference between the two tested doses (Fig. 3A).

In the control series, the yolk protein content in ovaries increased significantly at 12 ($P < 0.001$) and 24 h ($P = 0.0057$). Azadirachtin treatment reduced significantly the yolk protein content in ovaries at all times tested with a dose-response relationship only at 18 ($P = 0.04$) and 24 h ($P = 0.02$) (Fig. 3B).

Two way ANOVA confirms these results and indicated significant effects of doses ($F_{2,44} = 78.23$; $P < 0.0001$; $F_{2,44} = 84.80$; $P < 0.0001$), time ($F_{3,44} = 19.02$; $P < 0.0001$; $F_{3,44} = 81.02$; $P < 0.0001$) and not significant ($F_{6,44} = 0.41$; $P = 0.866$; $F_{6,44} = 1.25$; $P = 0.297$) doses-time interaction for yolk protein content in fat body and ovaries, respectively.

Application of 20E, 24 or 48 h following azadirachtin treatment restored the physiological values for the yolk protein content in fat body and ovaries (Table 2). Statistical analysis showed, for the yolk protein content in fat body, comparable values ($P > 0.05$) between control series (70.98 ± 6.68) and combined treatment (78.66 ± 8.17 ; 71.57 ± 4.87 ; 67.20 ± 8.41 ; 61.81 ± 8.53), while for the yolk protein content in ovaries, comparable results were also obtained between control series (94.69 ± 3.24) and combined treatment (97.61 ± 4.60 ; 104.50 ± 9.47 ; 99.29 ± 5.55) except for the lowest dose of 20E applied 24 h following azadirachtin treatment (Table 2).

DISCUSSION

Insecticidal activity of azadirachtin

In this study, we evaluated the topical toxicity of azadirachtin on newly ecdysed pupae of *D. melanogaster*. Results revealed that azadirachtin caused lethal effects on *D. melanogaster* leading to inhibition of adult formation. The ID_{25} and ID_{50} values were estimated to be 0.59 and 1.10 µg, respectively corresponding to inhibition concentration (IC) $IC_{25} = 595$ mg/l and $IC_{50} = 1106$ mg/l. In the literature, strong variations in susceptibility to azadirachtin changes as a function of the stages, and the method of application; the larval stage of *D. melanogaster* seems less sensitive to azadirachtin compared to pupal stage when neem extract was applied by ingestion at a concentration of IC_{50} of 24 000 mg/l (Anjum *et al.* 2010). The toxicity of azadirachtin (NeemAzal®) has been reported in other dipteran species such as mosquito, the following ID_{50} of adult emergence, tested by contact in the larvae, was found to be 0.304, 0.249, 0.048 and 0.006 mg/l, respectively, in *Culex pipiens* (Linné) (Alouani *et al.* 2009), and *Aedes aegypti* (Linnaeus), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles stephensi* (Liston) (Gunasekaran *et al.* 2009). The susceptibility to azadirachtin also changes as a function of the insect order like *Blattella germanica* (Dictyoptera) (Tine *et al.* 2011), *Tuta absoluta* (Lepidoptera) (Tomé *et al.* 2013) and *A. aegypti* (Diptera) (Koodalingam *et al.* 2014). These negative effects induced by azadirachtin on development of *D. melanogaster* can be explained by several processes. Firstly, complete moult inhibition could be due to a blockage

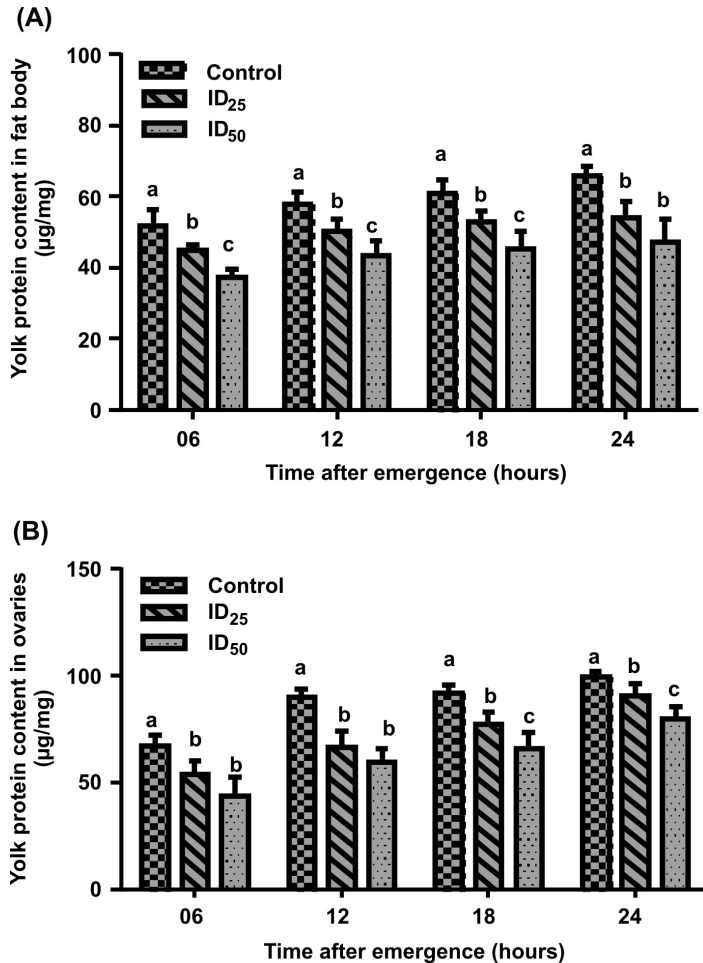


Fig. 3. Effect of azadirachtin topically applied on newly ecdysed pupae of *Drosophila melanogaster* on the content ($\mu\text{g}/\text{mg}$) of yolk protein in fat body (A) and ovaries (B) in surviving adult females as function the time (hours) following emergence (mean \pm S.D.; $n = 4\text{--}5$ replicates; for each exposure time values indicated by different letters are significantly different by *t*-test at $P < 0.05$).

of synthesis and release of ecdysteroids by the prothoracic glands *via* a specific action of azadirachtin on the release of the prothoracicotrophic hormone (PTTH) (Mordue *et al.* 2005). Secondly, azadirachtin can directly affect the production of ecdysone 20-monooxygenase from the midgut and fat body; this enzyme is responsible for the conversion of ecdysone to 20E (Mordue *et al.* 2005). Thirdly, the formation of new adult organs can be disturbed according to Anuradha *et al.* (2007) where the authors noted that during metamorphosis an impact on the formation of eyes and wings of *D. melanogaster*. Fourthly, azadirachtin can interfere with the central nervous system (CNS) of *Drosophila* *via* inhibition of excitatory cholinergic

transmission and partly blocking the calcium channel (Qiao *et al.* 2014).

Effects of azadirachtin on biomarkers

In order to determine the action of the azadirachtin on oxidative stress and to confirm the intervention of GST in the mechanism of its detoxication of azadirachtin (Wang *et al.* 2009), we have chosen to follow the enzyme activities of two enzymes, CAT and GSTs. Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) plays a vital role in reducing reactive oxygen-free radicals and maintaining cellular homeostasis in organisms. It was one of the first enzymes proposed to be an effective marker of oxidative stress. Glutathione S-transferases (GST,

Table 2. Effect of 20-hydroxyecdysone (20E at 0.25 and 0.50 μg) on yolk protein content in fat body and ovaries ($\mu\text{g}/\text{mg}$) measured 24 h after adult emergence as function the time following topical application of azadirachtin (Aza at 1.10 μg) on newly ecdysed pupae of *Drosophila melanogaster* (mean \pm S.D., based on 4–6 replicates).

Treatment	Yolk protein content in fat body ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Yolk protein content in ovaries ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Controls	70.98 \pm 6.68 ab	94.69 \pm 3.24 a
Aza (1.10 μg) followed by 20E (0.25 μg) 24 h after	78.66 \pm 8.17 a	46.30 \pm 2.77 b
Aza (1.10 μg) followed by 20E (0.5 μg) 24 h after	71.57 \pm 4.87 ab	97.61 \pm 4.60 a
Aza (1.10 μg) followed by 20E (0.25 μg) 48 h after	67.20 \pm 8.41 ab	104.50 \pm 9.47 a
Aza (1.10 μg) followed by 20E (0.5 μg) 48 h after	61.81 \pm 8.53 b	99.29 \pm 5.55 a

For all series, mean values followed by the same letter are not significantly different at 5 % level by Tukey's test of multiple comparisons.

EC.2.5.1.18) are multifunctional enzymes involved in many cellular physiological activities, such as detoxification of endogenous and xenobiotic compounds, biosynthesis of hormones and protection against oxidative stress (Enayati *et al.* 2005). Our study showed that azadirachtin significantly increases the specific activity of GSTs in *D. melanogaster* compared with controls. This is in accordance with the literature as reported in *Xanthogaleruca luteola* (Müller) (Coleoptera) (Valizadeh *et al.* 2013) and in *Helicoverpa armigera* larvae (Hübner) (Lepidoptera) after treatment with the azadirachtin (War *et al.* 2014). In our experiments, the increase in GST activity was correlated with the increase of CAT activity after treatment with azadirachtin. The increase in CAT activity, in control series at 48 and 72 h, may be due to the process of metamorphosis like cell division and differentiation. An increase of activity of CAT in pupae of *D. melanogaster* after 24, 48 and 72 h of treatment was also noted, however, the increase of GSTs activity is observed only from 48 h. Azadirachtin had no significant effect on the GST activity at 24 h; however, the presence of an oxidative stress at the same moment could be due to an antagonistic action of the azadirachtin applied alone on endogenous 20E. This hypothesis is supported by the results of combined treatments where the application of 20E after azadirachtin restores the normal value of CAT activity. Similarly, this combined treatment reveals a significant reduction in GST activity compared to the control and restored the normal values. These results also showed that exogenous 20E represses the GST system and pro-

vided a systemic antioxidant protection against oxidative stress caused by azadirachtin. In addition, it is possible that exogenous 20E probably acts as a trigger activating innate antioxidative systems. This antioxidant power of 20E has been demonstrated *in vivo* in *Pyrrhocoris apterus* (Linné) after treatment with paraquat (pyridine) (Krishnan *et al.* 2007) and *in vitro* in neuroblastoma cells of the rat after exposure to H_2O_2 (Hu *et al.* 2012). The mechanism of antioxidant power of 20E is not yet clearly determined (Krishnan *et al.* 2007; Hu *et al.* 2012).

Effects of azadirachtin on yolk protein content

In *D. melanogaster*, ovarian development comprises 14 stages (Kozlova & Thummel 2000); the vitellogenesis process starts at day 1 after emergence, corresponding to stage 8 under the influence of JH and 20E, allows the accumulation of energy reserves and plastic and finally post-vitellogenesis occurs between stages 9 and 10, which corresponds to an important increase in the size of the oocytes due to the incorporation of proteins (Swevers *et al.* 2005). In the control series, the increase of the yolk protein content in fat body and ovaries at 12 and 24 h is related to their synthesis (Swevers *et al.* 2005). Our results show that azadirachtin applied topically to newly ecdysed pupae at two doses (ID_{25} and ID_{50}) affects the vitellogenesis in *D. melanogaster* by reducing significantly the contents of yolk protein in fat body and ovaries measured 24 h after the emergence, corresponding to first laying cycle of adult

females. This is in accordance with experiments conducted in the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille), and in many insects like *Apis mellifera* (Linnaeus) and *Antheraea polyphemus* (Cramer) treated with azadirachtin (Denardi *et al.* 2011) or with JH and ecdysone agonists respectively (Pinto *et al.* 2000; Sridhara & Lee 2013). Azadirachtin could affect the reproductive system of female insects and vitellogenesis by causing alterations and morphological changes of oocytes such as a severe degeneration of follicle cells, fragmentation in the germinal vesicle and the inversion of their location (Lucantoni *et al.* 2006; Denardi *et al.* 2010; Denardi *et al.* 2011). The effects of azadirachtin on the yolk protein content could possibly be explained by the fact that vitellogenesis and ovarian activity were ensured by the ecdysteroids and J.H. (Swevers *et al.* 2005; Tufail *et al.* 2014) and that azadirachtin acts like an antagonist of these two hormones (Mordue *et al.* 2005). This disturbance could also be explained by the impact of azadirachtin on the production of ovarian ecdysteroids which play a role in the control of vitellogenesis (Mordue *et al.* 2005; Huang *et al.* 2008). Moreover, the neurotoxic action of azadirachtin (Qiao *et al.* 2014) could affect the neuroendocrine system *via* the neuropeptides (allatostatins, allatotropins, PTTH) which control the hormonal regulation of vitellogenesis. Application of exogenous 20E, which restores the normal state, seems to confirm these hypotheses;

however, for the yolk protein in ovaries, the biological response varies as a function of the doses and the moment of 20E application. This result can be explained by an interaction with endogenous hormones due to endocrine regulation or by dysfunctions at the level of the interaction between JH and 20E. Indeed, the JH and 20E play a role in the synthesis and the captation of yolk protein by the ovaries; a correct balance between these two hormones is required for the normal progress of vitellogenesis (Swevers *et al.* 2005; Gruntenko & Rauschenbach 2009).

In conclusion, the present study showed that azadirachtin exhibited toxic effects on *D. melanogaster*. Moreover, exogenous 20E applied after azadirachtin treatment can restore the normal physiological state. Further investigations are needed for a better understanding of the mechanism of azadirachtin on the two main development hormones (JH and 20E), and on the antioxidant system.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the National Fund for Scientific Research of Algeria (Laboratory of Applied Animal Biology to N. Soltani) and by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (CNEPRU project F 011.2008.0024 to Prof. N. Aribi).

REFERENCES

- ABBOTT, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**: 265–267.
- ALOUANI, A., REHIMI, N. & SOLTANI, N. 2009. Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the republic of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences* **2**(1): 15–22.
- ANJUM, S.I., YOUSEF, M.J., AYAZ, S. & SIDDIQUI, B.S. 2010. Toxicological evaluation of chlorpyrifos and neem extract (biosal b) against 3rd instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Animal & Plant Sciences* **20**(1): 9–12.
- ANURADHA, A., ANNADURAI R, S. & SHASHIDHARA, L.S. 2007. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**(6): 627–634.
- BANERJEE, A., SUBHA MANNA, S. & SAHA, S.K. 2014. Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaf on oocyte maturation, oviposition, reproductive potentials and embryonic development of a freshwater fish ectoparasite *Argulus bengalensis* Ramakrishna, 1951 (Crustacea: Branchiura). *Parasitology Research* **113**(12): 4641–4650.
- BARBOSA, W.F., DE, M.L., GUEDES, R.N. & SMAGGHE, G. 2014. Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*. DOI: 10.1007/s10646-014-1365-1369.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities on protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1–2): 248–254.
- CAPINERA, J.L. & FROEBA, J.G. 2007. Behavioral responses of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) to Azadirex (Neem)-treated host plants. *Journal of Economic Entomology* **100**(1): 117–122.
- CLAIBORNE, A. 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.) *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. 283–284. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- DENARDI, S.E., BECHARA, G.H., OLIVEIRA, P.R. & CAMARGO-MATHIAS, M.I. 2010. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Experimental Parasitology* **126**(4): 462–470.
- DENARDI, S.E., BECHARA, G.H., OLIVEIRA, P.R., NUNES, E.T. & CAMARGO-MATHIAS, M.I. 2011. Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta*

- indica* A. Juss) on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Microscopy Research and Technique* **74**(10): 889–899.
- EFROM, C.F.S., REDAELLI, L.R., MEIRELLES, R.N. & OURIQUE, C.B. 2012. Side-effects of pesticides used in the organic system of production on *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **55**(1): 47–53.
- EL OUAR, I., ARIBI, N. & SOLTANI-MAZOUNI, N. 2010. Dosage des ecdystéroïdes chez *Ephestia kuehniella*. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série, Zoologie, Rabat* **47**(1): 137–140.
- ENAYATI, A.A., RANSON, H. & HEMINGWAY, J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* **14**(1): 3–8.
- FABRE, M.C., DESCAMPS, M. & BAERT, J.-L. 1992. Identification and partial characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulata* Latreille (Myriapoda Chilopoda). In: Meyer, E., Thaler, K. & Schedl, W. (Eds) *Advances in Myriapodology*. 117–121. *Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck, Austria*.
- GRUNTENKO, N. & RAUSCHENBACH, I. 2009. 20-hydroxyecdysone, juvenile hormone and biogenic amines: Mechanisms of interaction in control of *Drosophila* reproduction under normal and stressful conditions. In: Smaghe, G. (Ed) *Ecdysone: Structures and Functions*. 317–332. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- GUNASEKARAN, K., VIJAYAKUMAR, T. & KALYANASUNDARAM, M. 2009. Larvicidal and emergence inhibitory activities of NeemAzal T/S 1.2 per cent EC against vectors of malaria, filariasis & dengue. *Indian Journal of Medical Research* **130**(2): 138–145.
- HABES, D., KILANI-MORAKCHI, S., ARIBI, N., FARINE, J.P. & SOLTANI, N. 2006. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: alteration in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **84**(1): 17–24.
- HABIG, W.H., PABST, M.J. & JAKOBY, W.B. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**(2): 7130–7139.
- HU, J., LUO, C.X., CHU, W.H., SHAN, Y.A., QIAN, Z.-M., ZHU, G., YU, Y.B. & FENG, H. 2012. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF- κ B and JNK pathways. *PLOS ONE* **7**(12): e50764.
- HUANG, J.-F., SHUI, K.-J., LI, H.-Y., HU, M.-Y. & ZHONG, G.-H. 2011. Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SI-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **99**(1): 16–24.
- HUANG, X., WARREN, J.T. & GILBERT, L.I. 2008. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *Journal of Genetics and Genomics* **35**(1): 1–10.
- ISMAN, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* **51**: 45–66.
- JOWETT, T. & POSTLETHWAIT, J.H. 1980. The regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body by 20-hydroxy-ecdysone and a juvenile hormone analogue. *Developmental Biology* **80**(1): 225–234.
- KOODALINGAM, A., DEEPALAKSHMI, R., AMMU, M. & RAJALAKSHMI, A. 2014. Effects of neemazal on marker enzymes and hemocyte phagocytic activity of larvae and pupae of the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **17**(2): 175–181.
- KOZLOVA, T. & THUMMEL, C.S. 2000. Steroid regulation of post-embryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **11**(7): 276–280.
- KRISHNAN, N., VEČEŘA, J., KODRÍK, D. & SEHNAL, F. 2007. 20-Hydroxyecdysone prevents oxidative stress damage in adult *Pyrrhocoris apterus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **65**(3): 114–124.
- KUMAR, S., RAMAN, R.P., PANDEY, P.K., MOHANTY, S., KUMAR, A. & KUMAR, K. 2013. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **34**(2): 564–573.
- LUCANTONI, L., GIUSTI, F., CRISTOFARO, M., PASQUALINI, L., ESPOSITO, F., LUPETTI, P. & HABLUNETZEL, A. 2006. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and Cell* **38**(6): 361–371.
- MORDUE, L.A.J. & BLACKWELL, A. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* **39**(11): 903–924.
- MORDUE, L.A.J., MORGAN, E.D. & NISBET, A.J. 2005. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (Eds) *Comprehensive Molecular Insect Science*. 117–135. Elsevier, Oxford, U.K.
- MORDUE, L.A.J., MORGAN, E.D. & NISBET, A.J. 2010. Addendum: Azadirachtin, a natural product in insect control: An update. In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds) *Insect Control*. 204–206. Elsevier, Oxford, U.K.
- MORGAN, E.D. 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**(12): 4096–4105.
- NASIRIAN, H. 2010. An overview of German cockroach, *Blattella germanica*, studies conducted in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **13**(22): 1077–1084.
- PINTO, L.Z., BITONDI, M.M.G. & SIMÕES, Z.L.P. 2000. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxifen. *Journal of Insect Physiology* **46**(2): 153–160.
- POSTLETHWAIT, J.H., BOWNES, M. & JOWETT, T. 1980. Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **79**(2): 379–387.
- QIAO, J., ZOU, X., LAI, D., YAN, Y., WANG, Q., LI, W., DENG, S., XU, H. & GU, H. 2014. Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. *Pest Management Science* **70**(7): 1041–1047.
- RIEMENSBERGER, T., ISSA, A.-R., PECH, U., COULOM, H., NGUYEEN, M.-V., CASSAR, M., JACQUET, M.,

- FIALAN, A. & BIRMAN, S. 2013. A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Cell Reports* 5(4): 952–960.
- SCUDELER, E.L. & SANTOS, D.C.D. 2013. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). *Micron* 44: 125–132.
- SONG, Q., M.A.M., DING, T., BALLARINO, J. & WU, S.-J. 1990. Effects of a benzodioxole, j2581 (5-Ethoxy-6-(4-methoxyphenyl) methyl-1,3 benzodioxole), on vitellogenesis and ovarian development of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 37(1): 12–23.
- SRIDHARA, S. & LEE, V.H. 2013. Tebufenozide disrupts ovarian development and function in silkworms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43(12): 1087–1099.
- SWEVER, 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*. 87–156. Elsevier, Oxford, U.K.
- TINE, S., ARIBI, N. & SOLTANI, N. 2011. Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. *African Journal of Biotechnology* 10(85): 19816–19824.
- TOMÉ, H.V.V., MARTINS, J.C., CORREEA, S., GALDINO, T.V.S., PICANÇON, M.C. & GUEDES, R.N.C. 2013. Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Protection* 46: 63–69.
- TUFAIL, M., NAGABA, Y., ELGENDY, A.-M. & TAKEDA, M. 2014. Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomological Science* 17(3): 269–282.
- VALIZADEH, B., SENDI, J.J., ZIBAEI, A. & OFTADEH, M. 2013. Effect of neem based insecticide Achook[®] on mortality, biological and biochemical parameters of elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* Mull (Col.: Chrysomelidae). *Journal of Crop Protection* 2(3): 319–330.
- WANG, D., QIU, X., REN, X., ZHANG, W. & WANG, K. 2009. Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: tolerance status, synergism and enzymatic responses. *Pest Management Science* 65(9): 1040–1046.
- 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.
- WAR, A.R., PAULRAJ, M.G., HUSSAIN, B., AHMAD, T., WAR, M.Y. & IGNACIMUTHU, S. 2014. Efficacy of a combined treatment of neem oil formulation and endosulfan against *Helicoverpa armigera* (Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Insect Science* 6: 1–7.
- YANG, M.L., ZHANG, J.Z., ZHU, K.Y., XUAN, T., LIU, X.J., GUO, Y.P. & MA, E.B. 2009. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 7(1): 3–15.