



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار عنابة
UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR-ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUÉE

THESE
Présentée En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Science de la Nature
Spécialité: Physiotoxicologie Animale

Intitulé

Effets d'un pesticide naturel, l'azadirachtine (Neem-Azal) sur la reproduction chez *Drosophila melanogaster* (Diptera)

Présenté par : M. Mohamed Chemseddine OULHACI

Membres du Jury :

Mme Ouided DAAS-MAAMCHA	Pr.,	Président	Université B.M-Annaba
Mme Nadia ARIBI	Pr.,	Directrice de thèse	Université B.M-Annaba
Mme Dominique JOLY	D.R.,	Co-directrice	CNRS - Gif sur Yvette - France
Mme Zaïna AMIRAT	Pr.,	Examinatrice	Université d'Alger (USTHB)
Mme Farida KHAMMAR	Pr.,	Examinatrice	Université d'Alger (USTHB)
Mme Karima SIFI	MCA.,	Examinatrice	Université B.M-Annaba

Année Universitaire: 2017-2018.

REMERCIEMENTS

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

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

Je remercie également Le Professeur Ouided DAAS-MAAMCHA (Université d'Annaba) pour avoir accepté de présider ce jury. Mes remerciements s'adressent aussi aux membres de mon jury, Le Professeur Zaina AMIRAT (Université d'Alger-USTHB), Le Professeur Farida KHAMMAR (Université d'Alger-USTHB) et Le Docteur Karima SIFI (MC.A, Université d'Annaba), qui ont accepté de juger mon travail.

Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à mes directeurs de thèse Mme Nadia ARIBI (Professeur, Université d'Annaba) et Mme Dominique JOLY (Directrice de Recherche, CNRS Gif sur Yvette France), ainsi que Mme Béatrice DENIS (Assistante Ingénieure, CNRS Gif sur Yvette France) pour l'excellent encadrement fourni, leurs soutiens, leurs disponibilité et leurs patience malgré leurs nombreuses tâches. Grâce à leurs conseils judicieux et leurs enthousiasmes motivant, j'ai pu réaliser ce travail et j'espère avoir été à la hauteur de leurs 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.

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	11
1. Matériel biologique.....	11
1.1. Cycle de développement de <i>D. melanogaster</i>	12
1.2. Elevage au laboratoire.....	15
2. Présentation de l'insecticide et traitement.....	16
3. Tests de toxicité.....	17
4. Fertilité et suivi du développement à la génération 1 (F ₁).....	18
5. Fécondité des mâles.....	18
6. Fécondité des femelles.....	19
7. Evaluation des accouplements.....	20
8. Mobilité des mâles.....	20
9. Stockage des spermatozoïdes chez les femelles.....	22
10. Réceptivité sexuelle des femelles.....	22
11. Stérilité des femelles	23
12. Analyse statistique	23
RESULTATS	25
1. Toxicité du Neem-Azal sur la mortalité des adultes	25
1.1. Toxicité du Neem-Azal à 24 heures.....	25
1.2. Toxicité du Neem-Azal à 48 heures.....	26
1.3. Toxicité du Neem-Azal à 72 heures.....	27
1.4. Toxicité du Neem-Azal à 72 heures	29

1.5. Toxicité du Neem-Azal à 120 heures	30
1.6. Toxicité du Neem-Azal à 144 heures	31
1.7. Détermination des doses létales pour le Neem-Azal	33
2. Effets du Neem-Azal sur les différents stades de la descendance	36
3. Effets du Neem-Azal sur la fécondité des mâles	39
4. Effets du Neem-Azal sur la fécondité des femelles.....	40
5. Effets du Neem-Azal sur le succès à l'accouplement	42
6. Effets du Neem-Azal sur l'activité des mâles	47
7. Effets du Neem-Azal sur le stockage des spermatozoïdes chez les femelles	49
8. Effets du Neem-Azal sur la réceptivité sexuelle des femelles	50
9. Effets du Neem-Azal sur la stérilité des femelles	51
DISCUSSION	52
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	63
RESUMES	67
Français	67
Anglais	68
Arabe	69
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70
ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE (publications et communications)	

LISTES DES

TABLEAUX

ET

FIGURES

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité observée (%) des adultes à 24 heures (m : moyenne $\pm$ ET : erreur standard ; R = répétitions de 300 individus chacune).	26
2	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité corrigée (%) des adultes à 24 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	26
3	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité observée (%) des adultes à 48 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	27
4	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité corrigée (%) des adultes à 48 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	27
5	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité observée (%) des adultes à 72 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	28
6	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité corrigée (%) des adultes à 72 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	29
7	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité observée (%) des adultes à 96 heures. (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	30
8	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité corrigée (%) des adultes à 96 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	30
9	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité observée (%) des adultes à 120 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	31
10	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité corrigée (%) des adultes à 120 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	31
	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D.</i>	

11	<i>melanogaster</i> : mortalité observée (%) des adultes à 144 heures ($m \pm ET$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	32
12	Effets du Neem-Azal administré, <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> : mortalité corrigée (%) des adultes à 144 heures. ($m \pm ET$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).	32
13	Analyse de la variance à deux facteurs de la toxicité du Neem-Azal, administré par application topique, le jour de l'émergence, à différentes doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 μg) et différents temps (24, 48, 72, 96, 120, 144 heures) chez <i>Drosophila melanogaster</i> :	33
14	Analyse de variance a un facteur de classification de l'effet du Neem-Azal, administrée <i>in vivo</i> , par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez <i>D. melanogaster</i> , sur la mortalité des adultes après 24 heures de traitement.	34
15	Détermination des différentes doses létales (DL) 24 heures après application du Neem-Azal (μg) avec leurs intervalles de confiance à 95%.	36
16	Effets du Neem-Azal, administré <i>in vivo</i> , par application topique, (DL_{25} : 0,23 et DL_{50} : 0,63 μg) le jour de l'émergence adulte sur le nombre des descendants (génération F_1). ($m \pm ET$; $n = 8$) : Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).	38

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	<i>Drosophila melanogaster</i> : A : femelle ; B : mâles.	12
2	Le cycle de développement de <i>D. melanogaster</i> (Weigmann <i>et al.</i> , 2003). Source : (http://zookeepers.livejournal.com/).	14
3	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 mues, de la larve L ₁ à la larve L ₃ , de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte tandis que l'HJ détermine la nature de mue.	15
4	Elevage de <i>D. melanogaster</i> au laboratoire.	16
5	Structure chimique de l'azadirachtine.	17
6	Photo de l'actimètre tubulaire.	21
7	Mortalité corrigée (%) des adultes à 24 heures après application du Neem-Azal et classement des doses testées par le test HSD de Tukey. Les lettres différentes indiquent la présence d'une différence significative entre les doses.	35
8	Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée à 24 heures en fonction du logarithme de la dose du Neem-Azal (µg).	36
9	Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL ₅₀ : 0,63 µg) à l'émergence des adultes mâles de <i>D. melanogaster</i> . A : Nombre de cystes par testicule 48h après l'émergence. B : Pourcentage d'anomalies de position des noyaux de spermatocyte 48h après l'émergence. (m ± ET ; les valeurs dans chaque barre indiquent le nombre de répétitions ; * différence significative p ≤ 0,05 ; ** différence très significative p ≤ 0,01).	40
10	Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL ₅₀ : 0,63 µg) à l'émergence des adultes femelles de <i>D. melanogaster</i> . A : Nombre d'ovocytes par ovaire 48h après l'émergence. B : Volume de l'ovocyte basal 48h après l'émergence (m ± ET ; le nombre de répétitions est indiqué dans chaque barre ; ** différence très significative p ≤ 0,01 ; *** différence hautement significative p ≤ 0,001).	42
11	Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL ₅₀ : 0,63 µg) à l'émergence des adultes de <i>D. melanogaster</i> sur les accouplements dans différentes conditions observés 48 h après traitement (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; n = 75-318 ; M _T : mâle témoin; F _T : femelle témoin; M ₅₀ : mâle traité; F ₅₀ : femelle traité). A : Pourcentages d'accouplements dans les conditions de non choix. B : Pourcentages d'accouplements dans les conditions de choix du mâle. C : Pourcentages d'accouplements dans les conditions de choix de la femelle. Les nombres dans chaque barre indique le nombre de répétitions; * au-dessus des barres	44

	indiquent des différences significatives à $p \leq 0.05$; ** différences significatives à $p \leq 0.01$; *** différences hautement significatives $p \leq 0.001$.	
12	Comparaison des accouplements entre les différentes conditions de choix et de non choix 48 heures après traitement avec le Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μ g) à l'émergence des adultes de <i>D. melanogaster</i> (moyennes et intervalles de confiance à 95%; n = 75-318). A : Pourcentages d'accouplements quand seul les mâles sont traités. B : Pourcentages d'accouplements quand seul les femelles sont traitées. C : Pourcentages d'accouplements quand les deux sexes sont traités. Les nombres dans chaque barre indique le nombre de répétitions et les différentes lettres indiquent des différences significatives entre séries 2 à 2 $p \leq 0,05$.	46
13	Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μ g) à l'émergence des adultes de <i>D. melanogaster</i> . Les profils d'activité sont observées 48h après l'application topique durant 8 jours (n = 42-43).	48
14	Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μ g) à l'émergence des adultes de <i>D. melanogaster</i> . Les nombres de passages sont observées 48h après l'application topique durant 8 jours (m $\pm$ ET ; n = 42-43). ** différences significatives à $p \leq 0.01$.	48
15	Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μ g) à l'émergence des adultes de <i>D. melanogaster</i> . A : Dans le réceptacle ventral. B : dans la spermathèque. Les femelles sont observées 3h après l'accouplement (M _T : mâle témoin; F _T : femelle témoin; M ₅₀ : mâle traité; F ₅₀ : femelle traité) survenant 48h après l'application topique (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; n = 30-33). Les numéros dans les barres indiquent le nombre de répétitions	49
16	Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μ g) à l'émergence des adultes de <i>D. melanogaster</i> . Les pourcentages de réaccouplement des femelles sont obtenus 7 jours après le premier accouplement (M _T : mâle témoin; F _T : femelle témoin; M ₅₀ : mâle traité; F ₅₀ : femelle traitée) survenant 48h après l'application topique (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; n = 38-95). Les numéros dans les barres indiquent le nombre de répétitions; * différences significatives à $p \leq 0.05$.	50
17	Effets du NeemAzal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μ g) à l'émergence des adultes de <i>D. melanogaster</i> . Les pourcentages de femelles stériles sont déterminés 2 jours après le premier accouplement (M _T : mâle témoin; F _T : femelle témoin; M ₅₀ : mâle traité; F ₅₀ : femelle traité) survenant 48h après l'application topique (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; n = 38-95). Les numéros dans les barres indiquent le nombre de répétitions; * différences significatives à $p \leq 0.05$.	51

Liste des abréviations

ARN: Acide ribonucléique

ARNi: Acide ribonucléique interférant

ANOVA: Analyse de la variance

DA: Dopamine

Bt: *Bacillus thuringiensis*

DAM: Moniteur d'activité de drosophila

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DL: Dose létale

EPA: Agence américaine de protection de l'environnement

GABA: Acide gamma-aminobutyrique

GSC: Cellule souche germinale

HJ: Hormone juvénile

HSD: Différence significative

IGDs: Perturbateurs de croissance

IGRs: Régulateurs de croissance

nAChRs: Récepteurs nicotinique de l'acétylcholine

OA: Octapamine

PBS: Tampon phosphate salin

PCR: Réaction en chaîne par polymérase

PMR: Réponses postcopulatoires

SNC: Système nerveux central

5-HT: 5-hydroxytryptamine

20E: 20 hydroxyecdysone

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les pertes de récolte causées par des ravageurs peuvent représenter l'équivalent de la nourriture nécessaire pour alimenter plus de 1 milliard de personnes (Birch *et al.*, 2011). 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 et Rajeswary, 2015) et constituer une menace pour les animaux dont l'homme. Par conséquent, une gestion de 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 et Durkin, 2013). Les dépenses mondiales annuelles en pesticides représentent plus de 40 milliards de dollars pour un montant total d'environ 2,5 millions de tonnes de pesticides (USEPA, 2011 ; FAO, 2012 ; Popp *et al.*, 2013). Par ailleurs, 90% de ces produits diffusent dans l'air au moment de l'application ou encore dans les réseaux hydrauliques continentaux, du fait du phénomène de ruissellement, affectant à la fois les coûts des traitements et les écosystèmes (Ghormade *et al.*, 2011).

Les organismes de protection de l'environnement, soutenus par une importante littérature scientifique, dénoncent l'impact négatif des molécules synthétiques comme les organochlorés, organophosphorés et carbamates (Hoffman et Lorenz, 1998 ; Scudeler et Santos, 2013; Köhler et Triebkorn, 2013 ; Gupta et Milatovic, 2014) qui restent encore les plus vendus ($\approx 40\%$) dans le monde (Casida et Durkin, 2013); en effet, ces pesticides conventionnels, très efficaces dans la gestion des organismes visés (Bruce, 2010), sont responsables de l'apparition de forte résistance chez les organismes cibles (Kristensen *et al.*, 2005 ; Karunker *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009 ; Ahmad et Arif, 2010 ; Sahu *et al.*, 2014), de

la dégradation de l'environnement (Gagné *et al.*, 1999 ; Long, 2000 ; Comoretto et Chiron, 2005 ; Foley *et al.*, 2005 ; Köhler et Triebskorn *et al.*, 2013) et d'effets secondaires importants sur la santé (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016; Vrijheid *et al.*, 2016 ; Zlatnik, 2016; Ye *et al.*, 2017). Dans le cadre de la politique mondiale du développement durable, des pesticides à moindre impact environnemental ont été commercialisés ; ils sont représentés par les régulateurs de croissance ou encore par les pesticides d'origine naturelle.

Les régulateurs de croissance (Insect Growth Regulators ou IGRs) nouvellement appelés perturbateurs du développement (Insect Growth disruptors ou IGDs) sont des molécules synthétiques plus spécifiques et avec une biodégradation possible (Dhadialla *et al.*, 2010 ; Pener et Dhadialla, 2012). Les IGDs agissent *via* les deux principales hormones du développement (l'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.*, 2010) : les agonistes et antagonistes de l'HJ (Quennedey *et al.*, 1995 ; Kaakeh *et al.*, 1997 ; Aribi *et al.*, 2006 ; Smagghe *et al.*, 2012), les inhibiteurs de la synthèse de la chitine (Oberlander et Silhacek, 1998 ; Dhadialla *et al.*, 2010) et enfin, les agonistes et antagonistes des ecdystéroïdes (Aribi *et al.*, 1999 ; Dhadialla *et al.*, 2010 ; Soltani-Mazouni *et al.*, 2012 ; Daas-Maamcha *et al.*, 2013 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2014).

D'autres molécules synthétiques à moindre impact environnemental ont pu être développées à partir de molécules naturelles comme les néonicotinoïdes (Jeschke et Nauen, 2008). Ce sont des analogues synthétiques de la nicotine utilisée depuis des siècles comme insecticide mais dont les effets néfastes sur les organismes non visés sont de plus en plus cités (Sheets *et al.*, 2016). Les néonicotinoïdes comme l'imidaclopride, thiaclopride ou encore le clothianidine agissent par contact et ingestion sur le système nerveux des insectes *via* les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) (Nauen *et al.*, 2003 ; Ihara *et al.*, 2008 ;

Ghanim et Ishaaya, 2010 ; Seifert, 2014; Shivanandappa et Rajashekar, 2014).

Parallèlement à ces développements, les composés naturels avec des propriétés pesticides ont connu un regain d'intérêt (Cantrell *et al.*, 2012 ; Olson, 2015 ; Mkenda *et al.*, 2015). En effet, utilisés dès la fin des années 1800, ils restent la solution durable pour la lutte contre les insectes ravageurs comparativement aux produits synthétiques ou conventionnels (Olson, 2015). Les fermiers et paysans, en 1850, utilisaient déjà les insecticides inorganiques comme l'acide borique ou encore le soufre. Le soufre est un pesticide très utilisé dans le monde et permet de combattre une grande variété de nuisibles (Freney, 1986). Des composés dérivés du soufre comme le sulfure, le sulfaxor ou autres sulfoximine sont également disponibles sur le marché des pesticides (Sparks *et al.*, 2013 ; Griffith *et al.*, 2015). L'acide borique a été très utilisé contre les blattes (Walter, 1918) puis abandonné du fait de sa faible toxicité. Ce pesticide qui a retrouvé ces dernières années un regain d'intérêt de par son origine naturelle (Gore *et al.*, 2004) agit en inhibant l'acétylcholinestérase et en détruisant la structure intestinale (Habes *et al.*, 2006) mais son mode d'action primaire reste à préciser. Les pesticides avec une origine naturelle (animaux, plantes, bactéries) mais issus de la biotechnologie se définissent comme étant des « biopesticides ». Ils sont classés en 3 catégories selon leur origine microbienne, animale ou végétale (Deravel *et al.*, 2014) et peuvent être utilisés en agriculture conventionnelle ou biologique mais avec une toxicité bien plus faible que leurs homologues chimiques. Selon, l'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA), il a été enregistré plus de 192 biopesticides actifs utilisés dans les programmes de lutte intégrée (Chandler *et al.*, 2011 ; Cantrell *et al.*, 2012).

Les biopesticides d'origine microbienne sont des substances actives provenant de virus, bactéries ou champignons (Deravel *et al.*, 2014). Les Baculoviridae sont des virus qui infectent les arthropodes (Chen *et al.*, 2002). L'infection qui débute dans l'intestin moyen induit la mort des tissus environ 4 jours après la propagation du virus. Après liquéfaction des

tissus, des millions de formes infectent les nouveaux hôtes (Washburn *et al.*, 2003). Les biopesticides bactériens à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), ou bacille de Thuringe, sont les plus commercialisés et différentes formulations sont disponibles (Deravel *et al.*, 2014). *B. thuringiensis* est une bactérie (Gram+) aérobique naturellement présente dans l'environnement (sol, eau, air et feuillages). Leurs endo-endotoxines agissent selon un mécanisme bien connu en se fixant sur des sites récepteurs de la membrane cellulaire de l'intestin (Deravel *et al.*, 2014 ; Dammak *et al.*, 2016). Par ailleurs, c'est en 1977 avec l'endotoxine de Bt que l'appellation biopesticide est apparue (Goldberg, 1977) et depuis, plusieurs souches de Bt mais aussi d'autres espèces de bacilles ont été mises sur le marché (Dong et Zhang, 2014 ; Lord, 2005). Parmi les pesticides d'origine bactérienne se trouve aussi le spinosad provenant de la fermentation d'une bactérie actinomycète *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz et Yao, 1990). Ce neurotoxique, présente un mode d'action unique, car il agit à la fois sur les nAChRs (Salgado, 1997; Kirst, 2010 ; Rinkevich et Scott, 2012) et sur les récepteurs gabaergiques (GABA). Le spinosad agit par contact et ingestion (Ishaaya, 2001 ; Salgado et Sparks, 2005 ; Osorio *et al.*, 2008) et différents travaux ont montré son efficacité (Wang *et al.*, 2009 ; Maiza *et al.*, 2013 ; Benchaabane *et al.*, 2016 ; Sheng *et al.*, 2016 ; Reddy *et al.*, 2016). Les nouvelles technologies ont permis la mise au point de dérivés semi-synthétiques du spinosad (spinetoram), et dont le développement se poursuit (Galm et Sparks, 2016). Certains champignons sont également exploités en tant que biopesticides et correspondent le plus souvent à des champignons entomopathogènes ; parmi ces derniers, il est possible de citer *Metarhizium anisopliae* ou encore *Beauveria bassiana* qui sont cosmopolites (Lord, 2005 ; Wang et Xu, 2012 ; Contreras *et al.*, 2014 ; Garza-Hernández *et al.*, 2015 ; Ortiz-Urquiza *et al.*, 2015).

Les biopesticides animaux sont des prédateurs ou parasites, ou encore des molécules dérivées d'animaux (souvent d'invertébrés) comme les venins d'araignées ou de scorpions

(Vacas *et al.*, 2011 ; Deravel *et al.*, 2014 ; Dominguez *et al.*, 2016). Les ennemis naturels sont très utilisés en lutte biologique (Lomer *et al.*, 2001 ; Fries, 2010 ; Chailleux *et al.*, 2013 ; Shaltiel-Harpaz *et al.*, 2015) et la coccinelle reste l'insecte auxiliaire le plus connu (Alvarez *et al.*, 2012), néanmoins, les nématodes peuvent aussi être utilisés comme entomopathogènes (Batalla-Carrera *et al.*, 2010 ; Campos-Herrera *et al.*, 2015 ; Jaffuel *et al.*, 2017). Les biopesticides d'origine animale sont également des signaux chimiques comme par exemple, les hormones ou phéromones d'insectes. Ces molécules, éphémères ou persistantes mais qui véhiculent un message, sont largement utilisées pour limiter les insectes ravageurs *via* des techniques de piégeage ou de confusion sexuelle (Gaston *et al.*, 1967 ; Weeks *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2017 ; Vaničková *et al.*, 2017).

Les biopesticides végétaux sont des plantes qui produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides. Ainsi, *Tanacetum cinerariaefolium* (*Chrysanthemum*), plus communément appelé pyrèthre présente des principes actifs, appelés pyréthrine qui attaquent le système nerveux de tous les insectes (Deravel *et al.*, 2014). Ce pesticide, biodégradable dans les 24 heures suivant son application, ne laisse aucune trace dans les zones traitées. La pyréthrine peut aussi repousser les insectes et prévenir d'autres attaques (Abreu-Villaça et Levin, 2016). La roténone, naturellement produite par certaines plantes tropicales, entre dans la composition de nombreux pesticides et insecticides (Saravanan *et al.*, 2005). La roténone induit un processus neurodégénératif progressif des neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques mais aussi des dégâts oxydatifs (Milusheva *et al.*, 2005). La nicotine, alcaloïde très toxique, qui se trouve principalement chez les Solanacées (tomates, tabac... etc) présente un mode d'action ressemblant à celui des néonicotinoïdes synthétiques (Isman, 2006). La nicotine imite l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire chez les mammifères, causant des convulsions puis la mort (Tomizawa et Casida, 2003). Les huiles essentielles et leurs dérivés sont également utilisés dans la lutte contre les nuisibles (Machial *et al.*, 2010 ;

Regnault-Roger *et al.*, 2012 ; Pavela et Benelli, 2016) et, tout particulièrement, dans le contrôle des moustiques (Dias et Moraes, 2014 ; Govindarajan et Rajeswary, 2015).

Parmi les pesticides d'origine végétale se trouve l'azadirachtine, triterpénoïde provenant des grains d'*Azadirachta indica*, A. Juss, arbre de la famille des Meliaceae et originaire d'Asie du Sud-Est (Schmutterer, 1990). L'azadirachtine représente le limonoïde actif le plus puissant et constitue l'un des principaux biopesticides commercialisés dans le monde sous plusieurs formulations (Huile de Neem, NeemAzal, Bioneem) (Mordue *et al.*, 2005 ; Isman, 2006 ; Isman et Grieneisen, 2014). L'azadirachtine constitue le pesticide utilisé avec succès dans les agro-écosystèmes (Isman, 2006) et le plus recommandé (Benelli *et al.*, 2017). L'azadirachtine est aussi utilisée dans la médecine traditionnelle, en Asie et en Afrique, comme un antidiabétique, immunostimulant, antimicrobien, antiviral, contraceptif et anticancéreux (Koriem, 2013 ; Hao *et al.*, 2014 ; Hummel *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016). La littérature précise que ce pesticide pouvait interagir avec les récepteurs de l'acide rétinoïque et exercer des réponses anti-inflammatoires et anti-métastatiques dans les lignées cellulaires humaines (Lim, 2014). Plus récemment, l'azadirachtine est également utilisée comme antiacariens pour la literie humaine.

L'azadirachtine possède une forte toxicité contre différents insectes (Mordue *et al.*, 2005 ; Tomé *et al.*, 2013 ; Abedi *et al.*, 2014 ; Dere *et al.*, 2015 ; Poland *et al.*, 2016), une biodégradation rapide (Boeke *et al.*, 2004) et ne pose pas de problème de résistance en raison de sa complexité chimique (Mordue *et al.*, 2005). Ce pesticide naturel est aussi cité comme moins nocif pour l'environnement et les organismes non visés par rapport à la plupart des insecticides conventionnels (Lai *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014). Il est noté comme non-toxique pour les humains et les vertébrés à sang chaud (Salehzadeh *et al.*, 2002) et sans génotoxicité pour les mammifères (Celestino *et al.*, 2014 ; Saxena et Kesari, 2016). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence la toxicité des produits du neem sur des

espèces non visées, mais les résultats restent contradictoires (Banerjee *et al.*, 2014 ; Lima *et al.*, 2015 ; Luna-Cruz *et al.*, 2015 ; Barbosa *et al.*, 2015 ; Turchen *et al.*, 2016 ; Bernardes *et al.*, 2016). En effet, des altérations comportementales et morphologiques ont été mises en évidence chez les abeilles par Barbosa *et al.* (2015) mais ces auteurs ne notent aucun effet sur la mortalité des abeilles ouvrières, le vol, ou encore la respiration ; par ailleurs, chez les organismes aquatiques, l'azadirachtine est utilisé comme un immunostimulant potentiel et un agent prometteur pour le contrôle des parasites de poissons (Banerjee *et al.*, 2014). L'azadirachtine agit, cependant, de manière similaire à un perturbateur du développement (Pener et Dhadialla, 2012) et par conséquent, un impact sur les arthropodes utiles n'est pas à écarter. En effet, l'action majeure de l'azadirachtine résulte dans sa capacité à inhiber les deux principales hormones de la reproduction et du développement, l'HJ et la 20 hydroxyecdysone (20E) induisant des effets délétères sur ces processus physiologiques. L'azadirachtine agit donc de manière similaire à un IGD mais montre, en outre, des effets qui peuvent varier selon sa formulation (Abedi *et al.*, 2014 ; Da Costa *et al.*, 2014).

L'azadirachtine induit des anomalies dans la mue et affecte le développement ovarien, la structure de l'ovocyte, la fécondité, la ponte et la viabilité des œufs chez les diptères et lépidoptères (Mordue *et al.*, 2005 ; Lucantoni *et al.*, 2006 ; Abedi *et al.*, 2014 ; Dembo *et al.*, 2015 ; Evans et Hallett, 2016). De plus, plusieurs études montrent que l'azadirachtine influence le comportement d'oviposition chez plusieurs insectes (Blaney *et al.*, 1990 ; Ma *et al.*, 2000 ; Charleston *et al.*, 2006 ; Cordeiro *et al.*, 2010 ; Hasan et Ansari, 2011 ; Tomé *et al.*, 2013 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016). L'azadirachtine montre aussi une forte cytotoxicité, des effets antimitotiques et induit l'apoptose (Mordue *et al.*, 2005, 2010 ; Huang *et al.*, 2011 ; Qiao *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015 ; Remedio *et al.*, 2015, 2016). Cette molécule peut aussi par des effets antiappétants agir sur le mouvement naturel de l'intestin, provoquant une paralysie et le dépérissement des organismes cibles (Schmutterer et Singh, 1995).

L'azadirachtine affecte, non seulement, le stress, l'immunité (Lynn *et al.*, 2012 ; Koodalingam *et al.*, 2014 ; Shaurub *et al.*, 2014) et la chemoréception (Capinera *et Froeba*, 2007) mais agit aussi sur l'expression des gènes liés au développement chez les insectes *Plodia interpunctella* (Lynn *et al.*, 2012) et *Drosophila melanogaster* (Lai *et al.*, 2014). En outre, il est aussi noté que l'azadirachtine interfère avec le système nerveux central (SNC) par inhibition de la transmission cholinergique excitatrice *via* les canaux calciques (Qiao *et al.*, 2014) mais aussi sur la voie de signalisation de l'insuline (Shao *et al.*, 2016). Cependant, malgré toute la littérature citée, le ou les mécanismes d'action de l'azadirachtine restent encore à définir.

Les connaissances acquises en physiologie, endocrinologie et génétique depuis plus d'un siècle et demi chez *D. melanogaster* représentent une base fondamentale qualitativement appréciable pour une meilleure compréhension des effets et mécanismes d'action des pesticides et de l'azadirachtine en particulier. Cette espèce représente donc un modèle biologique de choix, non seulement pour son utilisation dans la recherche fondamentale et appliquée (toxicologie) mais aussi pour son statut d'insecte non cible en agronomie ; en effet, les impacts de ce pesticide naturel sur d'autres organismes que les ravageurs restent possibles (Barbosa *et al.*, 2015) et doivent faire l'objet d'études spécifiques. Par ailleurs, les effets de l'azadirachtine sur le comportement sont très controversés (Charleston *et al.*, 2006 ; Bruce, 2010 ; Hasan et Ansari, 2011 ; Tomé *et al.*, 2013) et les effets sur la reproduction mériteraient d'être mieux précisés. En effet, certains articles précités notent que l'azadirachtine influence le comportement d'oviposition chez divers insectes, mais son impact sur le comportement sexuel n'est pas assez bien documenté. Par conséquent, cet aspect très connu chez *D. melanogaster* mérite d'être plus profondément examiné après un traitement à l'azadirachtine. Le succès reproducteur chez *D. melanogaster* dépend de plusieurs paramètres qui peuvent être classées en paramètres pré et post-copulatoires. La recherche des femelles par les mâles se fait par l'utilisation de plusieurs stimuli sensoriels qui sont visuels, olfactifs, gustatifs, tactiles,

acoustiques ou mécanosensoriels (Villella et Hall, 2008, Ziegler *et al.*, 2013). L'attractivité sexuelle et la réceptivité de la femelle dépendent de divers processus physiologiques, hormonaux et comportementaux induisant des interactions entre les partenaires sexuels (Hunt *et al.*, 2009 ; Wolfner, 2009). Ainsi, l'exposition à des composés naturels à activité insecticide peut fortement impacter le succès reproducteur *via* l'accouplement. Chez *Drosophila*, ce processus est contrôlé conjointement par le cerveau (Ziegler *et al.*, 2013 ; Lone *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2015) et les voies de signalisation de l'ecdysone, l'HJ et l'insuline (Teseo *et al.*, 2016 ; Wijesekera *et al.*, 2016). De plus, la voie de signalisation des ecdystéroïdes est essentielle pour la synthèse des phéromones (Chiang *et al.*, 2016) et celle de l'HJ permet la régulation de la maturation des phéromones et le comportement d'accouplement chez la femelle (Bilen *et al.*, 2013). Après accouplement, les femelles montrent des réponses postcopulatoires (postmating responses ou PMR) qui consistent en une diminution de la réceptivité sexuelle, une augmentation de l'ovogénèse, une modification dans l'utilisation et le stockage du sperme, dans la ponte et dans la modulation de la régulation de l'HJ (Avila *et al.*, 2011 ; Smith *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015, 2016; Sitnik *et al.*, 2016). Ces PMR sont induits par le fluide séminal transféré par le mâle durant la copulation et qui est, en majorité, constitué par les protéines des glandes accessoires ou Acps (Chen *et al.*, 1988).

Aussi, les objectifs de ce travail seront d'évaluer les effets de l'azadirachtine sur la reprotoxicité de l'azadirachtine et son impact sur le comportement sexuel à travers l'évaluation de divers paramètres comme :

- l'activité des mâles
- le succès à l'accouplement
- différents PMRs (stockage du sperme, ponte et réceptivité de la femelle à un réaccouplement).

Cependant et au préalable, les effets de l'azadirachtine sur la fécondité et la fertilité chez les

mâles et les femelles devront être établis ; par conséquent, les éléments suivants ont été quantifiés :

- survie de la descendance à divers stades du développement (nombre d'œufs, larves, pupes et adultes obtenus par les adultes survivants à la première génération ou F₁)
- fécondité des mâles et des femelles (nombre de cystes avec les anomalies potentielles dans la position des noyaux des spermatocytes, le nombre d'ovocytes et la taille de l'ovocyte basal).

Tous ces paramètres ont été évalués sur des adultes de *D. melanogaster* survivants aux doses induisant 25 et 50% de mortalité (DL₂₅ et DL₅₀ respectivement) ; ces doses sublétales permettent de mimer au mieux une exposition potentielle aux résidus insecticides comme celle que l'on peut prévoir dans le cas d'espèces non cibles. Par conséquent, une étude de toxicité a été tout d'abord menée pour déterminer les doses létales et sublétales dans nos conditions expérimentales.

MATERIEL

ET

METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830) est un insecte Diptère Brachycère (antennes courtes typiquement formées de trois articles). Cette petite mouche jaune brunâtre, à l'abdomen plutôt court et rayé de bandes sombres (Fig. 1), mesure environ 3 ou 4 mm de long, ailes incluses ; elle est hygrophile et lucicole. Un dimorphisme sexuel (Meigen *et al.*, 1830), noté par les paramètres détaillés ci-dessous, permet de différencier les mâles et les femelles :

- **Taille de l'adulte** (inférieure chez les mâles)

- Femelles : 4 mm
- Mâles : 3 mm

- **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 : segments terminaux très foncés

- **Organes sexuels situés à l'extrémité de l'abdomen**

- Femelles : plaque vaginale non colorée
- Mâles : pièces génitales (génitalia) très coloré

- **Peignes sexuels**

- Femelles : Absence de peignes
- Mâles : présents au niveau de la première paire de pattes



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 : Drosophila

Espèce : *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830).

Figure 1. *Drosophila melanogaster* : **A** : femelle ; **B** : mâle.

1.1 Cycle de développement de *D. melanogaster*

D. melanogaster se reproduit très rapidement et de façon continue (cycle de vie court). Au laboratoire, à une température de 25 °C, une nouvelle génération est obtenue tous les 12 jours. Le cycle de développement comprend 4 stades (Fig. 2).

Stade œufs : La femelle pond de 200 à 300 œufs (Demerec, 1950), allongés et blanchâtres (25 à 35 par jour), présentant une forme semblable à un ballon de rugby (0,5 mm de long environ). Dans la nature, les œufs sont déposés sur des fruits ou autres matières humides en fermentation (Demerec, 1950).

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, de 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 recherche de support pour s'empuper. A son terme, les larves secrètent une glue et se fixent.

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 4 à 5 jours environ à 25°C. À son terme, toutes les structures larvaires sont détruites ou remaniées et les structures adultes sont élaborées (Quinn *et al.*, 2012, [Fig. 3](#)).

Stade adulte : l'adulte apparaît avec un corps non pigmenté mais au bout de 6 à 8 heures la pigmentation est achevée et les ailes sont déployées et rigidifiées. Les femelles sont fécondables et peuvent s'accoupler dès 12 heures après l'émergence. 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 (Demerec, 1950).

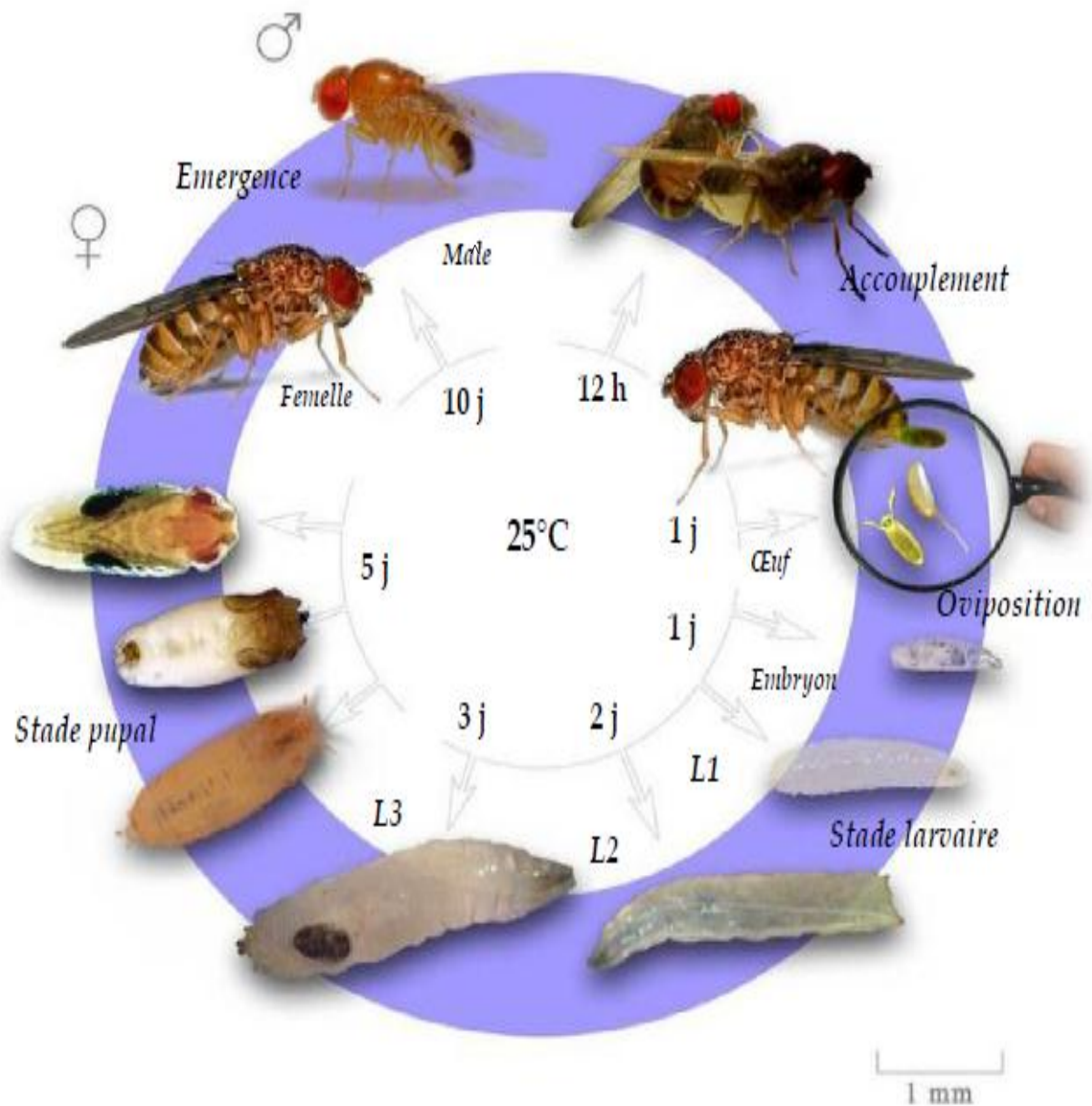


Figure 2. Le cycle de développement de *D. melanogaster* à 25°C (Weigmann *et al.*, 2003).

Source : (<http://zookeepers.livejournal.com/>).

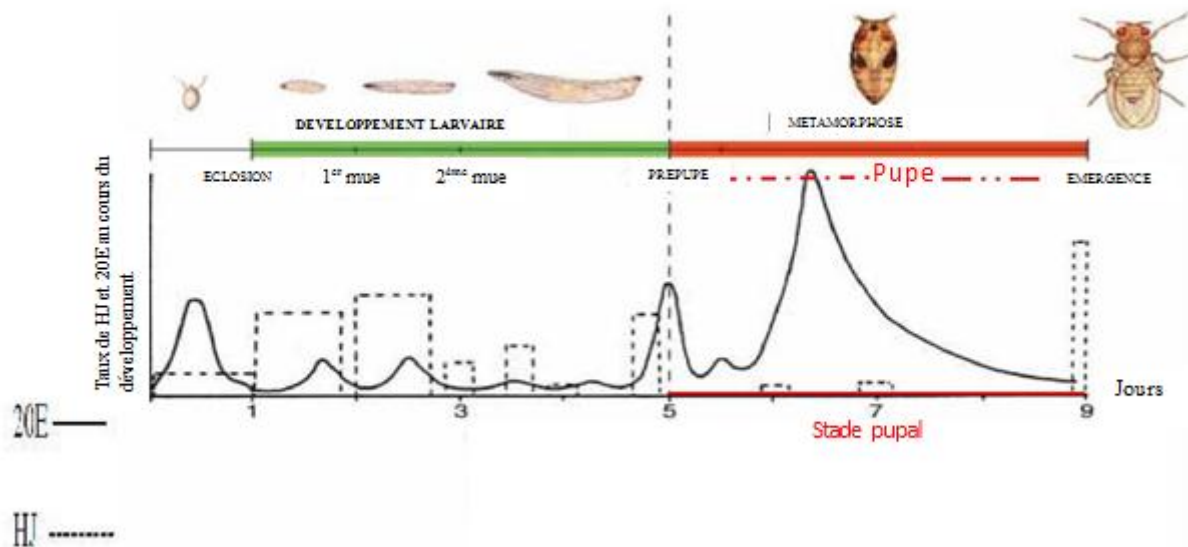


Figure 3. Taux d’HJ et de 20E au cours du développement de *D. melanogaster* (Dubrovsky, 2005). La 20 E initie toutes les mues, de la larve L₁ à la larve L₃, de la larve à la nymphe et de la nymphe à l’adulte tandis que l’HJ détermine la nature de mue.

1.2 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 dans de nombreux domaines de recherche et notamment en génétique, biologie moléculaire et toxicologie par des milliers (80 000 à 100 000) de chercheurs dans le monde (Colombani *et al.*, 2006).

L’élevage de *D. melanogaster* est réalisé, en laboratoire dans une étuve, à une température de 25°C, une hygrométrie de 70% et une scotophase de 12 h. La souche utilisée est Canton S (souche donnée gracieusement par C. Wickers Thomas, Laboratoire Evolution, Génomes, Comportements et Ecologie, CNRS, IRD, Université 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 (apport des acides aminés essentiels, protéines, vitamines : B1, B3, B6, B9 et oligoéléments assimilables : calcium, fer, magnésium, zinc, sélénium,

potassium). 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 (methyl-hydroxy-4- benzoate à 10%). Les drosophiles sont élevées dans des flacons de plastique et bouchés par un tampon de mousse (Fig. 4).



Figure 4. Elevage de *D. melanogaster* au laboratoire.

2. Présentation de l'insecticide et traitement

L'azadirachtine commercialisée sous le nom de Neem-Azal-T/S comprend 1% de matière active (Emulsion Concentrée (EC); firme : Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany) (Fig. 5) ; cette formulation, correspond à un liquide brun avec une odeur caractéristique du Neem. Après ouverture, la solution est conservée au frais et à l'abri de la lumière. Selon l'entreprise SIPCAM INAGRA spécialisé dans la protection des végétaux l'azadirachtine est utilisé en Algérie sous le nom de Bioaza depuis 1991 jusqu'à aujourd'hui, il est homologué aux USA depuis 1999 (USUPA) et en Europe depuis le 21 octobre 2013 (Journal officiel de l'union européenne) mais en France il n'est pas autorisé car aucune demande officielle d'autorisation n'a été déposée pour cette molécule (JO Sénat du 07/08/2014).

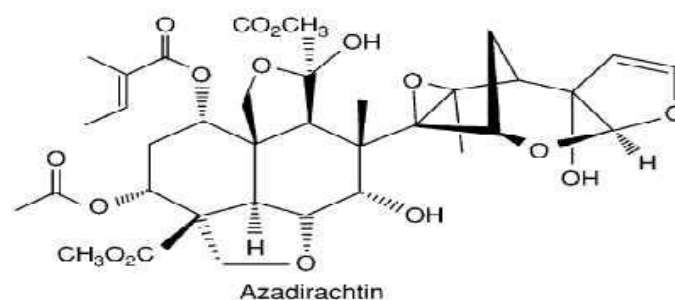


Figure 5. Structure chimique de l'azadirachtine

3. Tests de toxicité

Le Neem-Azal a été testé par application topique (1 μ l ; Di Prisco *et al.*, 2013), le jour de l'émergence des adultes (< 6 heures post-émergence). L'insecticide a été dilué dans l'acétone (solvant) et différentes solutions stocks ont été préparées. Après un screening préalable, les concentrations retenues et utilisées sont de 100, 200, 400, 600, 1200 ppm correspondant respectivement aux doses 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 μ g (Boulahbel *et al.*, 2015 ; Bezzar-Bendjazia, 2016). L'essai est conduit, pour chaque dose, en utilisant 3 réplications comportant chacune 300 insectes ; une série témoin est conduite en parallèle avec des individus qui reçoivent uniquement l'acétone (1 μ l). L'acétone permet, par rapport à l'eau, une meilleure diffusion à travers la cuticule qui est constituée, extérieurement de cires et de lipides (épicuticule).

Pour les différentes séries, les pourcentages de mortalités observées ont été déterminés à 24, 48, 72, 96, 120 et 144 heures puis corrigés selon la formule d'Abbott (1925) afin d'éliminer la mortalité naturelle. Les pourcentages de mortalité corrigée subissent ensuite une transformation angulaire selon les tables de Bliss (1938), citées par Fisher et Yates (1957) puis font l'objet d'une analyse de la variance à deux critères de classification afin d'évaluer les effets du pesticide et du temps. Le test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey permet le classement des doses puis une régression non linéaire, exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme de la dose, précise les doses létales (DL) des adultes ; ainsi les doses entraînant 10, 25, 50 et 90% de mortalité (DL₁₀, DL₂₅, DL₅₀ et DL₉₀)

ont été déterminées avec leurs intervalles de confiance. La DL₅₀ à 24 heures a été utilisée pour toutes les expérimentations, néanmoins la DL₂₅, a également été utilisée pour évaluer la fertilité et le suivi du développement des descendants en F₁.

4. Fertilité et suivi du développement à la génération 1 (F₁)

Les adultes de *D. melanogaster* nouvellement émergés (< 6 heures) ont été traités avec le Neem-Azal aux DL₂₅ et DL₅₀. Les mâles et femelles des séries témoins (solvant seul) et traitées, dont les individus ont survécu au traitement, ont été placés séparément dans des boîtes de pétri contenant un milieu nutritif. Les adultes sont ensuite réunis en couple selon différentes combinaisons (voir ci-dessous). Après 48 heures, les adultes ont été retirés des boîtes de pétri et la descendance a été comptée. Le suivi de la F₁ a été effectué quotidiennement et ce jusqu'à l'émergence de tous les adultes. Le nombre d'œufs, de larves de dernier stade (L3), de pupes et d'adultes provenant de chaque série de couples a été compté.

Les différents couples réalisés sont les suivants :

Couples 1 : Mâles Témoins x Femelles Témoins - $M_T + F_T$

Couples 2 : Mâles DL₂₅ x Femelles Témoins - $M_{25} + F_T$

Couples 3 : Mâles Témoins x Femelles DL₂₅ - $M_T + F_{25}$

Couples 4 : Mâles DL₅₀ x Femelles Témoins - $M_{50} + F_T$

Couples 5 : Mâles DL₂₅ x Femelles DL₂₅ - $M_{25} + F_{25}$

Couples 6 : Mâles Témoins x Femelles DL₅₀ - $M_T + F_{50}$

Couples 7 : Mâles DL₅₀ x Femelles DL₅₀ - $M_{50} + F_{50}$

5. Fécondité des mâles

Des facteurs liés à l'infertilité des mâles ont été évalués. Le nombre de cystes et la

localisation des noyaux des spermatocytes (anomalies postméiotiques), deux paramètres pouvant influencer la production spermatique (Lindsley et Tokuyasu, 1980) ont été examinés. Les mâles ont été traités au Neem-Azal à la DL₅₀ à 24 heures, le jour de l'émergence (< 6 heures) puis les individus des séries témoins (solvant seul) et traitées ont été placés dans des tubes contenant un milieu nutritif. Après 48 heures, les testicules des mâles qui ont survécu au traitement sont disséqués dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) et de 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) permettant la coloration des noyaux selon la méthode de Montchamp-Moreau et Joly (1997). Les cystes, étalés sur une lame et recouverts par une lamelle, ont ensuite été observés sous microscope à fluorescence. Le nombre de cystes par mâle a été compté et la position des noyaux des spermatocytes a été précisée. Trente répétitions par condition ont été réalisées.

6. Fécondité des femelles

Pour détecter un impact possible de l'azadirachtine sur la fécondité des femelles, les paramètres ovariens classiques ont été examinés comme le nombre d'ovocytes et le volume de l'ovocyte basal. Les femelles nouvellement émergées (< 6 heures), ont été traitées avec le Neem-Azal à la DL₅₀ à 24 heures. Les individus des séries témoins (solvant seul) et traitées ont été placés dans des tubes contenant un milieu nutritif. Après 48 heures, les individus ayant survécu au traitement ont été disséqués et les ovaires prélevés après déplacement du corps gras circumovarien. L'observation sous loupe binoculaire muni d'un micromètre a permis de compter le nombre d'ovocytes et de mesurer la longueur et la largeur afin de compter le volume de l'ovocyte basal ; ces deux paramètres mesurés ont ensuite été utilisés pour la détermination du volume selon la formule de Lumbreras *et al.* (1991).

7. Evaluation des accouplements

Les mâles et les femelles nouvellement émergés (< 6 heures) ont été séparés et traités avec le Neem-Azal à la DL₅₀ à 24 heures. Les mâles et femelles des séries témoins (solvant seul : M_T, F_T) et traitées (M₅₀, F₅₀) ont été placés séparément dans des tubes contenant un milieu nutritif. Après 48 heures, les mâles et les femelles qui ont survécu au traitement ont été testées afin de compter le nombre d'accouplement dans les conditions de choix et non choix.

Dans la condition de non choix, un mâle et une femelle ont été placés ensemble dans des tubes individuels avec de la nourriture et quatre conditions ont été testées : M_T + F_T; M_T + F₅₀; M₅₀ + F_T; M₅₀ + F₅₀.

Dans les conditions de choix, un mâle et deux femelles (choix du mâle) et une femelle et deux mâles (choix de la femelle) ont été placés ensemble dans des tubes individuels ; quatre conditions ont été testées : M_T + F_T/F₅₀; M₅₀ + F_T/F₅₀; F_T + M_T/M₅₀; F₅₀ + M_T/M₅₀.

Avant le traitement, les mouches ont été anesthésiées sur la glace et marquées par un trou minuscule sur la partie postérieure de l'aile droite fait avec une aiguille sous une loupe binoculaire. Cette procédure de marquage permet de différencier les mouches traitées des mouches non traitées. L'analyse statistique effectuée au préalable n'a montré qu'il n'y a aucun effet du marquage (test t de student, $p > 0,11$ dans la condition du choix de la femelle F₅₀ + M_T/M₅₀ ; n=78). L'observation des accouplements a été réalisée le matin et pendant 3 heures. Le nombre d'accouplement est exprimé en pourcentages.

8. Mobilité des mâles

Pour mettre en évidence l'impact du Neem-Azal sur l'activité des mâles, un des paramètres essentiels pour le succès à l'accouplement, leur mobilité a pu être évaluée grâce à l'utilisation d'un actimètre tubulaire (Fig. 6) généralement utilisé pour contrôler des rythmes d'activité locomotrice chez les drosophiles (*Drosophila* Activité Moniteur ou DAM2-5,

Trikinetics, Waltham, MA, USA). L'actimètre contient 32 trous dans lesquels sont glissés des tubes en verre ouverts aux deux extrémités. D'un côté du tube, le milieu nutritif est déposé puis l'extrémité est refermée avec de la paraffine ; de l'autre côté, l'insecte mâle est introduit puis l'extrémité est refermée avec du coton. Le tube est ensuite introduit dans l'actimètre et un signal infrarouge apparaît à chaque fois que le mâle passe au centre. Le nombre de passages est ensuite noté par un compteur automatique (DAMSystem) lié à un ordinateur.

Les mâles nouvellement émergés (< 6 heures) ont été séparés et traités par application topique au Neem Azal à la DL_{50} (0.63 μg). Les mâles des séries témoins (solvant seul) et traitées ont été placés, séparément, dans des tubes contenant un milieu nutritif. Après 48 heures, les mâles ayant survécu au traitement et les mâles témoins (solvant seul) ont été introduits dans les actimètres puis leur mobilité a été évaluée pendant 8 jours.

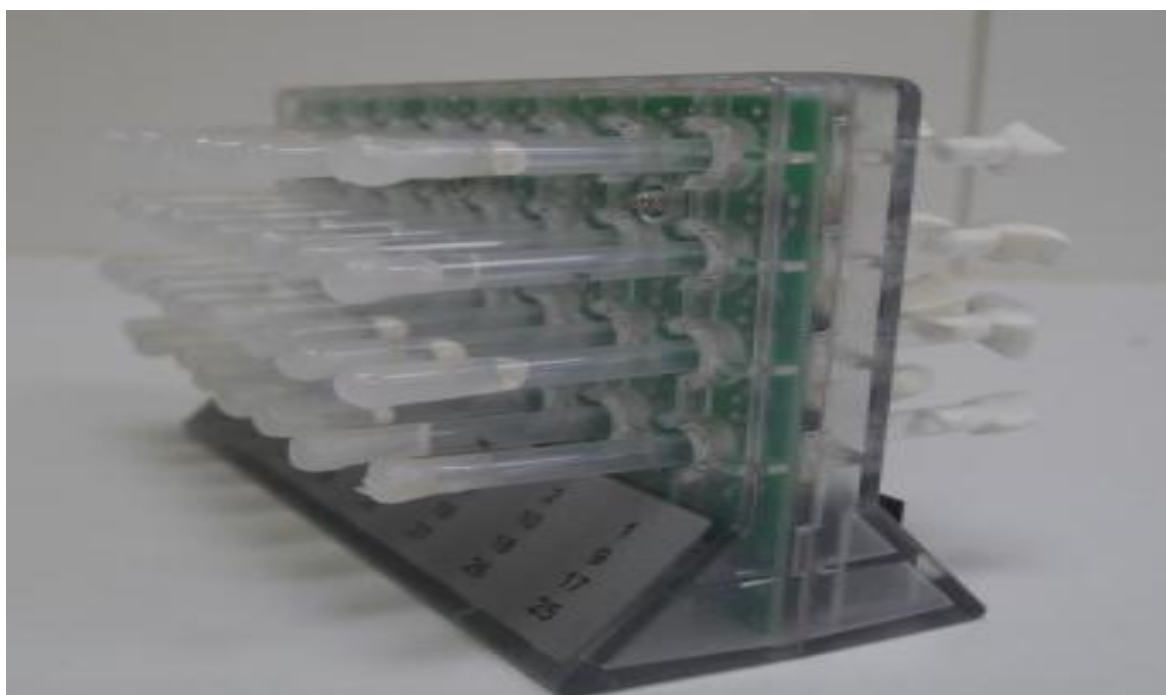


Figure 6. Photo de l'actimètre tubulaire

9. Stockage des spermatozoïdes chez les femelles

L'effet du Neem-Azal sur le succès du stockage des spermatozoïdes a été quantifié dans les voies génitales femelles au niveau du réceptacle ventral et de la spermathèque. Les adultes nouvellement émergés (< 6 heures) ont été séparés et traités par application topique au Neem Azal à la DL_{50} à 24 heures. Les mâles et les femelles des séries témoins (solvant seul) et traitées ont été placés, séparément, dans des tubes contenant un milieu nutritif. Après 48 heures, les mâles et femelles qui ont survécu au traitement ont été réunis et quatre conditions d'accouplement ont été testées : $M_T + F_T$; $M_T + F_{50}$; $M_{50} + F_T$; $M_{50} + F_{50}$. Trois heures après l'accouplement, les femelles sont congelées (pour arrêter la progression des spermatozoïdes) puis disséquées sous loupe binoculaire. Le nombre de femelle avec des spermatozoïdes au niveau de la spermathèque et/ou du réceptacle ventral a été noté et les résultats sont exprimés en pourcentage.

10. Réceptivité sexuelle des femelles

Le Neem-Azal a été testé sur la réceptivité des femelles afin de mettre en évidence, après un premier accouplement, leur capacité à se réaccoupler avec des mâles traités ou non. L'hypothèse testée est que les mâles traités peuvent avoir des troubles séminaux affectant la réceptivité sexuelle des femelles. Les adultes nouvellement émergés (< 6 heures) ont été séparés et traités par application topique au Neem Azal à la DL_{50} à 24 heures. Les individus des séries témoins (solvant seul) et traitées ont été placés, séparément, dans des tubes contenant un milieu nutritif.

Après 48 heures, les mâles et femelles qui ont survécu au traitement ont été réunis et quatre conditions d'accouplement ont été testées : $M_T + F_T$; $M_T + F_{50}$; $M_{50} + F_T$; $M_{50} + F_{50}$. Sept jours après le premier accouplement, un nouveau mâle âgé de quatre jours est proposé à la femelle pour un réaccouplement (Wolfner, 1997). Les réaccouplements ont été observés et le nombre

de femelles réaccouplées est exprimé en pourcentages.

11. Stérilité des femelles

Les adultes nouvellement émergés (< 6 heures) ont été séparés et traités par application topique au Neem-Azal à la DL_{50} à 24 heures. Les individus des séries témoins (solvant seul) et traitées ont été placés, séparément, dans des tubes contenant un milieu nutritif. Après 48 heures, les mâles et femelles qui ont survécu au traitement ont été réunis et quatre conditions d'accouplement ont été testées : $M_T + F_T$; $M_T + F_{50}$; $M_{50} + F_T$; $M_{50} + F_{50}$. Deux jours après, le nombre de femelles avec ou sans œufs a été noté et les résultats sont exprimés en pourcentage de femelles stériles.

12. Analyse statistique

La moyenne et l'écart type (ET) est calculée pour chaque groupe d'expérience n'utilisant pas des proportions ; pour ces dernières, ce sont les intervalles de confiance à 95% qui sont précisés. La normalité et l'égalité des variances ont été confirmées, respectivement grâce aux tests de Shapiro-Wilk et de Brown-Forsythe avant l'utilisation des tests paramétriques ou non paramétriques. La régression non linéaire utilisant une courbe dose réponse sigmoïdale exprimant le pourcentage des mortalités enregistrées en fonction des logarithmes des doses a permis d'estimer les différentes doses létales (Sadeghi *et al.*, 2009).

L'analyse de la variance à deux critères de classification a été utilisée pour la toxicité afin de préciser l'effet « dose » et l'effet « temps » du pesticide. L'analyse à un critère de classification suivie du test HSD de Tukey a été effectuée pour la toxicité et le suivi de la descendance afin de classer les effets « traitement ». L'analyse de la variance (ANOVA) à mesures répétées a également été réalisée pour le suivi de la descendance afin d'évaluer au sein d'un même couple les différences entre les stades. Le nombre de cystes, d'ovocytes, le

volume de l'ovocyte basal et l'effet sur le marquage des ailes ont été comparé entre les groupes traités et témoins utilisant le test « t » de Student. Les données enregistrées pour les expériences d'accouplement, du stockage de sperme, de réaccouplement et de stérilité des femelles sont dichotomiques (0 et 1). La plupart de ces expériences contient un groupe témoin ($M_T + F_T$) dans lequel ni le mâle ni la femelle étaient traités et trois groupes de test dans lesquels au moins un sexe a été traité : $M_{50} + F_T$, $M_T + F_{50}$ et $M_{50} + F_{50}$. Dans ces expériences, chaque groupe traité a été comparé au groupe témoin utilisant le test exact de Fisher. Dans les deux expériences du choix d'accouplement, les insectes avaient un choix entre un individu traité et un individu non traité du sexe opposé. Le succès d'accouplement, défini comme la proportion d'essais dans lesquels l'animal accouplé avec un des animaux de choix, a été comparé entre les groupes utilisant le test exact de Fisher. Dans chaque groupe, les proportions d'accouplement avec l'individu témoin et traité ont été comparées à une distribution théorique de 50 % en utilisant le test exact binomial.

Dans l'expérience évaluant l'activité du mâle, le système permet de quantifier le nombre de passages par mâle et par jour. Pour l'analyse statistique, les données sont transformées en racine carrée pour tester la normalité (en utilisant le test de Shapiro-Wilk's) et l'homoscédasticité (testée en utilisant le test de Brown-Forsythe's). Ainsi, l'ANOVA à mesures répétées a été utilisée sur les données transformées, avec le « jour » comme mesure répétée et le « traitement » comme facteur entre groupes. 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, Statistica 10 (Statsoft) et R 3.3.1 (R DevelopmentCore Team, 2008).

RESULTATS

RESULTATS

1. Toxicité du Neem-Azal sur la mortalité des adultes

L'efficacité du Neem-Azal, a été testée par application topique chez les adultes nouvellement émergés de *D. melanogaster*. La mortalité a été relevée à différents temps 24, 48, 72, 96, 120 et 144 heures après l'émergence des adultes.

Les pourcentages de mortalité obtenus ont ensuite permis de déterminer les doses létales caractérisant la toxicité d'un insecticide correspondant à 10, 25, 50 et 90% de la mortalité des adultes (DL_{10} , DL_{25} , DL_{50} et DL_{90}).

1.1 Toxicité du Neem-Azal à 24 heures

Le traitement avec le Neem-Azal, à différentes doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 μ g), a induit une mortalité des adultes dont les pourcentages sont précisés dans le [tableau 1](#).

La mortalité des adultes, de l'ordre de $5,48 \pm 0,53\%$ chez les témoins (mortalité naturelle) augmente, chez toutes les séries traitées ; ainsi, il est noté, à 24 heures, un pourcentage de mortalité observée qui est 3 fois plus élevé à la dose la plus faible et 13 fois plus à la dose la plus forte.

Les pourcentages de mortalité observées chez les séries traitées ont été ensuite corrigées par la formule d'Abbott (1925) afin d'éliminer la mortalité naturelle ([Tab. 2](#)). Les résultats de la mortalité corrigée montrent des pourcentages qui présentent des valeurs 2 fois plus élevées à la dose la plus faible (0,1 μ g) et 13 fois plus à la dose la plus forte (1,2 μ g).

Tableau 1 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité observée (%) des adultes à 24 heures (m : moyenne $\pm$ ET : erreur standard ; R = répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	5,14	19,45	26,06	38,56	45,60	76,66
R2	5,20	18,82	32,35	38,34	46,94	71,75
R3	6,10	17,67	32,21	38,36	46,31	71,66
m $\pm$ ET	5,48 $\pm$ 0,53	18,64 $\pm$ 0,90	30,20 $\pm$ 3,59	38,42 $\pm$ 0,12	46,58 $\pm$ 0,67	73,35 $\pm$ 0,60

Tableau 2 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité corrigée (%) des adultes à 24 heures (m $\pm$ ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	15,08	22,05	35,23	42,65	75,39
R2	14,36	28,63	34,95	44,02	70,20
R3	12,32	27,80	34,35	42,82	69,81
m $\pm$ ET	13,92 $\pm$ 1,43	26,16 $\pm$ 3,58	34,84 $\pm$ 0,44	43,16 $\pm$ 0,74	71,80 $\pm$ 3,11

1.2 Toxicité du Neem-Azal à 48 heures

Le traitement avec le Neem-Azal, à différents doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 μg) le jour de l'émergence adulte de *D. melanogaster*, induit une mortalité des adultes de l'ordre de 5,85 $\pm$ 0,83 % chez les témoins (mortalité naturelle) mais qui augmente progressivement chez les séries traitées (Tab. 3). Après 48 heures de traitement, il est noté un pourcentage de mortalité observée qui a été multipliée par 3 pour la dose la plus faible et par 12 pour la dose la plus élevée.

Les pourcentages de mortalité observée chez les séries traitées ont été corrigés de la même façon que précédemment (Tab. 4) ; la valeur obtenue dans les pourcentages de mortalité est 2 fois plus importante à la dose la plus faible (0,1 µg) mais 11 fois plus à la dose la plus élevée (1,2 µg).

Tableau 3 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité observée (%) des adultes à 48 heures (m ± ET ; R= 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	6,66	20	29,99	33,30	45	71,58
R2	5,91	20,17	27,61	39,97	48,58	71,56
R3	4,99	22,52	26,83	40	43,93	72,53
m ± ET	5,85±0,83	20,89±1,40	28,14±1,64	37,75±3,85	45,83±2,43	71,89±0,55

Tableau 4 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité corrigée (%) des adultes à 48 heures (m ± ET ; R= 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	14,29	24,99	28,54	41,07	68,81
R2	15,15	23,06	36,19	45,35	69,77
R3	18,45	22,98	36,84	40,98	71,08
m ± ET	15,96±2,19	23,67±1,13	33,85±4,61	42,46±2,49	69,88±1,13

1.3 Toxicité du Neem-Azal à 72 heures

Le traitement avec le Neem-Azal, à différents doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 µg) le jour

de l'émergence adulte de *D. melanogaster*, induit une mortalité des adultes dont les pourcentages sont précisés dans le [tableau 5](#).

La mortalité des adultes, est de $5,89 \pm 0,88$ % chez les témoins (mortalité naturelle) puis augmente graduellement chez les séries traitées ; ainsi, il est noté un pourcentage de mortalité observée qui a été multipliée par 3 pour la dose la plus faible et par 12 pour la dose la plus élevée.

Après correction de la mortalité naturelle, les pourcentages de mortalités corrigées, présentés dans le [tableau 6](#) sont 2 fois plus élevés à 0,1 μg et 12 fois plus à 1,2 μg .

Tableau 5 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité observée (%) des adultes à 72 heures ($m \pm \text{ET}$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	5,11	17,77	32,56	40	47,33	69,04
R2	6,85	19,45	31,74	33,33	44,66	68,71
R3	5,71	22,04	32,81	43,33	48,32	78,88
m $\pm$ ET	5,89$\pm$0,88	19,75$\pm$2,15	32,37$\pm$0,55	38,88$\pm$5,09	46,77$\pm$1,89	72,21$\pm$5,77

Tableau 6 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité corrigée (%) des adultes à 72 heures ($m \pm \text{ET}$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	13,34	28,92	36,76	44,49	67,37
R2	13,52	26,72	28,42	40,59	66,40
R3	17,31	28,74	39,89	45,19	77,60
m $\pm$ ET	14,72$\pm$2,24	28,12$\pm$1,22	35,02$\pm$5,92	43,42$\pm$2,47	70,45$\pm$6,20

1.4 Toxicité du Neem-Azal à 96 heures

Le traitement avec le Neem-Azal, à différents doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 μg) le jour de l'émergence adulte de *D. melanogaster*, induit une mortalité des adultes dont les pourcentages sont précisés dans le [tableau 7](#). Les pourcentages de mortalité observée à 96 heures, de l'ordre de $5,84 \pm 2,42$ % chez les témoins, ont été multipliés par 3 à 0,1 μg et par 12 à 1,2 μg .

Les valeurs dans les pourcentages de mortalité corrigée et présentés dans le [tableau 8](#) sont 2 fois plus hautes à 0,1 μg 12 fois plus à 1,2 μg .

Tableau 7 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité observée (%) des adultes à 96 heures. ($m \pm \text{ET}$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	8,33	21,02	29,99	36,66	41,53	71,58
R2	3,49	18,68	36,75	36,19	51,37	70,52
R3	5,71	19,27	29,52	43,33	48,89	72,85
m $\pm$ ET	5,84$\pm$2,42	19,65$\pm$1,21	32,08$\pm$4,04	38,72$\pm$3,99	47,26$\pm$5,11	71,65$\pm$1,16

Tableau 8 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité corrigée (%) des adultes à 96 heures ($m \pm \text{ET}$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	13,84	23,62	30,90	36,21	68,99
R2	15,73	34,46	33,88	49,61	69,45
R3	14,38	25,25	39,89	45,79	71,20
m $\pm$ et	14,65$\pm$0,97	27,77$\pm$5,84	34,89$\pm$4,57	43,87$\pm$6,90	69,88$\pm$1,16

1.5 Toxicité du Neem-Azal à 120 heures

Le traitement avec le Neem-Azal, à différents doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 μg) le jour de l'émergence adulte de *D. melanogaster*, induit une mortalité des adultes dont les pourcentages sont précisés dans le [tableau 9](#). La mortalité observée chez les adultes est de l'ordre de $5,58 \pm 1,33\%$ chez les témoins. Ce pourcentage de mortalité naturelle augmente chez les séries traitées, en fonction des doses et il a été multiplié par 12 à la dose la plus élevée. Les pourcentages de mortalités corrigées ([Tab. 10](#)), calculés afin d'éliminer la

mortalité naturelle, sont deux fois plus importants par 2 à la dose la plus faible (0,1 µg) et 12 fois plus à la dose la plus élevée (1,2 µg).

Tableau 9 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité observée (%) des adultes à 120 heures (m ± ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	5,71	18,25	27,61	40	44,06	69,83
R2	4,18	16,66	35,89	33,96	48,84	69,07
R3	6,85	21,53	34,22	43,33	48,89	75,62
m ± ET	5,58±1,33	18,81±2,48	32,57±4,37	39,09±4,74	47,26±2,77	71,50±3,58

Tableau 10 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (µg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité corrigée (%) des adultes à 120 heures (m ± ET ; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	13,29	23,22	36,36	40,67	68
R2	13,02	33,09	31,07	46,60	67,72
R3	15,75	29,38	39,16	45,13	72,82
m ± et	14,02±1,50	28,56±4,98	35,53±4,10	44,13±3,08	69,51±2,86

1.6 Toxicité du Neem-Azal à 144 heures

Le traitement avec le Neem-Azal, à différents doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 µg) le jour de l'émergence adulte de *D. melanogaster*, induit une mortalité des adultes dont les pourcentages sont précisés dans le [tableau 11](#). Le pourcentage de mortalité naturelle qui est de

l'ordre de $5,80 \pm 0,33$ % chez les témoins ont été multipliés par 12 chez les séries traitées à la dose la plus forte.

Après suppression de la mortalité naturelle, les pourcentages de mortalité corrigés présentés dans le [tableau 12](#) montrent chez les séries traitées une valeur qui est deux fois plus élevée à $0,1 \mu\text{g}$ et 12 fois plus à la dose la plus forte ($1,2 \mu\text{g}$).

Tableau 11 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité observée (%) des adultes à 144 heures ($m \pm \text{ET}$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	Témoins	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	5,71	18,80	29,99	37,61	45,60	69,39
R2	6,18	17,02	35,89	40	49,80	68
R3	5,52	21,53	31,23	37,77	46,39	77,01
m $\pm$ ET	5,80$\pm$0,33	19,11$\pm$2,27	32,37$\pm$3,11	38,46$\pm$1,33	47,26$\pm$2,23	71,46$\pm$4,85

Tableau 12 : Effets du Neem-Azal administré, *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster* : mortalité corrigée (%) des adultes à 144 heures. ($m \pm \text{ET}$; R = 3 répétitions de 300 individus chacune).

Répétitions	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2
R1	13,88	25,75	33,83	42,30	67,53
R2	11,55	31,66	36,04	46,49	65,89
R3	16,94	27,21	34,13	43,25	75,66
m $\pm$ et	13,85$\pm$2,29	28,20$\pm$3,07	34,66$\pm$1,19	44,01$\pm$2,19	69,69$\pm$5,23

1.7 Détermination des doses létales pour le Neem-Azal

Les valeurs de mortalité obtenues à 24, 48, 72, 96, 120 et 144 heures ne révèlent, après analyse statistique, aucun effet du temps après traitement avec le Neem-Azal (Tab. 13).

En effet, l'ANOVA à deux facteurs de classification (temps et traitement) révèle un effet comparable entre 24 heures et 144 heures ($F_{5, 60} = 1.05$; $p = 0.39$) mais un effet dose hautement significatif pour les différents temps testés ($F_{4, 60} = 343,2$; $p < 0,0001$; Tab. 13).

Par conséquent, les doses létales seront déterminées seulement à 24 heures.

Tableau 13 : Analyse de la variance à deux facteurs de la toxicité du Neem-Azal, administré par application topique, le jour de l'émergence, à différentes doses (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 1,2 µg) et différents temps (24, 48, 72, 96, 120, 144 heures) chez *D. melanogaster*

Source de variation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Temps	49,86	5	9,97	1,05	0,39
Traitement	13018	4	32,54	343,2	0,0001***
Interaction	214,9	20	10,74	1,13	0,34
Erreur résiduelle	568,9	60	9,48	-	-
Total	13852	89	-	-	-

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

Les valeurs des pourcentages de mortalité obtenues à 24 heures subissent une analyse de variance à un critère de classification suivie d'un test posthoc (test HSD de Tukey) permettant de préciser l'effet du pesticide avec un classement des doses (Tab. 14). L'ANOVA révèle une relation dose-réponse avec une différence hautement significative ($p < 0,0001$) et le test HSD de Tukey met en évidence 5 groupes de doses qui révèlent une toxicité significativement différente du pesticide (Fig.7) ; ainsi une toxicité accrue est observée en fonction des doses croissantes du pesticide : $0,1 \mu\text{g} < 0,2 \mu\text{g} < 0,4 \mu\text{g} < 0,6 \mu\text{g} < 1,2 \mu\text{g}$.

Tableau 14 : Analyse de variance a un facteur de classification de l'effet du Neem-Azal, administrée *in vivo*, par application topique à différentes doses (μg) le jour de l'émergence adulte chez *D. melanogaster*, sur la mortalité des adultes après 24 heures de traitement.

Source deVariation	SCE	ddl	CM	Fobs	P
Traitement	1958	4	489,5	62,43	0,0001***
Erreur résiduelle	78,41	10	7,84	-	-
Total	2036	14	-	-	-

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

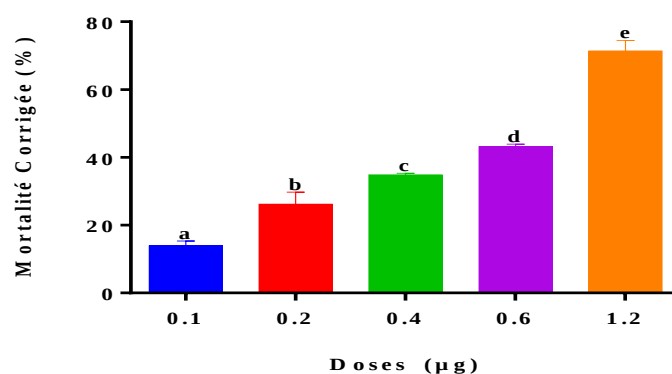


Figure 7. Mortalité corrigée (%) des adultes 24 heures après application du Neem-Azal et classement des doses testées par le test HSD de Tukey. Les lettres différentes indiquent la présence d'une différence significative entre les doses.

Une régression non linéaire a permis d'obtenir la courbe dose-réponse chez les adultes *D. melanogaster* ; cette courbe, exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme de la dose du Neem-Azal présente un coefficient de détermination élevé ($R^2=0,96$) ; cette valeur révèle une liaison très forte entre le pourcentage de mortalité corrigée et le logarithme de la dose (Fig. 8). Cette analyse permet également l'obtention des valeurs des différentes doses létales ainsi que leurs intervalles de confiance ; ainsi, à 24 heures, les DL_{25} et DL_{50} sont de l'ordre de 0,23 [0,13-0,38] et 0,63 µg [0,44 -0,91] respectivement (Tab. 15).

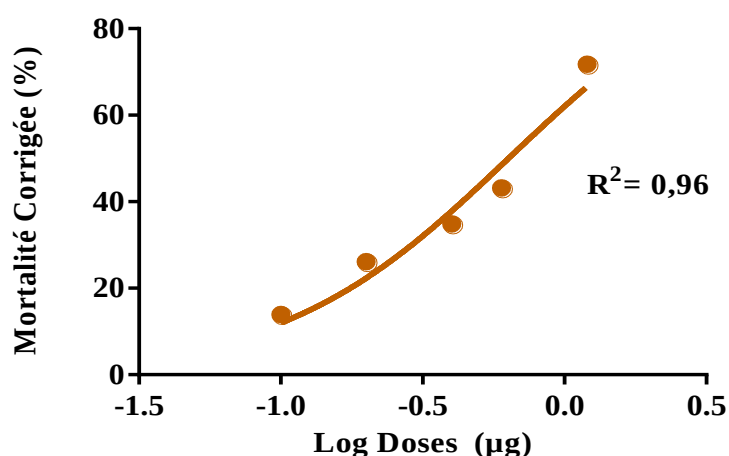


Figure 8. Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée à 24 heures en fonction du logarithme de la dose du Neem-Azal (µg).

Tableau 15 : Détermination des différentes doses létales (DL) 24 heures après application du Neem-Azal (µg) avec leurs intervalles de confiance à 95%.

	Valeur (µg)	Intervalle de confiance
DL ₁₀	0,08	[0,03 – 0,21]
DL ₂₅	0,23	[0,13 – 0,38]
DL ₅₀	0,63	[0,44 – 0,91]
DL ₉₀	4,85	[1,47 – 15,98]
Hill slope	1,08	[0,54 – 1,61]
Erreur standard	0,17	

2. Effets du Neem-Azal sur les différents stades de la descendance ou F₁

Les adultes *D. melanogaster* ont été traités le jour de l'émergence puis les survivants ont été accouplées dans des boîtes de pétri en procédant à différentes combinaisons entre les mâles et femelles témoins et traités aux deux doses (cf, matériel et méthodes). Au bout de 48 heures et après retrait de tous les couples, la génération 1 ou F₁ est suivie quotidiennement. L'effet du Neem-Azal a pu être évalué en procédant au comptage du nombre d'œufs, de

larves (L3), de pupes et d'adultes pour chaque série.

Chez les séries témoins le nombre d'œufs pondus est de $81,37 \pm 3,24$. Après traitement ce nombre diminue et atteint des valeurs respectives de $53,87 \pm 5,91$; $48,37 \pm 7,15$; $32,62 \pm 6,52$; $32,62 \pm 8,24$; $23,50 \pm 3,92$; $20,25 \pm 2,25$ pour les couples $M_{25} + F_T$; $M_T + F_{25}$; $M_{50} + F_T$; $M_{25} + F_{25}$; $M_T + F_{50}$; $M_{50} + F_{50}$ (Tab. 16).

Le nombre de larves, chez les témoins, est de $75,50 \pm 7,57$. Chez tous les individus traités, ce nombre diminue et atteint des valeurs respectives de $52,25 \pm 6,49$; $44,50 \pm 7,57$; $32,50 \pm 4,10$; $31,87 \pm 6,46$; $23,00 \pm 5,60$; $19,50 \pm 4,47$ pour les couples $M_{25} + F_T$; $M_T + F_{25}$; $M_{50} + F_T$; $M_{25} + F_{25}$; $M_T + F_{50}$; $M_{50} + F_{50}$ (Tab. 16).

Pour le stade pupal, le nombre de pupes, chez les séries témoins est de $74,25 \pm 4,13$. Après traitement, ce nombre diminue et atteint des valeurs respectives de $50,75 \pm 5,36$; $42,62 \pm 7,94$; $31,12 \pm 3,60$; $29,50 \pm 5,58$; $20,87 \pm 4,22$; $18,37 \pm 5,23$ pour les couples $M_{25} + F_T$; $M_T + F_{25}$; $M_{50} + F_T$; $M_{25} + F_{25}$; $M_T + F_{50}$; $M_{50} + F_{50}$ (Tab. 16).

Le traitement avec le Neem-Azal entraîne également une diminution dans le nombre d'individus chez les adultes comparativement aux témoins du même stade ($71,87 \pm 2,2$). En effet, chez les séries traitées des valeurs de $48,50 \pm 3,85$; $40,62 \pm 6,98$; $30,50 \pm 3,71$; $27,87 \pm 5,22$; $19,00 \pm 2,56$; $17,25 \pm 5,33$ sont respectivement notées pour les couples $M_{25} + F_T$; $M_T + F_{25}$; $M_{50} + F_T$; $M_{25} + F_{25}$; $M_T + F_{50}$; $M_{50} + F_{50}$ (Tab. 16).

L'analyse statistique des données (Tab. 16) révèle, comparativement aux témoins, une diminution significative dans le nombre d'œufs, larves, pupes et adultes pour toutes les séries traitées (ANOVA à mesure répétée : effet traitement : $F_{6, 42} = 214,90$, $p < 0.0001$; effet stade : $F_{3, 21} = 15,94$, $p < 0,0001$; interaction: $F_{18, 126} = 0.60$, $p = 0.89$).

La comparaison entre les différentes séries pour chaque stade de développement révèle un effet dose significatif entre les différentes couples formés ($p < 0,0001$); le test HSD de Tukey a permis de classer les couples en quatre groupes pour les stades œufs, larves, adultes

mais en cinq groupes pour le stade pupe. 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 adultes : $M_T + F_T < M_{25} + F_T = M_T + F_{25} < M_{50} + F_T = M_{25} + F_{25} < M_T + F_{50} = M_{50} + F_{50}$.

Pupes : $M_T + F_T < M_{25} + F_T < M_T + F_{25} < M_{50} + F_T = M_{25} + F_{25} < M_T + F_{50} = M_{50} + F_{50}$

La comparaison entre les différentes séries traitées a la DL_{50} montre un effet significatif et le test de HSD de Tukey révèle trois groupes ($M_T + F_T < M_{50} + F_T < M_T + F_{50} = M_{50} + F_{50}$).

Ce résultat est en faveur d'une sensibilité plus grande des femelles de *D. melanogaster* au Neem-Azal.

Tableau 16 : Effets du Neem-Azal, administré *in vivo*, par application topique, (DL_{25} : 0,23 et DL_{50} : 0,63 μ g) le jour de l'émergence adulte sur le nombre des descendants (génération F_1). ($m \pm ET$; $n = 8$). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

	Œufs	Larves (L3)	Pupes	Adultes
$M_T + F_T$	81,37 $\pm$ 3,24 a	75,50 $\pm$ 7,57 a	74,25 $\pm$ 4,13 a	71,87 $\pm$ 2,29 a
$M_{25} + F_T$	53,87 $\pm$ 5,91 b	52,25 $\pm$ 6,49 b	50,75 $\pm$ 5,36 b	48,50 $\pm$ 3,85 b
$M_T + F_{25}$	48,37 $\pm$ 7,15 b	44,50 $\pm$ 7,57 b	42,62 $\pm$ 7,94 c	40,62 $\pm$ 6,98 b
$M_{50} + F_T$	32,62 $\pm$ 6,52 c	32,50 $\pm$ 4,10 c	31,12 $\pm$ 3,60 d	30,50 $\pm$ 3,71 c
$M_{25} + F_{25}$	32,62 $\pm$ 8,24 c	31,87 $\pm$ 6,46 c	29,50 $\pm$ 5,58 d	27,87 $\pm$ 5,22 c
$M_T + F_{50}$	23,50 $\pm$ 3,92 d	23,00 $\pm$ 5,60 d	20,87 $\pm$ 4,22 e	19,00 $\pm$ 2,56 d
$M_{50} + F_{50}$	20,25 $\pm$ 2,25 d	19,50 $\pm$ 4,47 d	18,37 $\pm$ 5,23 e	17,25 $\pm$ 5,33 d

3. Effets du Neem-Azal sur la fécondité des mâles

L'effet du Neem-Azal a été observé sur le nombre de cystes par testicule chez les mâles *D. melanogaster* après application topique à la DL₅₀ (0,63 µg) le jour de l'émergence des adultes. Le nombre de cystes par testicule, évalué 48 heures après traitement montre chez les séries témoins une valeur qui est de $28,47 \pm 2,16$; ce nombre diminue significativement après traitement au Neem-Azal (Test t de student ; $t_{58} = 3,08$; $p = 0,003$) pour atteindre une valeur de $20 \pm 1,69$ (Fig. 9A).

Parallèlement à l'étude de l'impact du pesticide sur le nombre de cystes par testicule, l'observation au microscope à fluorescence a permis, également, de mettre en évidence des anomalies postméiotiques au niveau de la localisation des noyaux des spermatocytes. Ainsi, la figure 9B montre une augmentation des anomalies chez les séries traitées comparativement aux témoins ; en effet, les pourcentages d'anomalies d'une valeur de $13,33 \pm 0,34$ chez les séries témoins passent à $33,33 \pm 0,71$ chez les séries traitées (Khi carré ; $\chi^2 = 5,30$; $df = 1$; $z = 2,30$; $p = 0,021$).

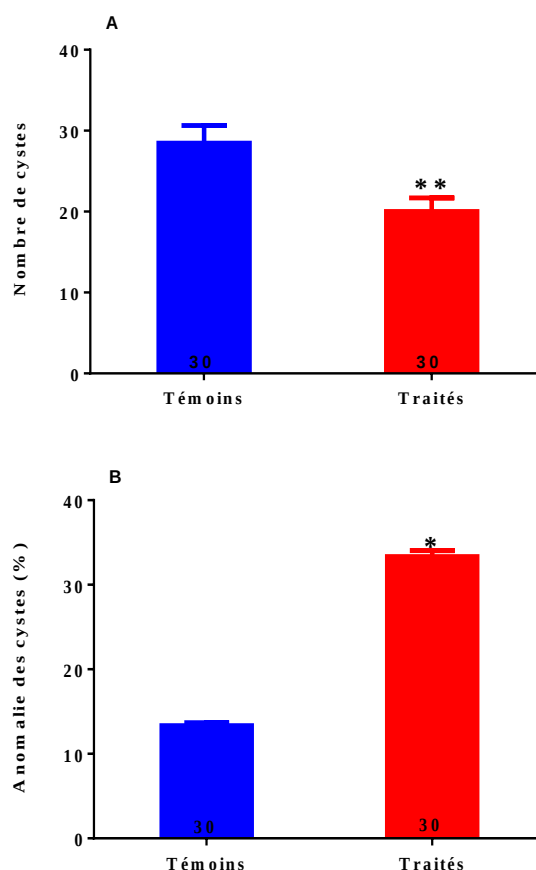


Figure 9. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μ g) à l'émergence des adultes mâles de *D. melanogaster*. **A** : Nombre de cystes par testicule 48h après l'émergence. **B** : Pourcentage d'anomalies de position des noyaux de spermatocyte 48h après l'émergence. (m $\pm$ ET; les valeurs dans chaque barre indiquent le nombre de répétitions ; * différence significative $p \leq 0,05$; ** différence très significative $p \leq 0,01$).

4. Effets du Neem-Azal sur la fécondité des femelles

Le Neem-Azal, administré par application topique à la DL_{50} (0,63 μ g) le jour de l'émergence des femelles de *D. melanogaster*, a été évalué sur deux paramètres morphométriques de fécondité que sont le nombre d'ovocytes et le volume de l'ovocyte basal.

Le traitement indique un impact sur le nombre d'ovocytes par ovaire, évalué 48 heures après l'émergence. La figure 10A montre, chez les séries témoins, un nombre d'ovocytes par

ovaire qui est de $16,57 \pm 0,53$; après traitement au Neem-Azal, cette valeur diminue significativement et le nombre d'ovocytes par ovaire est de $13,90 \pm 0,55$ (Test t de student ; $t_{58} = 3,43$; $p = 0,0011$).

Le traitement au Neem-Azal entraîne également un impact sur le volume de l'ovocyte basal qui présente une baisse significative de 32,39 % (Test t de student ; $t_{58} = 3,87$; $p = 0,0003$) chez les femelles traitées comparativement aux témoins (Fig. 10B). Ce volume est calculé après l'évaluation de deux paramètres qui sont la longueur (L) et la largeur (l) de l'ovocyte basal.

Ainsi, les résultats indiquent une diminution pour la longueur (Test t de student ; $t_{58} = 6,26$; $p < 0,0001$) mais aussi pour la largeur (Test t de student ; $t_{58} = 2,39$; $p = 0,02$) chez les séries traitées (L: $0,48 \pm 0,06$ mm , l: $0,13 \pm 0,02$ mm) par rapport aux témoins (L: $0,58 \pm 0,04$ mm; l: $0,15 \pm 0,02$ mm).

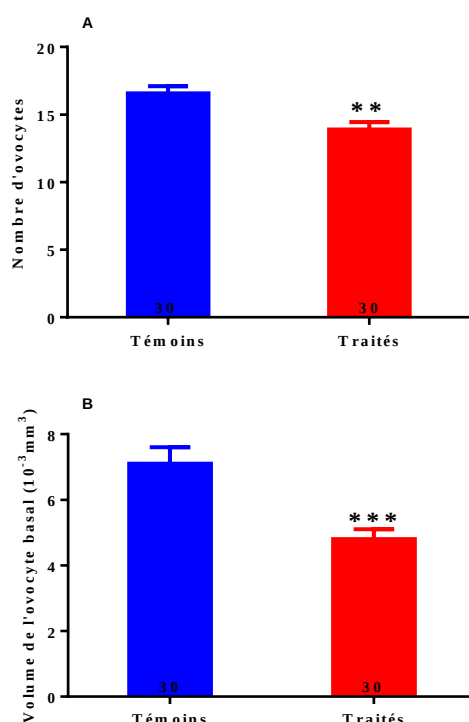


Figure 10. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μg) à l'émergence des adultes femelles de *D. melanogaster*. **A** : Nombre d'ovocytes par ovaire 48 h après l'émergence. **B** : Volume de l'ovocyte basal 48 h après l'émergence ($m \pm ET$; le nombre de répétitions est indiqué dans chaque barre ; ** différence très significative $p \leq 0,01$; *** différence hautement significative $p \leq 0,001$).

5. Effets du Neem-Azal sur le succès à l'accouplement

Le Neem-Azal, administré par application topique à la DL_{50} (0,63 μg) le jour de l'émergence des adultes *D. melanogaster*, révèle, 48 h après traitement, un impact sur les accouplements dans les conditions de non choix (Fig. 11A), du choix du mâle (Fig. 11B) et du choix de la femelle (Fig. 11C).

Dans la condition de non choix, la baisse dans les pourcentages d'accouplement, comparativement aux témoins ($M_T + F_T$, 43.2%) est enregistrée dans les séries où seuls les mâles ($M_{50} + F_T$, 16.8%, test exact de Fisher $p < 0.001$) ou les deux sexes sont traités ($M_{50} + F_{50}$, 13.8%, test exact de Fisher, $p < 0.001$). Les résultats ne montrent aucun effet sur les

pourcentages d'accouplement lorsque les femelles seules sont traitées ($M_T + F_{50}$, 39.4%, test exact de Fisher, $p = 0.55$).

Dans les conditions de choix du mâle, un mâle non traité (les deux barres de gauche sur l'histogramme) ou un mâle traité (les deux barres de droites sur l'histogramme) avaient chacun le choix entre une femelle traitée et une autre non traitée. Les résultats des succès d'accouplement du mâle avec l'une ou l'autre de ces femelles suggèrent deux observations :

1. les mâles traités se sont moins souvent accouplés que les mâles témoins (30.7 % vs 61.6 % respectivement, test exact de Fisher, $p < 0.001$).

2. généralement, les mâles ont eu tendance à s'accoupler plus souvent avec la femelle non traitée qu'avec la femelle traitée. La comparaison est fortement significative pour les mâles traités (M_{50} choisissant F_T , 23.5% vs M_{50} choisissant F_{50} , 7.2 %, test exact binomial, $p < 0.001$) et à la limite de la signification pour les mâles témoins (M_T choisissant F_T , 39.5 % vs M_T choisissant F_{50} , 22.1%, test exact binomial, $p = 0.053$).

Dans les conditions de choix de la femelle, deux groupes ont été également testés, l'un avec une femelle non traitée (les deux barres de gauche de l'histogramme) ou l'autre avec une femelle traitée (les deux barres de droite de l'histogramme) ; chacune de ces femelles avaient le choix entre un mâle traité et un autre non traité.

Les résultats des succès d'accouplement de la femelle suggèrent deux observations :

1. les femelles traités et témoins s'accouplent de manière comparable (59.0% vs 46.7% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0.15$).

2. les mâles se sont accouplés plus souvent avec les femelles non traitées qu'avec les femelles traitées (F_T choisissant M_T , 36.0% vs F_T choisissant M_{50} , 10.7%, test exact binomial, $p < 0.01$ and F_{50} choisissant M_T , 48.7 % vs F_{50} choisissant M_{50} , 10.3 %, test exact binomial, $p < 0.001$).

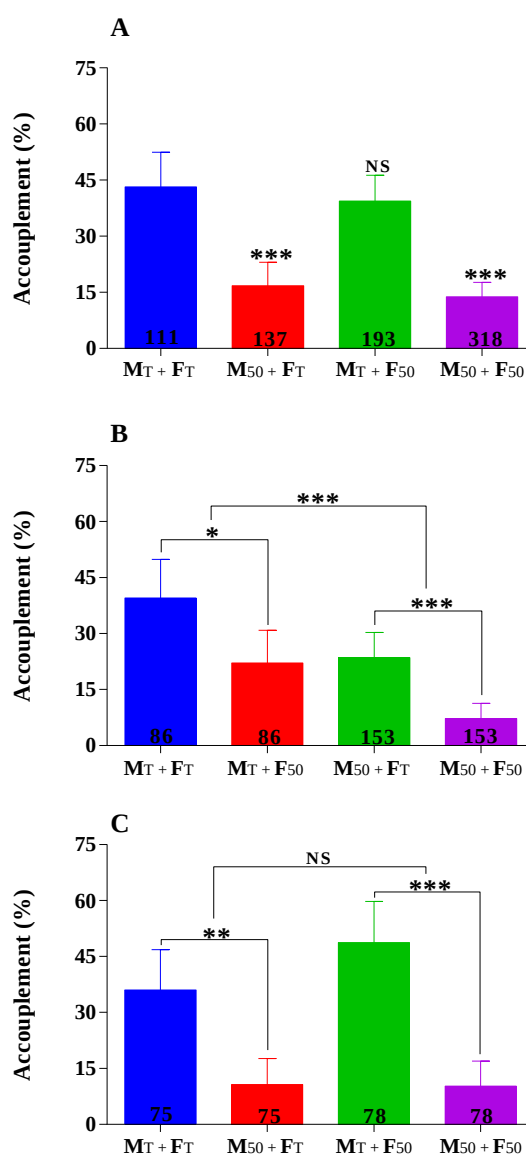


Figure 11. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL₅₀ : 0,63 µg) à l'émergence des adultes *D. melanogaster* sur les accouplements dans différentes conditions observés 48 h après traitement (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; n = 75-318 ; M_T: mâle témoin; F_T: femelle témoin; M₅₀: mâle traité; F₅₀: femelle traité). **A** : Pourcentages d'accouplements dans les conditions de non choix. **B** : Pourcentages d'accouplements dans les conditions de choix du mâle. **C** : Pourcentages d'accouplements dans les conditions de choix de la femelle. Les nombres dans chaque barre indique le nombre de répétitions ; * au-dessus des barres indiquent des différences significatives à $p \leq 0.05$; ** différences significatives à $p \leq 0.01$; *** différences hautement significatives à $p \leq 0.001$.

Quand seul le mâle est traité, une diminution dans le pourcentage d'accouplement est noté dans toutes les conditions de choix, par rapport aux témoins (43,20%, Khi carré, $\chi^2=23,06$; $df = 3$; $p < 0,0001$) (Fig. 12A). Dans les conditions de choix de la femelle, la diminution des accouplements est plus importante comparativement au choix du mâle (10,70% vs 22,10% respectivement, test exact de Fisher, $p= 0,02$). Des résultats comparables sont trouvés entre la condition de non choix et du choix du mâle (16,80% vs 22,10% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,19$) mais aussi entre le non choix et le choix de la femelle (16,80% vs 10,70% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,30$).

Lorsque les femelles sont traitées, la comparaison entre les différentes conditions révèle une diminution dans les pourcentages d'accouplement seulement dans la condition du choix du mâle. Ceci est confirmé par l'analyse statistique après comparaison avec les témoins (23,50% vs 43,20% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,02$, Fig. 12B), la condition de non choix (23,50% vs 39,38 respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,006$) ou encore avec celle du choix de la femelle (23,50% vs 48,70% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,0005$).

Lorsque les deux sexes sont traités, les pourcentages d'accouplement diminuent dans toutes les conditions, comparées aux témoins (43,20%, Khi carré, $\chi^2= 48,86$; $df = 3$; $p < 0,0001$, Fig. 12C). Des résultats comparables sont trouvés entre la condition de choix du mâle et celle de la femelle (7,20% vs 10,30% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,45$) mais aussi entre le non choix et le choix de la femelle (13,80% vs 10,30% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,46$).

Dans les conditions du choix du mâle, la diminution des accouplements est plus importante que dans le non choix (7,20% vs 13,80% respectivement, test exact de Fisher, $p = 0,04$).

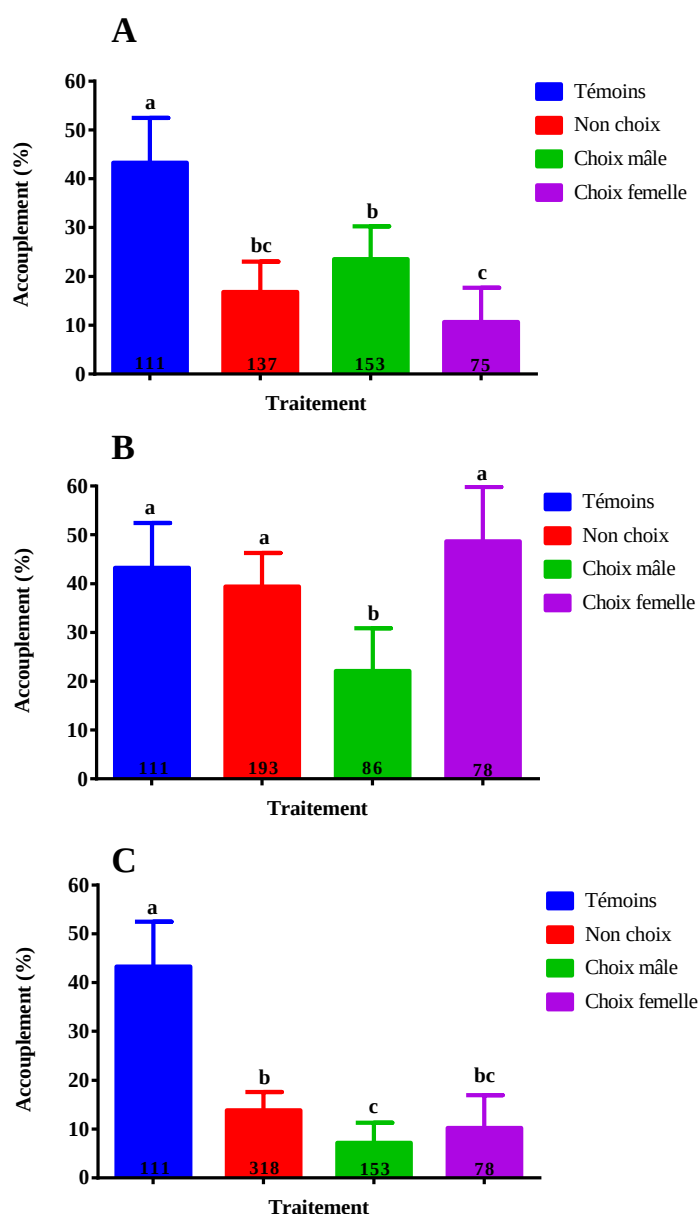


Figure 12. Comparaison des accouplements entre les différentes conditions de choix et de non choix 48 heures après traitement avec le Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : $0,63 \mu g$) à l'émergence des adultes de *D. melanogaster* (moyennes et intervalles de confiance à 95 % ; $n = 75-318$). **A** : Pourcentages d'accouplements quand seuls les mâles sont traités. **B** : Pourcentages d'accouplements quand seules les femelles sont traitées. **C** : Pourcentages d'accouplements quand les deux sexes sont traités. Les nombres dans chaque barre indiquent le nombre de répétitions et les différentes lettres indiquent des différences significatives entre séries 2 à 2, $p \leq 0,05$.

6. Effets du Neem-Azal sur l'activité des mâles

Le Neem-Azal testé par application topique à la DL_{50} ($0,63 \mu\text{g}$) le jour de l'émergence des adultes *D. melanogaster* est évalué sur l'activité et la mobilité des mâles dans un actimètre. Le nombre de passages des mâles a été observé au 2ème jour après traitement et pendant 8 jours. La figure 13 montre les profils moyens d'activité des mâles sur 24 heures chez les drosophiles témoins et traitées (correspondants à une moyenne de 8 jours). Il apparaît un profil d'activité similaire entre les deux groupes ; cependant, les mâles traités montrent une activité réduite entre 3 et 21h comparativement aux témoins (Fig. 13).

En évaluant l'activité du mâle pendant les 8 jours de l'expérience, une réduction générale du nombre total de passages effectués par les mâles traités a été enregistrée comparativement aux témoins (Fig. 14). En effet, l'ANOVA à mesures répétées révèle un effet significatif du traitement ($F_{1, 581} = 8.66$, $p < 0.01$), du temps ou jours ($F_{7, 581} = 5.90$, $p < 0.001$) mais l'interaction entre les deux facteurs (jour et traitement) n'est pas significative ($F_{7, 581} = 0.75$, $p = 0.65$).

Il est possible alors de conclure que les mâles traités sont moins actifs que les mâles témoins pendant les 8 jours de l'expérience.

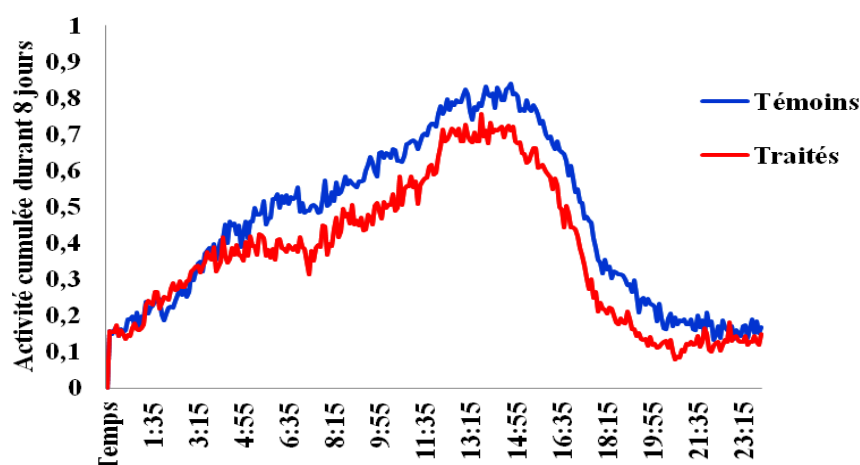


Figure 13. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μg) à l'émergence des adultes de *D. melanogaster*. Les profils d'activité sont observés 48 h après l'application topique durant 8 jours ($n = 42-43$).

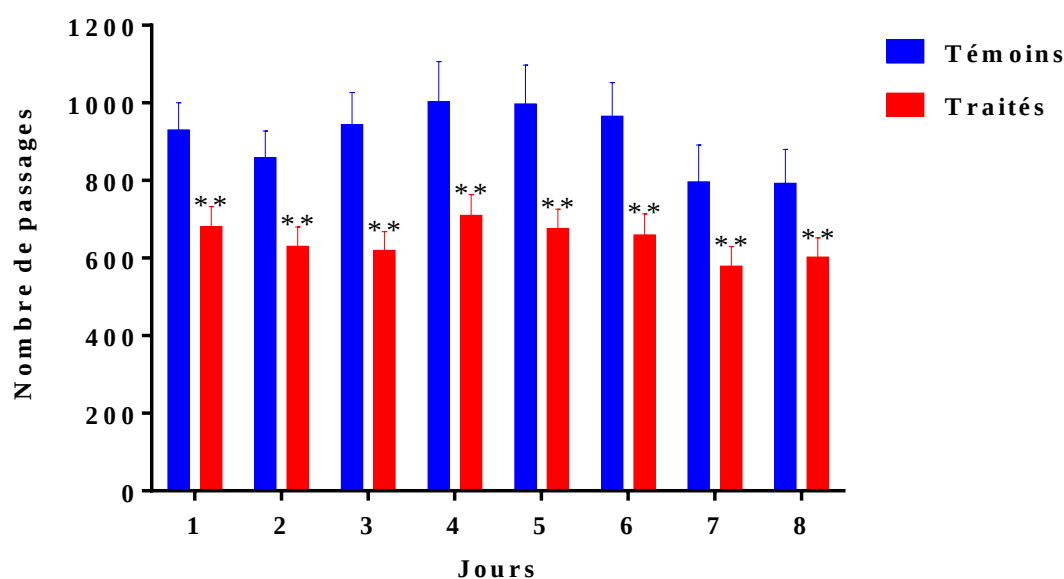


Figure 14. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : 0,63 μg) à l'émergence des adultes *D. melanogaster*. Les nombres de passages sont observées 48 h après l'application topique durant 8 jours ($m \pm ET$; $n = 42-43$). ** différences significatives à $p \leq 0.01$.

7. Effets du Neem-Azal sur le stockage des spermatozoïdes chez les femelles

Le Neem-Azal, testé par application topique à la DL_{50} ($0,63 \mu\text{g}$) le jour de l'émergence des adultes de *D. melanogaster* ne présente aucun effet sur le stockage du sperme dans le réceptacle ventral (Fig. 15A) et la spermathèque (Fig. 15B).

En effet, aucune différence significative n'est apparue entre les groupes traités ($M_{50} + F_T$, $M_T + F_{50}$ and $M_{50} + F_{50}$) et le groupe témoin ($M_T + F_T$), dans le réceptacle ventral (test exact de Fisher, $p > 0.25$) et dans la spermathèque (test exact de Fisher, $p > 0.36$).

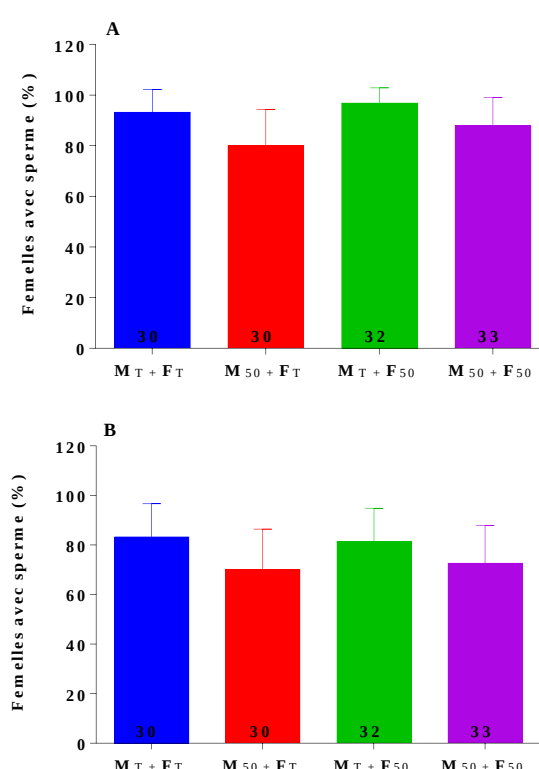


Figure 15. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : $0,63 \mu\text{g}$) à l'émergence des adultes de *D. melanogaster*. **A** : Dans le réceptacle ventral. **B** : dans la spermathèque. Les femelles sont observées 3 h après l'accouplement (M_T : mâle témoin ; F_T : femelle témoin ; M_{50} : mâle traité ; F_{50} : femelle traité) survenant 48 h après l'application topique (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; $n = 30-33$). Les numéros dans les barres indiquent le nombre de répétitions.

8. Effets du Neem-Azal sur la réceptivité sexuelle des femelles

Le Neem-Azal, testé par application topique à la DL_{50} ($0,63 \mu\text{g}$) le jour de l'émergence des adultes *D. melanogaster*, induit une augmentation dans la réceptivité sexuelle des femelles, évaluée par un nombre de réaccouplements plus important (Fig. 16). En effet, comparativement aux témoins ($M_T + F_T$, 15.3 %), la proportion de réaccouplement, sept jours après le premier, est significativement plus forte quand les deux sexes sont traités ($M_{50} + F_{50}$, 32.7 %, test exact de Fisher, $p < 0.05$). L'effet est proche de la significativité quand seules les femelles sont traitées ($M_T + F_{50}$, 28.4%, test exact de Fisher, $p = 0.078$). Cependant, quand seuls les mâles sont traités aucune différence n'est observée ($M_{50} + F_T$, 15.8 %, test exact de Fisher, $p = 1.0$).

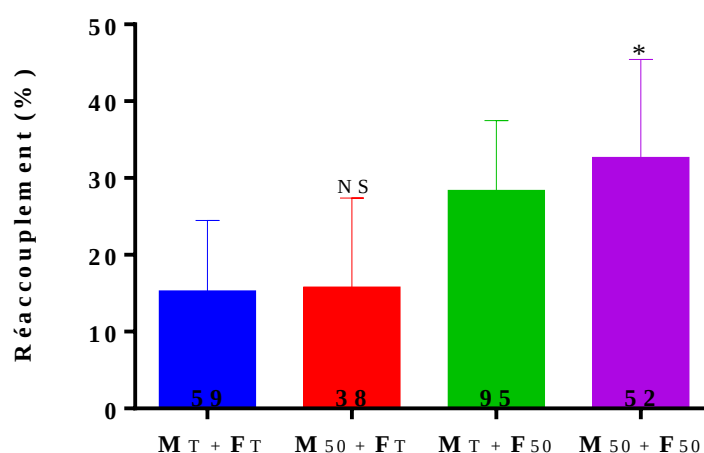


Figure 16. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : $0,63 \mu\text{g}$) à l'émergence des adultes de *D. melanogaster*. Les pourcentages de réaccouplement des femelles sont obtenus 7 jours après le premier accouplement (M_T : mâle témoin ; F_T : femelle témoin ; M_{50} : mâle traité ; F_{50} : femelle traitée) survenant 48 h après l'application topique (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; $n = 38-95$). Les numéros dans les barres indiquent le nombre de répétitions ; * différences significatives à $p \leq 0.05$.

9. Effets du Neem-Azal sur la stérilité des femelles

Le Neem-Azal, testé par application topique à la DL_{50} ($0,63 \mu\text{g}$) le jour de l'émergence des adultes *D. melanogaster*, a aussi un effet sur la stérilité des femelles (Fig. 17). Le pourcentage de femelles stérile augmente quand les deux sexes sont traités (26.9%) comparativement aux témoins (8.5%, test exact de Fisher, $p < 0.05$). Cependant, pour les séries où seulement les mâles (5.3 %) ou les femelles sont traités (18.9 %), aucun effet significatif n'est observé comparé aux témoins (test exact de Fisher, respectivement $p = 0.70$ et $p = 0.10$).

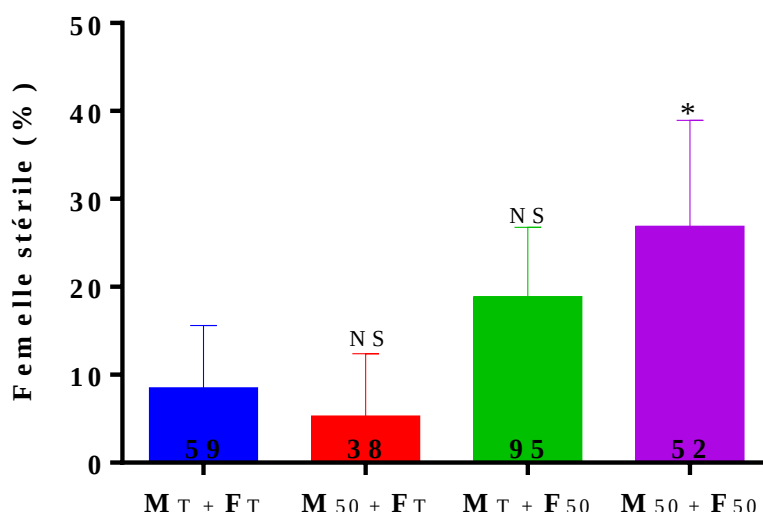


Figure 17. Effets du Neem-Azal, administré par application topique (DL_{50} : $0,63 \mu\text{g}$) à l'émergence des adultes de *D. melanogaster*. Les pourcentages de femelles stériles sont déterminés 2 jours après le premier accouplement (M_T : mâle témoin ; F_T : femelle témoin ; M₅₀ : mâle traité ; F₅₀ : femelle traité) survenant 48 h après l'application topique (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; $n = 38-95$). Les numéros dans les barres indiquent le nombre de répétitions ; * différences significatives à $p \leq 0.05$.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'azadirachtine, évaluée chez les adultes *D. melanogaster*, révèle chez les survivants de cet insecte un impact significatif sur la reproduction. L'azadirachtine, administrée par application topique, sur les adultes nouvellement émergés, induit une mortalité qui varie de 13,92 à 71,80% en fonction des doses et qui reste comparable quel que soit le temps après traitement (de 24 à 144 heures). Ce résultat est en accord avec ceux d'Andreazza *et al.* (2017) chez deux autres espèces de Drosophilidae, *Drosophila suzukii* (Matsumara) et *Zaprionus indianus* (Gupta). L'azadirachtine agit avec un effet dose-dépendant et la DL₅₀ évaluée 24 h après le traitement (0,63 µg ou 630 ppm) est proche de celle trouvée (0,67 µg) par Bezzar-Bendjazia *et al.* (2016), bien que dans notre cas une application topique soit réalisée chez les larves de dernier stade. L'azadirachtine semble être moins toxique chez *D. melanogaster* (1,17 µg) après une application topique sur les pupes nouvellement exuviées (Boulahbel *et al.*, 2015). Similairement, l'huile de Neem, autre formulation commerciale de l'azadirachtine, induit une toxicité comparable chez *Drosophila* (Boulahbel *et al.*, 2015), malgré une composition différente de par la présence supplémentaire de deux antiappétants (nimbine et salanine). La toxicité similaire de ces deux formulations différentes pourrait s'expliquer par le mode d'application utilisé (i.e. une administration orale aurait pu donner des résultats différents) mais aussi par la particularité du stade pupal qui ne se nourrit pas. La sensibilité réduite, notée chez les pupes comparativement au stade adulte, s'expliquerait par une pénétration moins importante du pesticide de par la présence du puparium, une activité réduite mais aussi un métabolisme différent à ce stade de développement. Par ailleurs, le stade pupal, phase critique de la formation de l'adulte de par la réorganisation radicale de la plupart des tissus et organes, reste très sensible à l'azadirachtine (Ureña *et al.*, 2014 ; Boulahbel *et al.*, 2015). L'azadirachtine présente une toxicité plus forte chez les adultes de *D. suzukii* et *Z. indianus* comparativement à *D. melanogaster* (Andreazza *et al.*, 2017). En effet, une concentration de

seulement 12 ppm cause la mortalité de 40 % chez *D. suzukii* et *Z. indianus*. Des observations similaires ont été rapportées par De Andrade-Coelho *et al.* (2014) chez les adultes femelles d'un autre diptère *Lutzomyia longipalpis*. Cette différence de sensibilité a été, souvent, montrée dans la littérature et l'azadirachtine est citée comme un insecticide affectant, avec des effets variables, la survie de différentes espèces d'insectes (Tomé *et al.*, 2013 ; Ahmad *et al.*, 2015 ; Poland *et al.*, 2016 ; Asaduzzaman *et al.*, 2016) ; ainsi, de fortes variations dans la sensibilité des insectes à l'azadirachtine ont été notées selon l'ordre, l'espèce, la formulation, ou la méthode d'application (Efrom *et al.*, 2012 ; Abedi *et al.*, 2014 ; Barbosa *et al.*, 2015 ; Bernardes *et al.*, 2016 ; Tofel *et al.*, 2016). En effet, la sensibilité des insectes aux insecticides varie avec la régulation des récepteurs membranaires (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010), le taux de pénétration à travers la cuticule, l'absorption par les insectes, le transport dans les tissus du corps et le métabolisme (Besard *et al.*, 2011). Divers mécanismes peuvent avoir un rôle dans l'induction de la toxicité aiguë de l'azadirachtine. Les effets de l'azadirachtine sur la mortalité adulte peuvent être liés à la cytotoxicité et à l'induction de l'apoptose *via* les récepteurs d'insuline et leurs voies de signalisation comme l'avait déjà supposé Lai *et al.* (2014) ; en outre, la voie de signalisation de l'insuline (Shao *et al.*, 2016) est connue pour interagir avec l'HJ et les ecdystéroïdes (Toivonen et Partridge, 2009 ; Nässel et Broeck, 2016), hormones inhibées par cet insecticide. L'apoptose induite par l'azadirachtine provoque une désorganisation générale dans les organes de *D. melanogaster* (Xu *et al.*, 2016), mais aussi chez d'autres espèces (Mordue *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2015 ; Shao *et al.*, 2016). Ainsi, des effets négatifs sur différents tissus, comme les muscles (*via* la suppression du péristaltisme), le corps gras et les cellules épithéliales de l'intestin ont été, particulièrement, rapportés (Mordue *et al.*, 2005 ; Shannag *et al.*, 2015). La diminution de la consommation alimentaire et les effets biochimiques (diminution de l'activité ou de la production de l' α -amylase, chitinases, de protéases et de lipases), publiés récemment chez *D. melanogaster* (Kilani-

Morakchi *et al.*, 2017), peuvent aussi contribuer à la toxicité aiguë de l'azadirachtine. Par ailleurs, l'azadirachtine affecte, *via* les chitinases, la chitine (Senthil-Nathan, 2013 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2017) présente dans la membrane péritrophique et dont le rôle est la protection de l'intestin moyen contre les dégâts mécaniques et les composés toxiques (Senthil-Nathan, 2013). En outre, l'azadirachtine pourrait aussi induire des dommages morphologiques et physiologiques sur les glandes salivaires, comme cela a été noté par Remedio *et al.* (2016) chez les acariens (*Rhipicephalus sanguineus*, Latreille). Chez *Drosophila*, l'activité rythmique des muscles alimentaires est contrôlée par des neurones moteurs spécifiques (Friedrich *et al.*, 2016) ; aussi, la cytotoxicité peut être expliquée par le blocage des canaux calciques dépendants et leur impact sur les synapses cholinergiques (Qiao *et al.*, 2014). Ainsi, la nutrition semble largement affectée par l'azadirachtine et il est établi, chez *D. melanogaster*, que la mortalité peut augmenter si l'équilibre nutritionnel est impacté (Lee, 2015) ; par ailleurs, la lutte contre le stress toxique, lié à l'azadirachtine (Dere *et al.*, 2015 ; Boulahbel *et al.*, 2015) peut impliquer une forte demande d'énergie (Piri *et al.*, 2014) pouvant être non disponible de par les effets sus-cités de l'azadirachtine. –Ainsi, tous ces processus qui affectent l'état nutritionnel de la drosophile, immédiatement après la métamorphose, pourraient être potentiellement fatal et donc contribuer à la mortalité observée dans cette étude.

Des variations quantitatives et qualitatives de la nutrition influencent aussi significativement la reproduction et le comportement tout comme le succès reproducteur dans son ensemble (Thompson et Pellmyr, 1991). Chez *Drosophila*, des modifications dans l'homéostasie énergétique affectent sévèrement la reproduction (Sieber et Spradling, 2015 ; Zheng *et al.*, 2016) et il est démontré qu'une composition en lipides correcte s'avère cruciale pour la spermatogenèse (Laurinyecz *et al.*, 2016). Chez *D. melanogaster*, les voies de

signalisation de l'insuline, des ecdystéroïdes et de l'HJ jouent un rôle crucial dans le succès de la reproduction (Toivonen et Partridge, 2009 ; Nässel et Broeck, 2016) et les observations notées dans notre étude indiquent des effets toxiques de cet insecticide sur la reproduction. En effet, la fécondité et la fertilité chez *D. melanogaster* ayant survécu au traitement à l'azadirachtine ont été négativement affectées, entraînant une diminution de la descendance. Ces effets dépressifs ont été positivement corrélés avec une réduction du nombre de cystes et d'ovocytes, une augmentation des anomalies de positionnement des noyaux des spermatocytes et une diminution de la taille de l'ovocyte basal ; tous ces résultats concourent à expliquer la baisse du nombre d'individus issus des adultes traités à l'émergence. Les effets de l'azadirachtine sur la fécondité et l'oviposition ont également été rapportés chez *D. melanogaster* (Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016 ; Boulahbel *et al.*, 2015) ou d'autres diptères (*Anopheles stephensi*, Cecidomyiidae) (Dembo *et al.*, 2015 ; Evans et Hallett, 2016) mais aussi dans plusieurs ordres d'insectes (lépidoptères, hyménoptères, coléoptères,) (Abedi *et al.*, 2014 ; Barbosa *et al.*, 2015; Tofel *et al.*, 2016). L'azadirachtine cause des effets significatifs sur le système reproducteur des insectes mâles et femelles en causant des altérations et des changements morphologiques dans les ovocytes et spermatocytes (Mordue *et al.*, 2005 ; Remedio *et al.*, 2015). L'inhibition de l'oogénèse et de la spermiogénèse ont également été citées (Mordue *et al.*, 2005 ; Chaudhary *et al.*, 2017).

La diminution dans le nombre d'ovocytes et dans la taille de l'ovocyte basal chez les femelles peut être expliquée par une sévère dégénérescence des cellules folliculaires, une fragmentation des vésicules germinales (Mordue *et al.*, 2005 ; Ahmad *et al.*, 2015) et des altérations mitochondriales (Shaurub *et al.*, 2014) causées par cet insecticide. En outre, l'azadirachtine altère ou empêche la formation de nouveaux éléments d'actine dans le cytosquelette, induisant une perturbation dans la division cellulaire et pouvant bloquer le

transport des éléments nutritifs (Mordue *et al.*, 2005). Ceci peut affecter le déchargement du contenu cytoplasmique dans les cellules nourricières de l'ovocyte et impacter la vitellogénèse (Swevers *et al.*, 2005). L'inhibition de la vitellogénèse a déjà été rapportée chez *D. melanogaster* après traitement à l'azadirachtine (Boulahebel *et al.*, 2015). En outre, l'azadirachtine peut également interférer avec la synthèse de la vitellogénine et/ou son assimilation, affectant ainsi le développement de l'ovocyte via l'HJ (Mordue *et al.*, 2005 ; Chaudhary *et al.*, 2017). L'impact de l'azadirachtine chez les adultes de femelles *D. melanogaster* peut être lié au fait que l'HJ stimule la vitellogénèse pour le développement des ovocytes et constitue, conjointement avec la 20E et l'insuline, un point de contrôle sensible et crucial dans l'oogénèse (Toinoven and Partridge, 2009 ; Shao *et al.*, 2016; Nässel et Broeck., 2016). Les voies de signalisation de l'ecdysone ou de l'HJ semblent aussi être impliquées dans la régulation des microvillosités au niveau des cellules épithéliales folliculaires (Romani *et al.*, 2016) ou encore au niveau de l'intestin, avec une réorganisation des entérocytes permettant l'obtention d'un plus grand organe afin de soutenir l'augmentation du métabolisme lipidique nécessaire à la reproduction chez *D. melanogaster* (Shingleton, 2015). Ainsi, un équilibre approprié entre l'HJ et la 20E a une importance primordiale pour une évolution normale de l'ovogénèse chez cet insecte, la vitellogénèse et la spermatogénèse (Swevers *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2016). La réduction du nombre de cystes et les anomalies observées peuvent s'expliquer par l'impact de l'azadirachtine sur le processus méiotique responsable de la production de sperme ainsi que sur les structures cellulaires et histologiques (Mordue *et al.*, 2005). En effet, chez les mâles de *Mylabris indica* (Coleoptera), Vivekananthan et Suresh, (2014) ont noté des changements au niveau testiculaire, comme la vacuolisation, le rétrécissement des cystes, l'agglutination et la fragmentation de la chromatine, la désintégration et la dégénérescence des cellules germinales comme les spermatogonies, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes. Ces effets de l'azadirachtine, chez les

adultes mâles, pourrait s'expliquer par l'action antagoniste sur les ecdystéroïdes, hormones nécessaires à la spermatogenèse; parallèlement, l'HJ est aussi nécessaire pour la synthèse de protéines dans les glandes accessoires mâles (Toivonen et Partridge, 2009).

La diminution de la descendance, chez les adultes de *D. melanogaster*, liée à la réduction du succès à l'accouplement que nous avons observé, suggèrent un fort impact délétère (une réduction de 98 %) du traitement à l'azadirachtine (DL_{50}) sur le rendement reproducteur. En effet, l'application topique d'azadirachtine induit une baisse dans les accouplements dans toutes les conditions testées (conditions de choix et de non choix). Similairement, divers IGDs, comme les agonistes des ecdysteroïdes, démontrent une diminution de la fertilité avec une réduction du succès d'accouplement chez plusieurs espèces d'insectes (Smagghe et Degheele 1992 ; Dallaire *et al.*, 2004 ; Pineda *et al.*, 2007 ; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009, 2014).

Le comportement d'accouplement chez les mâles de *D. melanogaster* serait aussi contrôlé par les voies de signalisation de l'insuline et des ecdystéroïdes (Teseo *et al.*, 2016 ;) mais l'HJ joue aussi un rôle important dans la régulation de ce processus (Wijesekera *et al.*, 2016). Par conséquent, l'impact de l'azadirachtine observé sur l'accouplement peut s'expliquer par la vaste littérature relatant l'inhibition de l'HJ et des ecdystéroïdes par l'action de ce pesticide (Mordue *et al.*, 2005) et leur interaction avec les voix de signalisation de l'insuline (Nässel et Broeck., 2016).

Dans les conditions de choix et de non choix, seul le traitement des mâles réduit les accouplements chez *D. melanogaster*. Quand la femelle a le choix, elle s'accouple de manière moins fréquente avec les mâles traités. Cependant, le traitement de la femelle induit aussi un impact sur la probabilité de l'accouplement car quand les mâles ont le choix, ils s'accouplent moins avec les femelles traitées. La capacité d'accouplement des mâles peut être affectée par

la diminution de leur activité ou mobilité ; en effet, les expérimentations réalisées avec l'actimètre (DAM) révèlent clairement que les mâles traités sont moins actifs que les mâles témoins malgré des rythmes nycthéméraux similaires. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lima *et al.* (2015) qui reportent des résultats similaires chez *Neoseiulus baraki* (Acari). Ces auteurs ont aussi noté que si le pesticide impacte l'activité globale des mâles, la recherche de la femelle n'est pas affectée (Lima *et al.* 2015). Ainsi, les différences observées entre toutes les conditions testées peuvent être attribuées à la mobilité des mâles mais aussi à l'état physiologique des femelles. En effet, l'accouplement est une interaction entre les deux sexes et les comportements des deux partenaires sont susceptibles d'interagir et d'influencer le succès de l'acceptation de l'un par l'autre. Par conséquent, les changements dans l'attractivité sexuelle de la femelle peuvent être liés à l'action antagoniste de l'azadirachtine sur les deux hormones majeures (HJ et ecdystéroïdes) impliquées dans le processus de reproduction (Swevers *et al.*, 2005) et aussi être liés à l'infertilité observée et induite par le pesticide (Mordue *et al.*, 2005 ; Boulahbel *et al.*, 2015 ; Aribi *et al.*, 2017 ; Oulhaci *et al.*, 2017). Il est clairement établi que le rétrocontrôle et/ou la libération d'ecdysone et de l'HJ sont dépendants d'une régulation nerveuse (Song et Gilbert, 1996 ; Schoofs *et al.*, 2017). En outre, l'azadirachtine est connue pour son action neurotoxique par blocage des canaux calciques dépendants d'un potentiel d'action (Qiao *et al.*, 2014). Par ailleurs, pour le comportement de cour et le succès des accouplements, de nombreux modes de communications sensorielles, en particulier l'olfaction, sont nécessaires pour permettre aux mâles *D. melanogaster* de trouver leurs partenaires (Ziegler *et al.*, 2013 ; Lone *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2015). Ainsi, la diminution des accouplements, observée dans toutes les conditions, pourrait aussi être liée à un impact de l'azadirachtine sur ces divers circuits sensoriels chez les mâles traités.

Les décisions d'accouplement sont contrôlées par un équilibre entre des mécanismes excitateurs et inhibiteurs au niveau des neurones régulant le comportement de cour (Kallman

et al., 2015). Les neuromodulateurs comme la sérotonine (5-HT), l'octapamine (OA) et la dopamine (DA) ont, chez les adultes *Drosophila* des effets centraux sur le cerveau en relation avec l'apprentissage ou le comportement et leurs diverses actions peuvent influencer la décision d'entreprendre des activités de locomotion, de vol, de lutte ou de comportement de cour (Hoopfer, 2016 ; Lin *et al.*, 2016 ; Majeed *et al.*, 2016). Chez *Drosophila*, des circuits sexuels dimorphiques (neurones moteurs, interneurones et neurones mécanosensoriels) contrôlent les processus reproducteurs comme l'éjection du sperme chez les mâles, l'extension de l'ovipositeur, le stockage du sperme et la décision de ponte chez les femelles (Lee *et al.*, 2015 ; Kimura *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2015). Par ailleurs, la DA interagit différemment avec l'HJ en fonction du sexe de l'animal (Argue *et al.*, 2013) et est connu pour induire le développement ovarien, la réceptivité sexuelle et la fertilité (Neckameyer, 1996 ; Gruntenko *et al.*, 2005, 2007 ; Sasaki *et al.*, 2012). En outre, des études récentes ont démontré que les voies de signalisation de l'insuline régulent le métabolisme de l'HJ et de la DA (Rauschenbach *et al.*, 2017). Par conséquent, l'impact de l'azadirachtine sur la signalisation de l'insuline et de l'HJ tout comme son action neurotoxique pourrait expliquer la plus grande sensibilité des femelles, notée dans nos expérimentations et ceci, malgré une survie similaire à l'azadirachtine entre mâles et femelles (Oulhaci *et al.*, 2017). Ainsi, aucun effet significatif n'est observé dans les réponses post-accouplement chez les mâles traités.

L'accouplement stimule la prolifération des cellules souches germinales femelles (GSC) chez *D. melanogaster* via la voie de signalisation des ecdystéroïdes (Ameku et Niwa, 2016) ; l'activité des GSC est régulée de manière coordonnée avec le système endocrine pour soutenir le succès reproducteur en réponse à l'accouplement (Ameku et Niwa, 2016 ; Schoofs *et al.*, 2017). En outre, l'ovogénèse, la vitellogénèse, la maturation des œufs et l'oviposition sont contrôlés par les ecdystéroïdes et l'HJ (Swevers *et al.*, 2005 ; Jagadeeshan *et al.*, 2015). Ainsi, un grand nombre de mécanismes peuvent être impliqués pour expliquer l'impact de

l'azadirachtine observé sur la fertilité des femelles. Les résultats obtenus sur la stérilité chez les femelles traitées montrent des valeurs plus hautes comparativement à ceux obtenus chez les mâles traités mais ils ne sont pas significativement différents. Ceci pourrait être lié à l'impact du pesticide sur la ponte qui induit une variabilité considérable entre les individus sur la période de ponte. Une plus longue période d'expérimentation aurait peut être démontré une différence significative. Quand l'accouplement se produit, aucun effet n'est, cependant, noté sur l'efficacité de l'accouplement évalué par la présence de sperme dans les voies génitales femelles (spermathèque et réceptacle ventral). Chez les femelles *D. melanogaster*, la libération du sperme est régulée par des neuromodulateurs comme l'OA (Avila *et al.*, 2012). A ce niveau, l'azadirachtine pourrait, *via* son action neurotoxique, bloquer l'utilisation du sperme dans le tractus génital.

Nos résultats montrent que la stérilité des femelles est positivement corrélée avec l'augmentation des réaccouplements. Chez les femelles non traitées, il est établi que la diminution de la ponte ou la production d'oeufs non fertiles induit un nouvel accouplement (Gromko *et al.*, 1984). Par conséquent, l'impact de l'azadirachtine affectant la fertilité des femelles pourrait expliquer l'augmentation des réaccouplements quand les deux sexes sont traités. La hausse des réaccouplements peut aussi être liée à un impact de l'azadirachtine sur la synthèse des protéines au niveau des glandes accessoires mâles (notamment sur le Sex peptide) *via* l'implication de l'HJ (Wilson *et al.*, 2003). De telles modifications potentielles dans le fluide séminal seraient en faveur d'une plus grande réceptivité et d'un plus fort taux de réaccouplement de la femelle. Par ailleurs, chez *D. melanogaster*, le taux de réaccouplement des femelles peut être modulé par l'action de l'HJ *via* la régulation des phéromones sexuelles et des hydrocarbures cuticulaires (Bilen *et al.*, 2013 ; Bontonou *et al.*, 2015). Tout comme l'HJ, la voie de signalisation des ecdystéroïdes est essentielle dans la synthèse des phéromones pour la maintenance des lipides cuticulaires et des oenocytes tout au

long de la vie de l'adulte (Chiang *et al.*, 2016) et ces paramètres peuvent altérer aussi bien la physiologie reproductive que le comportement sexuel des individus traités.

Finalement, l'azadirachtine affecte la reproduction aussi bien chez les mâles et les femelles de *D. melanogaster*. Le niveau optimal de nutrition, déjà cité précédemment, est indispensable pour maximiser le succès reproducteur à travers l'initiation chez les femelles de réponses pré- et post-accouplements efficaces (Fricke *et al.*, 2008 ; Moghadam *et al.*, 2015). En outre, la nutrition et la reproduction sont deux processus régulés par l'insuline, l'HJ, les ecdystéroïdes et dépendent de leurs nombreuses interactions. Le stress oxydatif induit par l'azadirachtine chez *D. melanogaster* (Boulahbel *et al.*, 2015) peut également interagir avec les ecdystéroïdes et les voies de signalisation de l'insuline (Puig et Matilla, 2011).

L'azadirachtine montre une survie similaire à DL_{50} chez les mâles et les femelles de *D. melanogaster* (Oulhaci *et al.*, 2017). Cet effet a été aussi trouvé chez d'autres espèces comme *Blatta orientalis* traité avec l'azadirachtine (Tine *et al.*, 2011) ou *Blattella germanica* traité avec le spinosad (un autre pesticide naturel) (Maiza *et al.*, 2013). Néanmoins, chez *Blattella germanica* et pour plusieurs autres pesticides (bendiocarbe, chlorpyrifos, cyfluthrine, cypermethrine, fenvalerate, hydramethylnon, malathion, propetamphos, propoxur et pyrethrins) une différence de toxicité (DL_{50}) a été observée entre les mâles et les femelles, mais aussi entre les femelles, gravides ou non (Abd-Elghafar *et al.*, 1990). Les pesticides peuvent, cependant, agir différemment dans la même espèce. En effet, chez *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera) l'exposition à la Bêta-cypermethrin (DL_{20}) induit une diminution de la production de phéromone sexuelle spécifique mâle et du taux d'accouplement mais sans diminuer l'activité locomotrice de mâles traités, tandis que l'exposition au spinosad (DL_{20}) cause une diminution significative dans l'activité locomotrice mâle de *T. chilonis*, mais n'affecte pas la production de phéromone sexuelle spécifique mâle ou le taux d'accouplement (Wang *et al.*, 2017).

Ainsi, ce travail a mis en évidence l'impact de l'azadirachtine sur la reproduction de *D.melanogaster* après 24 heures de traitement avec des effets délétères sur les différentes étapes de ce processus. L'impact de l'azadirachtine peut s'expliquer par son action sur l'HJ, les ecdystéroïdes (Mordue *et al.*, 2005, 2010) et l'insuline (Shao *et al.*, 2016) ; néanmoins, les interrelations entre ces diverses voies de signalisations mais aussi la connexion étroite entre les systèmes endocrine, neuroendocrine et nerveux suggèrent également des actions indirectes de l'azadirachtine (Toivonen et Partridge, 2009; Nässel et Broeck, 2016 ; Rauschenbach *et al.*, 2017).

L'étude des effets sublétaux des pesticides (comme l'azadirachtine et autres molécules à faible impact environnemental) sont particulièrement importants car ils peuvent permettre une meilleure compréhension des mécanismes toxicologiques induits par le traitement. Par conséquent, le choix des pesticides dans le domaine appliqué (utilisés en traitement seul ou combiné) peut être facilité.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'application topique d'une formulation commerciale d'azadirachtine, le Neem-Azal, chez les adultes nouvellement émergés de *D. melanogaster* met en évidence des effets toxiques, après seulement 24 heures de traitement. L'azadirachtine agit avec un effet dose-dépendant et induit une mortalité qui reste comparable en fonction du temps après traitement (de 24 à 144 heures). Les doses létales déterminées, telle que la DL_{50} (0,67 μ g), sont atteintes avec des valeurs beaucoup plus fortes de produit chez *D. melanogaster* comparativement à d'autres diptères ravageurs ; cette espèce non visée par les traitements insecticides semble donc moins sensible à l'azadirachtine.

Toutefois, l'azadirachtine réduit dans toutes les conditions testées le nombre d'individus (oeufs, larves, pupes et adultes), issus des couples adultes qui ont survécu au traitement ; cependant, la plus grande sensibilité, notée chez les femelles traitées, pourrait s'expliquer par une physiologie distincte entre les sexes. La diminution dans la fertilité et la fécondité chez les adultes de *D. melanogaster* semble liée à la diminution significative du nombre de cystes chez les mâles et d'ovocytes chez les femelles ; par ailleurs, la baisse dans le volume de l'ovocyte basal et l'augmentation des anomalies dans les spermatocytes supportent la réduction de la capacité reproductive observée chez les adultes. Cet impact peut aussi être relié à la régression dans le pourcentage des accouplements qui est observée dans toutes les conditions testées (non choix, choix du mâle et choix de la femelle) et tout particulièrement lorsque le mâle est traité.

La capacité d'accouplement des mâles pourrait être affectée par la diminution de leur activité ou mobilité et ceci malgré des rythmes nycthéméraux similaires aux individus témoins. La diminution des accouplements, chez les mâles traités, pourrait aussi être liée à un impact de l'azadirachtine sur de nombreuses modalités sensorielles comme l'olfaction. En outre, l'état physiologique de la femelle comme une attractivité sexuelle diminuée pourrait

aussi être la cause de l'absence d'accouplement. Par ailleurs, une action inhibitrice de l'azadirachtine sur la capacité reproductrice des adultes de *D. melanogaster* via la voie des neuromodulateurs n'est pas à exclure.

La réduction des accouplements explique, également, la baisse de la fertilité ou la stérilité observée ; cependant, l'azadirachtine ne montre aucun effet sur le stockage des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles (spermathèque et réceptacle ventral) quand les accouplements se produisent. Par conséquent, l'utilisation du sperme pourrait être affectée par un blocage éventuel au niveau du tractus génital. La stérilité des femelles est positivement corrélée avec un nombre croissant de ré-accouplement et la diminution de la capacité reproductrice pourrait expliquer l'augmentation des réaccouplements quand les deux sexes sont traités. En outre, des modifications potentielles dans le fluide séminal pourraient être en faveur de l'augmentation de la réceptivité de la femelle et du taux de réaccouplement.

L'impact de l'azadirachtine sur tous les événements reproductifs cités ci-dessus est expliqué via une action inhibitrice sur l'HJ et les ecdystéroïdes ou encore un impact sur la voie de signalisation de l'insuline. En outre, les interactions entre l'insuline, l'HJ et l'ecdysone sont clairement établies dans la littérature et le lien entre l'insuline et les neuromodulateurs (DA par exemple) vient d'être mis en évidence (Rauschenbach *et al.*, 2017). En outre, le contrôle nerveux régulant ces différents éléments pourrait être affecté, via le blocage des canaux calciques voltage-dépendants, de par l'action neurotoxique de l'azadirachtine. Ainsi, l'inhibition de la reproduction chez *D. melanogaster* induit par l'azadirachtine peut être expliquée par une action directe et/ou indirecte ou encore par des effets domino sur le système endocrine, neuroendocrine et neuronal. Des nouvelles investigations sont nécessaires pour une meilleure compréhension de ces effets et particulièrement pour comprendre la différence de sensibilité entre les sexes.

Les outils moléculaires disponibles sur le modèle *D. melanogaster* combinés à

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

différentes méthodes de dosage de molécules devraient contribuer à une meilleure compréhension du ou des mécanismes d'action de l'azadirachtine.

Ainsi il pourrait être envisagé de :

- Inhibition de l'expression des gènes par ARNi qui permettrait peut-être d'en savoir plus sur chacune des voies de signalisation.
- Après extraction des ARN, mesurer par PCR le niveau de transcription des différents gènes du métabolisme pour déterminer l'action de l'azadirachtine au niveau de la transcription.
- Quantifier l'expression des marqueurs des différents types cellulaires aux différents stades de différenciation de la spermatogenèse par PCR (réaction en chaîne par polymérase) en temps réel des individus traités afin de déterminer précisément l'origine de l'infertilité chez les mâles.
- Effet de l'azadirachtine sur la survie et la productivité de l'injection dans l'abdomen des femelles des protéines des glandes accessoires mâles traités ou non afin d'analyser l'impact de l'azadirachtine dans toutes les étapes de la fécondation.

L'ensemble de ces expérimentations pourront certainement apporter des précisions quant aux différents scénarios proposés ici jouant un rôle déterminant dans la déficience de la fonction reproductrice observée. Ainsi, les futures recherches auront pour objectif de tenter d'apporter des réponses aux questions essentielles sur le mode d'action de l'azadirachtine et sur les voies de signalisation concernées comme l'HJ, la 20E et l'insuline :

1. l'une de ces voies est-elle ciblée en premier ou non ?
2. Comment se produit l'effet domino de par l'interaction de ces différentes voies ?
3. Du fait de leur lien étroit, le système nerveux (et les neuromodulateurs) est-il impacté avant ou après le système endocrine ?

Parallèlement à la biologie moléculaire, divers traitements combinés (azadirachtine-HJ-20E)

pourront aussi aider à mieux comprendre les interactions entre les voies de signalisation HJ-20E et à préciser quel est le signal dominant qui induit toute la cascade d'événements. En effet, Boulahbel *et al.*, (2015) montrent chez *D. melanogaster* que l'application de la 20E, 24 à 48 heures après le traitement semble compenser les effets dépressifs induits par l'azadirachtine. Par ailleurs, la voie de signalisation de l'insuline, étroitement liée à celles de la 20E et de l'HJ ne devra pas être écartée dans ces expérimentations.

Ces perspectives de recherche fondamentale n'excluent pas l'apport d'informations intéressantes que peuvent fournir nos résultats sur le terrain. En effet, l'azadirachtine, largement recommandé dans les programmes de gestion des espèces nuisibles (Tomé *et al.*, 2013) peut être utilisé dans le contrôle d'une espèce invasive *Drosophila suzukii* qui cause des dégâts considérables sur une très large variété de fruits d'intérêt économique (Andreazza *et al.*, 2017). L'utilisation de l'azadirachtine devra se faire dans le cadre d'une lutte intégrée et en tenant compte des cycles de développement des ennemis naturels potentiels mais aussi des organismes non visés. De ce point de vu, un suivi plus large de la biodiversité dans et autour des espaces traités devrait permettre d'apporter des éléments contribuant à évaluer l'impact environnemental de ce type de pesticide.

Cette thèse a ainsi permis de mettre en évidence des effets importants sur la reproduction et le succès reproducteur, tant des mâles que des femelles, chez une espèce d'insecte non cible vis-à-vis des ravageurs de cultures. Elle vient alimenter un ensemble de résultats indiquant les effets très larges de l'azadirachtine sur une grande diversité d'espèces, y compris chez les vertébrés. De telles études sont importantes pour interroger les conditions d'usage de ces molécules dans la nature et promouvoir des pratiques alternatives plus respectueuses de la biodiversité et de l'environnement. Le domaine médical pourrait aussi bénéficier de ces études de par, l'utilisation de l'azadirachtine dans diverses pathologies dont le cancer (Hao *et al.*, 2014).

RESUMES

RESUME

L'azadirachtine, pesticide naturel le plus utilisé en agriculture, représente une alternative aux insecticides conventionnels. Cependant, ses effets sur la reproduction, la compréhension de son mode d'action et son impact sur les organismes non visés doivent être précisés. Aussi, les effets létaux et sublétaux de l'azadirachtine, sur la reproduction chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster* (Meigen) ont été examinés. L'évaluation de la survie de la descendance a été effectuée en tenant compte de divers paramètres de reproduction : la spermatogenèse, l'ovogenèse, les anomalies gamétiques, la fécondité, l'accouplement en conditions de choix et de non choix, la fertilité, la réceptivité sexuelle de la femelle et la mobilité du mâle.

Les effets d'une formulation commerciale de l'azadirachtine, le Neem-Azal, ont tout d'abord été évalués sur la toxicité de cette molécule chez *D. melanogaster*. Différentes doses variant entre 0,1 et 1,2 µg ont été utilisées par application topique sur des adultes nouvellement émergés et les tests de toxicité classique ont permis la détermination des différentes doses létales (DL). Les DL₂₅ et DL₅₀ obtenues à partir d'une courbe dose-réponse et correspondant à une mortalité de 25 et 50% sont de 0,23 µg et 0,63 µg respectivement.

L'azadirachtine, testée aux deux doses, montre un impact négatif sur la descendance au cours de la première génération en réduisant, de façon proportionnelle à la dose, le nombre d'individus à 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 mais une plus grande sensibilité des femelles est notée.

L'insecticide, testé à la DL₅₀ induit une réduction significative du nombre d'ovocytes chez les femelles et de cystes chez les mâles mais aussi une diminution de la taille de l'ovocyte basal, ainsi qu'une augmentation des anomalies de positionnement des noyaux de spermatocyte. L'azadirachtine réduit, en outre, les accouplements dans les conditions de choix et non choix d'une manière significative et particulièrement quand le mâle est traité ; il n'y a cependant aucun effet sur le stockage des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles. L'insecticide réduit d'une manière significative l'activité locomotrice des mâles mais augmente d'une manière significative les réaccouplements des femelles et leur stérilité surtout quand les deux sexes sont traités.

Ainsi, l'azadirachtine affecte la reproduction chez les mâles et les femelles de *D. melanogaster* via les événements pré et post-copulatoires. Ces résultats obtenus chez cet insecte modèle pourront être utiles pour préciser le mécanisme d'action de ce pesticide mais aussi permettre une gestion plus raisonnée dans les programmes de lutte intégrée.

Mots clés : Toxicité, Azadirachtine, Reproduction, *D. melanogaster*.

ABSTRACT

Azadirachtin, the most widely used natural pesticide in agriculture, is an alternative to conventional insecticides. However, its effects on reproduction, the understanding of its mode of action and its impact on non-target organisms need to be specified. Also, the lethal and sublethal effects of azadirachtin, on the reproduction in a model insect, *Drosophila melanogaster* (Meigen) were examined. The evaluation of the survival of the offspring was made by taking into account various reproductive parameters: the spermatogenesis, the oogenesis, the gametic abnormalities, the fecundity, the mating in choice and no choice conditions, the fertility, the female sexual receptivity and the motility of the male.

The effects of a commercial formulation of azadirachtin, Neem-Azal, were first evaluated on the toxicity of this molecule in *D. melanogaster*. Different doses ranging from 0.1 to 1.2 µg were used topically in newly emerged adults, and conventional toxicity tests allowed the determination of different lethal doses (LD). The LD₂₅ and LD₅₀ obtained from a dose-response curve and corresponding to a mortality of 25 and 50% are 0.23 µg and 0.63 µg respectively.

Azadirachtin, tested at both doses, showed a negative impact on the offspring during the first generation by reducing, in proportion to the dose, the number of individuals at all stages of development (eggs, larvae, pupae and adults). This reduction in fecundity and fertility is observed in different conditions of mating from treated males or females but a greater sensitivity of the females is noted.

The insecticide, tested at the LD₅₀ induces a significant reduction in the number of oocytes in females and cysts in males, but also a decrease in the size of the basal oocyte, as well as an increase in the anomalies of the nuclei position of spermatocytes. Azadirachtin further reduces matings in choice and no choice conditions in a significant way and especially when the male is treated; however, there is no effect on the storage of sperm in the female genital tract. The insecticide significantly reduces the locomotor activity of males but significantly increases females remating and sterility especially when both sexes are treated.

Thus, azadirachtin affects reproduction in males and females of *D. melanogaster* via pre- and post-copulatory events. These results obtained in this model insect may be useful to clarify the mechanism of action of this pesticide and may also give indications for a more reasoned management in integrated pest management programs.

Key words: Toxicity, Azadirachtin, Reproduction, *D. melanogaster*.

ملخص

يعد الـ Azadirachtine من أكثر المبيدات الطبيعية استخداماً في الزراعة كبديلاً للمبيدات التقليدية، لذلك فإنه من المهم توضيح أثاره على التكاثر وفهم أسلوب عمله على الكائنات غير المستهدفة. تهدف دراستنا إلى فحص الآثار المميتة و الشبه مميتة لهذا المبيد على تكاثر الحشرة النموذج "ذبابة الفواكه" *Drosophila melanogaster* (Meigen)، وعليه فقد تم تقييم النسل مع الأخذ بعين الاعتبار مختلف المعالم الإنجابية كتصنيع الحيوانات المنوية، تصنيع البويضات، تشوهات الأمشاج، القدرات الإنجابية، الإقتران في ظروف الاختيار و عدم الاختيار، الخصوبة، النقبل الجنسي للإناث و تنقل الذكور.

تم تقييم أثار صياغة تجارية من Azadirachtine المسماة بـ Neem azal، على سمية هذا المركب عند *D. melanogaster*. استخدمت جرعات مختلفة تتراوح بين 0,1 و 1,2 µg بواسطة التطبيق الموضعي على الحشرات مكتملة النمو، الإختبارات السمية التقليدية سمحت بتحديد جرعات مميتة مختلفة (DL)، تم الحصول على DL₂₅ و DL₅₀ من منحنى الجرعة والاستجابة و المطابقة لوفيات 25 و 50 % هي 0,23 و 0,63 µg على التوالي. في سلسلة أولى من التجارب أظهر اختبار Azadirachtine بالجرعتين DL₂₅ و DL₅₀، تأثيراً سلبياً على أبناء الجيل الأول عن طريق الحد من عدد الأفراد في جميع مراحل التطور (بويضات، يرقات، عذارى و الكبار) يعود هذا الانخفاض إلى اختلال القدرات الإنجابية و الخصوبة لمختلف الأزواج مع تسجيل حساسية أكبر للإناث. إختبار مبيد الحشرات بالجرعة DL₅₀ يؤدي إلى إنخفاض كبير في عدد البويضات عند الإناث و النطاف عند الذكور و لكن أيضاً إنخفاض في حجم البويضة القاعدية، وزيادة في حالات الشوذ لمواقع النوى للنطاف، كما يقلل Azadirachtine من الإقترانات في ظروف الإختيار و عدم الإختيار بطريقة هامة و خاصة عند معالجة الذكور، و مع ذلك ليس هناك تأثير على تخزين الحيوانات المنوية في الجهاز التناسلي للإناث. مبيد الحشرات يقلل بشكل كبير من النشاط الحركي للذكور مع زيادة كبيرة في إعادة الإقتران و العقم للإناث و خصوصاً عندما يتم علاج كلا الجنسين. وهكذا، فإن Azadirachtine يؤثر على التكاثر لدى الذكور و الإناث لـ *D. melanogaster* عن طريق الأحداث ما قبل و ما بعد التكاثر، و قد تكون هذه النتائج التي تم الحصول عليها عند هذه الحشرة النموذجية مفيدة لتوضيح آلية عمل هذا المبيد و لكن تسمح أيضاً بإدارة منطوقية أكبر في برامج مكافحة متكاملة للآفات.

الكلمات الرئيسية: السمية، Azadirachtine، التكاثر، *D. melanogaster*.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267.

Abd-Elghafar, S. F., Appel, A. G. et Mack, T. P. (1990). Toxicity of several insecticide formulations against adult German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(6), 2290-2294.

Abedi, Z., Saber, M., Vojoudi, S., Mahdavi, V. et Parsaeyan, E. (2014). Acute, sublethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science*, 14(30), 1-9.

Abreu-Villaça, Y. et Levin, E. D. (2016). Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environment international*, 99, 55-77.

Ahmad, M. et Arif, M. I. (2010). Resistance of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to endosulfan, organophosphorus and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Crop Protection*, 29(12), 1428-1433.

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

Alvarez, C. C., Causton, C. E., Hoddle, M. S., Hoddle, C. D., van Driesche, R. et Stanek, E. J. (2012). Monitoring the effects of *Rodolia cardinalis* on *Icerya purchasi* populations on the Galapagos Islands. *BioControl*, 57(2), 167-179.

Ameku, T. et Niwa, R. (2016). Mating-induced increase in germline stem cells via the neuroendocrine system in female *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 12(6), e1006123.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andreazza, F., Bernardi, D., Baronio, C. A., Pasinato, J., Nava, D. E. et Botton, M. (2017).** Toxicities and effects of insecticidal toxic baits to control *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Pest Management Science*, 73(1), 146-152.
- Argue, K. J., Yun, A. J. et Neckameyer, W. S. (2013).** Early manipulation of juvenile hormone has sexually dimorphic effects on mature adult behavior in *Drosophila melanogaster*. *Hormones and Behavior*, 64(4), 589-597.
- Aribi, N., Oulhaci, C. M., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J. C., Kaiser, L., Denis, B. et Joly, D. (2017).** Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 95-101.
- Aribi, N., Quennedey, A., Soltani, N. et Delbecque, J. P. (1999).** L'initiation de la métamorphose chez *Zophobas atratus* Fab.: Effets des ligatures et des régulateurs de croissance (Coleoptera: Tenebrionidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 35, 59-64).
- Aribi, N., Smagghe, G., Lakbar, S., Soltani-Mazouni, N. et Soltani, N. (2006).** Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(1), 55-62.
- Asaduzzaman, M., Shim, J. K., Lee, S. et Lee, K. Y. (2016).** Azadirachtin ingestion is lethal and inhibits expression of ferritin and thioredoxin peroxidase genes of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(1), 1-4.
- Avila, F. W., Qazi, M. C. B., Rubinstein, C. D. et Wolfner, M. F. (2012).** A requirement for the neuromodulators octopamine and tyramine in *Drosophila melanogaster* female spermstorage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4562-4567.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Avila, F. W., Sirot, L. K., LaFlamme, B. A., Rubinstein, C. D. et Wolfner, M. F. (2011).** Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annual Review of Entomology*, 56, 21-40.
- Banerjee, A., Manna, S. et 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 Meyer, L., Guedes, R. N. C. et Smagghe, G. (2015).** Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*, 24(1), 130-142.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A. et García-del-Pino, F. (2010).** Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *BioControl*, 55(4), 523-530.
- Benchabane, S., Aribi, N., Kilani-Morakchi, S. et Chaabane, M. (2016).** Delayed toxic effects of spinosad on G1 progeny of an invasive species, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *African Entomology*, 24(2), 412-420.
- Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Murugan, K., Pavela, R. et Nicoletti, M. (2017).** Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide?. *Natural product research*, 31(4), 369-386.
- Bernardes, R. C., Tomé, H. V., Barbosa, W. F., Guedes, R. N. et Lima, M. A. P. (2016).** Azadirachtin-induced antifeeding in neotropical stingless bees. *Apidologie*, 48(3), 275-285.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Besard, L., Mommaerts, V., Abdu-Alla, G. et Smagghe, G. (2011).** Lethal and sublethal side-effect assessment supports a more benign profile of spinetoram compared with spinosad in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Pest Management Science*, 67(5), 541-547.
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S. et Aribi, N. (2016).** Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 85-90.
- Bilen, J., Atallah, J., Azanchi, R., Levine, J. D. et Riddiford, L. M. (2013).** Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18321-18326.
- Birch, A. N. E., Begg, G. S. et Squire, G. R. (2011).** How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3251-3261.
- Blaney, W. M., Simmonds, M. S. J., Ley, S. V., Anderson, J. C. et Toogood, P. L. (1990).** Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 55(2), 149-160.
- Bliss, C. I. (1938).** The determination of the dosage-mortality curve from small numbers. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 192-216.
- Boeke, S. J., Boersma, M. G., Alink, G. M., van Loon, J. J., van Huis, A., Dicke, M. et Rietjens, I. M. (2004).** Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 25-41.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bontonou, G., Shaik, H. A., Denis, B. et Wicker-Thomas, C. (2015).** Acp70A regulates *Drosophila* pheromones through juvenile hormone induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 36-49.
- Boulahbel, B., Aribi, N., Kilani-Morakchi, S. et Soltani, N. (2015).** Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone. *African Entomology*, 23(1), 224-233.
- Bruce, T. J. (2010).** Tackling the threat to food security caused by crop pests in the new millennium. *Food Security*, 2(2), 133-141.
- Campos-Herrera, R., Jaffuel, G., Chiriboga, X., Blanco-Pérez, R., Fesselet, M., Půža, V., Mascher, F. et Turlings, T. C. J. (2015).** Traditional and molecular detection methods reveal intense interguild competition and other multitrophic interactions associated with native entomopathogenic nematodes in Swiss tillage soils. *Plant and Soil*, 389(1-2), 237-255.
- Cantrell, C. L., Dayan, F. E. et Duke, S. O. (2012).** Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1231-1242.
- Capinera, J. L. et Froeba, J. G. (2007).** Behavioral responses of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) to azadirachtin (neem)-treated host plants. *Journal of economic entomology*, 100(1), 117-122.
- Casida, J. E. et Durkin, K. A. (2013).** Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of Entomology*, 58, 99-117.
- Celestino, D., Braoios, G. I., Ramos, R. S., Gontijo, L. M. et Guedes, R. N. C. (2014).** Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallens*. *Biological Control*, 59(6), 697-705.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chailleux, A., Bearez, P., Pizzol, J., Amiens-Desneux, E., Ramirez-Romero, R. et Desneux, N. (2013).** Potential for combined use of parasitoids and generalist predators for biological control of the key invasive tomato pest *Tuta absoluta*. *Journal of pest science*, 86(3), 533-541.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J. et Grant, W. P. (2011).** The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998.
- Charleston, D. S., Kfir, R., Dicke, M. et Vet, L. E. (2006).** Impact of botanical extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella xylostella* and its natural enemies: A field test of laboratory findings. *Biological Control*, 39(1), 105-114.
- Chaudhary, S., Kanwar, R. K., Sehgal, A., Cahill, D. M., Barrow, C. J., Sehgal, R. et Kanwar, J. R. (2017).** Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Frontiers in Plant Science*, 8, 610.
- Chen, L. L., Wang, H. C., Huang, C. J., Peng, S. E., Chen, Y. G., Lin, S. J., Chen, W. Y., Dai, C. F., Yu, H. T., Wang, C. H., Lo, C. F. et Kou, G. H. (2002).** Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology*, 301(1), 136-147.
- Chen, P. S., Stumm-Zollinger, E., Aigaki, T., Balmer, J., Bienz, M. et Böhlen, P. (1988).** A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 54(3), 291-298.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen, Q., Zeng, J., Zeng, W., Li, Q., Chen, X. et Zou, Y. (2017).** Application of the morphological indicators of the male internal reproductive system in forecasting the population dynamics of the rice leaf roller, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) by sex pheromone trapping. *Acta Entomologica Sinica*, 60(8), 927-935.
- Chiang, Y. N., Tan, K. J., Chung, H., Lavrynenko, O., Shevchenko, A. et Yew, J. Y. (2016).** Steroid hormone signaling is essential for pheromone production and oenocyte survival. *PLoS Genetics*, 12(6), e1006126.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S. et Léopold, P. (2006).** Stéroïdes, insuline et croissance : les mouches dopent la recherche. *Médecine/Sciences*, 22(3), 241-243.
- Comoretto, L. et Chiron, S. (2005).** Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Science of the total Environment*, 349(1), 201-210.
- Contreras, J., Mendoza, J. E., Martínez-Aguirre, M. R., García-Vidal, L., Izquierdo, J. et Bielza, P. (2014).** Efficacy of enthomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of economic entomology*, 107(1), 121-124.
- Cordeiro, E. M. G., Corrêa, A. S., Venzon, M. et Guedes, R. N. C. (2010).** Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. *Chemosphere*, 81(10), 1352-1357.
- Daas-Maamcha, O., Houd-Chaker, K. et Soucha, M. (2013).** Effects of an Ecdysteroid Analog (RH-0345) on the ovarian and testicular components of *Eupolybothrus nudicornis* (Myriapoda: Chilopoda). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 6(2), 91-98.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Da Costa, J. T., Forim, M. R., Costa, E. S., De Souza, J. R., Mondego, J. M. et Junior, A. L. B. (2014).** Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833)(Coleoptera: Bruchidae) on beans. *Journal of Stored Products Research*, 56, 49-53.
- Dallaire, R., Labrecque, A., Marcotte, M., Bauce, E. et Delisle, J. (2004).** The sublethal effects of tebufenozide on the precopulatory and copulatory activities of *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 112(3), 169-181.
- Dammak, M., Khedher, S. B., Boukedi, H., Chaib, I., Laarif, A. et Tounsi, S. (2016).** Involvement of the processing step in the susceptibility/tolerance of two lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Pesticide biochemistry and physiology*, 127, 46-50.
- De Andrade-Coelho, C. A., De Souza, N. A., Silva, V. C., Souza, A. A., Gonzalez, M. S. et Rangel, E. F. (2014).** Effects of azadirachtin on the biology of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) adult female, the main vector of American visceral leishmaniasis. *Journal of Medical Entomology*, 51(4), 891-895.
- Dembo, E. G., Abay, S. M., Dahiya, N., Ogboi, J. S., Christophides, G. K., Lupidi, G., Chianese, G., Lucantoni, L. et Habluetzel, A. (2015).** Impact of repeated NeemAzal®-treated blood meals on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 8(1), 94.
- Demerec, M. (1950).** Biology of Drosophila. New York, J. Wiley et Sons, Inc.
- Deravel, J., Krier, F. et Jacques, P. (2014).** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 18(2), 220-232.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dere, B., Altuntaş, H. et Nurullahoğlu, Z. U. (2015).** Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* l. (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 89(3), 138-152.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A. et Smagghe, G. (2010).** Insect growth and development disrupting insecticides. In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds). *Insect Control*. Elsevier, New York. USA. 121-166.
- Dias, C. N. et Moraes, D. F. C. (2014).** Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) larvicides. *Parasitology research*, 113(2), 565-592.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G. et Pennacchio, F. (2013).** Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18466-18471.
- Dominguez, A., Puigmartí, M., Bosch, M. P., Rosell, G., Crehuet, R., Ortiz, A., Quero, C. et Guerrero, A. (2016).** Synthesis, functional assays, electrophysiological activity, and field tests of pheromone antagonists of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(18), 3523-3532.
- Dong, H. et Zhang, D. (2014).** Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species. *Microbial cell factories*, 13(1), 63.
- Dubrovsky, E. B. (2005).** Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(1), 6-11.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Efrom, C. F. S., Redaelli, L. R., Meirelles, R. N. et 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.
- Evans, B. G. et Hallett, R. H. (2016).** Efficacy of biopesticides for management of the swede midge (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Economic Entomology*, 109(5), 2159-2167.
- FAO.** Food and agriculture organization of the United Nations. FAOSTAT; 2012. [www.faostat.fao.org].
- Fisher, R. A. et Yates, F. (1957).** Statical tables for biological agricultural and medical research. 5^{eme} edition, Olivier et Boyd. London. 64-66.
- Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., Chapin, F. S., Coe, M. T., Daily, G. C., Gibbs, H. K., Helkowski, J. H., Holloway, T., Howard, E. A., Kucharik, C. J., Monfreda, C., Patz, J. A., Prentice, I. C., Ramankutty, N. et Snyder, P. K. (2005).** Global consequences of land use. *science*, 309(5734), 570-574.
- Freney, J. R. (1986).** Forms and reactions of organic sulfur compounds in soils. *Sulfur in agriculture*. 207-232.
- Fricke, C., Bretman, A. et Chapman, T. (2008).** Adult male nutrition and reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 62(12), 3170-3177.
- Friedrich, J., Sorge, S., Bujupi, F., Eichenlaub, M. P., Schulz, N. G., Wittbrodt, J. et Lohmann, I. (2016).** Hox function is required for the development and maintenance of the *Drosophila* feeding motor unit. *Cell Reports*, 14(4), 850-860.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fries, I. (2010).** *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, 103, S73-S79.
- Gagné, F., Pardos, M. et Blaise, C. (1999).** Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(6), 723-730.
- Galm, U. et Sparks, T. C. (2016).** Natural product derived insecticides: discovery and development of spinetoram. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 43(2-3), 185-193.
- Garza-Hernández, J. A., Reyes-Villanueva, F., Russell, T. L., Braks, M. A., Garcia-Munguia, A. M. et Rodríguez-Pérez, M. A. (2015).** Copulation activity, sperm production and conidia transfer in *Aedes aegypti* males contaminated by *Metarhizium anisopliae*: A biological control prospect. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(10), e0004144.
- Gaston, L. K., Shorey, H. H. et Saario, C. A. (1967).** Insect population control by the use of sex pheromones to inhibit orientation between the sexes. *Nature*, 213(5081), 1155-1155.
- Ghanim, M. et Ishaaya, I. (2010).** Insecticides with novel modes of action: mechanism and resistance management. In: Ishaaya, I. and Degheele, D. (eds). *Insecticides with novel modes of action: mechanism and application*. Springer, Berlin. 385–407.
- Ghormade, V., Deshpande, M. V. et Paknikar, K. M. (2011).** Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*, 29(6), 792-803.
- Goldberg, H. (1977).** The hazards of being male. New York: New American Library.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gore, J. C., Zurek, L., Santangelo, R. G., Stringham, S. M., Watson, D. W. et Schal, C. (2004).** Water solutions of boric acid and sugar for management of German cockroach populations in livestock production systems. *Journal of economic entomology*, 97(2), 715-720.
- Govindarajan, M. et Rajeswary, M. (2015).** Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. (Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 114(5), 1949-1961.
- Griffith, C. M., Woodrow, J. E. et Seiber, J. N. (2015).** Environmental behavior and analysis of agricultural sulfur. *Pest management science*, 71(11), 1486-1496.
- Gromko, M. H., Gilbert, D. G. et Richmond, R. C. (1984).** Sperm transfer and use in the multiple mating system of *Drosophila*. In: Smith, R. L. (Eds). *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press Inc, Orlando. 371-426.
- Gruntenko, N. E., Karpova, E. K., Alekseev, A. A., Chentsova, N. A., Bogomolova, E. V., Bownes, M. et Rauschenbach, I. Y. (2007).** Effects of octopamine on reproduction, juvenile hormone metabolism, dopamine, and 20-hydroxyecdysone contents in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 65(2), 85-94.
- Gruntenko, N. E., Karpova, E. K., Alekseev, A. A., Chentsova, N. A., Saprykina, Z. V., Bownes, M. et Rauschenbach, I. Y. (2005).** Effects of dopamine on juvenile hormone metabolism and fitness in *Drosophila virilis*. *Journal of Insect Physiology*, 51(9), 959-968.
- Gupta, R. C. et Milatovic, D. (2014).** Insecticides. In: Gupta, R.C. (Ed). *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, Elsevier, Amsterdam. 389-407.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Habes, D., Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J. P. et Soltani, N. (2006).** Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(1), 17-24.
- Hao, F., Kumar, S., Yadav, N. et Chandra, D. (2014).** Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846(1), 247-257.
- Hasan, F. et Ansari, M. S. (2011).** Toxic effects of neem-based insecticides on *Pieris brassicae* (Linn.). *Crop Protection*, 30(4), 502-507.
- Hoopfer, E. D. (2016).** Neural control of aggression in *Drosophila*. *Current opinion in neurobiology*, 38, 109-118.
- Huang, J. F., Shui, K. J., Li, H. Y., Hu, M. Y. et Zhong, G. H. (2011).** Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* Sl-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 16-24.
- Hummel, H. E., Langner, S. S., Hein, D. F., Sanguanpong, U. et Schmutterer, H. (2016).** Unusually versatile plant genus *Azadirachta* with many useful and so far incompletely exploited properties for agriculture, medicine and industry. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 18(5), 1269-175.
- Hunt, J., Breuker, C. J., Sadowski, J. A. et Moore, A. J. (2009).** Male–male competition, female mate choice and their interaction: determining total sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(1), 13-26.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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. et Mastuda, K. (2008).** Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invertebrate Neuroscience*. 8(2): 71-81.
- 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. *Annual Review of Entomology*., 51, 45-66.
- Isman, M. B. et Grieneisen, M. L. (2014).** Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends in Plant Science*, 19(3), 140-145.
- Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Büchi, L., Mäder, P., Fließbach, A., Charles, R., Degen, T., Turlings, T.C.J. et Campos-Herrera, R. (2017).** Effects of cover crops on the overwintering success of entomopathogenic nematodes and their antagonists. *Applied Soil Ecology*, 114, 62-73.
- Jagadeeshan, S., Shah, U., Chakrabarti, D. et Singh, R. S. (2015).** Female choice or male sex drive? The advantages of male body size during mating in *Drosophila melanogaster*. *PloS One*, 10(12), e0144672.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Jeschke, P. et Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science*, 64(11), 1084-1098.

JO Sénat du 07/08/2014-page1877.

Kaakeh, W., Scharf, M.E. et Bennett, G.W. (1997). Comparative contact activity and residual life of juvenile hormone analogs used for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control. *Journal of Economic Entomology*. 90(5): 1247-1253.

Kallman, B. R., Kim, H. et Scott, K. (2015). Excitation and inhibition onto central courtship neurons biases *Drosophila* mate choice. *Elife*, 4, e11188.

Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Ruditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I. et 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 Biochemistry and Molecular Biology*. 38(6): 634-644.

Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J. P., Smagghe, G. et Soltani, N. (2009). Halofenozide affects sexual behaviour, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Belgian Journal of Zoology*, 139(2), 147-155.

Kilani-Morakchi, S., Badi, A., Aribi, N., Farine, J. P. et Soltani, N. (2014). Toxicity of tebufenozide, an ecdysteroid agonist, to *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *African Entomology*, 22(2), 337-342.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kilani-Morakchi, S., Bezzar-Bendjazia, R., Ferdenache, M. et Aribi, N. (2017).** Preimaginal exposure to azadirachtin affects food selection and digestive enzymes in adults of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140, 58-64.
- Kimura, K. I., Sato, C., Koganezawa, M. et Yamamoto, D. (2015).** *Drosophila* ovipositor extension in mating behavior and egg deposition involves distinct sets of brain interneurons. *PloS One*, 10(5), e0126445.
- Kirst, H. A. (2010).** Spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *The Journal of Antibiotics. (Tokyo)*. 63(3): 101-111.
- Köhler, H. R. et 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. et Rajalakshmi, A. (2014).** Effects of neem azal 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.
- Koriem, K. M. (2013).** Review on pharmacological and toxicological effects of oleum azadirachtin oil. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(10), 834-840.
- Kristensen, M., Hansen, K.K. et Jensen, K.M. (2005).** Cross-resistance between dieldrin and fipronil in German cockroach (Diptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*. 98(4): 1305-1310.
- Lai, D., Jin, X., Wang, H., Yuan, M. et Xu, H. (2014).** Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *Journal of Biotechnology*, 185, 51-56.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Laurinyecz, B., Péter, M., Vedelek, V., Kovács, A. L., Juhász, G., Maróy, P., Vigh, L., Balogh, G. et Sinka, R. (2016). Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid composition and leads to male sterility in *Drosophila*. *Open Biology*, 6(1), 150169.

Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C. et Lapied, B. (2010). How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(1), 264-272.

Lee, K. M., Daubnerova, I., Isaac, R. E., Zhang, C., Choi, S., Chung, J. et Kim, Y. J. (2015). A neuronal pathway that controls sperm ejection and storage in female *Drosophila*. *Current Biology*, 25(6), 790-797.

Lee, K. P. (2015). Dietary protein: carbohydrate balance is a critical modulator of lifespan and reproduction in *Drosophila melanogaster*: a test using a chemically defined diet. *Journal of Insect Physiology*, 75, 12-19.

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. S., Guedes, N. M. P., Gontijo, L. M., Guedes, R. N. C. et Gondim Jr, M. G. C. (2015). Bioinsecticide-predator interactions: azadirachtin behavioral and reproductive impairment of the coconut mite predator *Neoseiulus baraki*. *PloS One*, 10(2), e0118343.

Lin, H. H., Cao, D. S., Sethi, S., Zeng, Z., Chin, J. S., Chakraborty, T. S., Shepherd, A. K., Nguyen, C. A., Yew, J. Y., Su, C. Y. et Wang, J. W. (2016). Hormonal modulation of pheromone detection enhances male courtship success. *Neuron*, 90(6), 1272-1285.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lin, W. Y., Williams, C., Yan, C., Koledachkina, T., Luedke, K., Dalton, J., Bloomsburg, S., Morrison, N., Duncan, K. E., Kim, C. C. et Parrish, J. Z. (2015).** The SLC36 transporter Pathetic is required for extreme dendrite growth in *Drosophila* sensory neurons. *Genes & Development*, 29(11), 1120-1135.
- Lindsley, D. L. et Tokuyasu, K. T. (1980).** The genetics and Biology of *Drosophila*. In: Ashburner, M. et Wright, T. R. F. (Eds). *Academic Press*. London, 2d, 226-287.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J. et Thomas, M. (2001).** Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual review of entomology*, 46(1), 667-702.
- Lone, S. R., Venkataraman, A., Srivastava, M., Potdar, S. et Sharma, V. K. (2015).** Or47b-neurons promote male-mating success in *Drosophila*. *Biology Letters*, 11(5), 20150292.
- Long, E.R. 2000.** Degraded sediment quality in US estuaries: a review of magnitude and ecological implications. *Ecological Applications*. 10 (2): 338-349.
- Lord, J. C. (2005).** From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of invertebrate pathology*, 89(1), 19-29.
- Lucantoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P. et Habluetzel, 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.
- Lumbreras, C. J., Galante, E. et Mena, J. (1991).** Ovarian condition as an indicator of the phenology of *Bubas bubalus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 84(2), 190-194.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Luna-Cruz, A., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J. R., Ortega-Arenas, L. D., Bautista-Martínez, N. et Pineda, S. (2015).** Toxicity and residual activity of insecticides against *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(5), 2289-2295.
- Lynn, O. M., Kim, J. E. et Lee, K. Y. (2012).** Effects of azadirachtin on the development and gene expression of fifth instar larvae of Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(1), 101-105.
- Ma, D. L., Gordh, G. et Zalucki, M. P. (2000).** Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on cotton and artificial diet. *Australian Journal of Entomology*, 39(4), 301-304.
- Machial, C. M., Shikano, I., Smirle, M., Bradbury, R. et Isman, M. B. (2010).** Evaluation of the toxicity of 17 essential oils against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest management science*, 66(10), 1116-1121.
- Maiza, A., Aribi, N., Smagghe, G., Kilani-Morakchi, S., Bendjedid, M. et Soltani, N. (2013).** Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad and indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*. *Bulletin of Insectology*. 66(1): 11-20.
- Majeed, Z. R., Abdeljaber, E., Soveland, R., Cornwell, K., Bankemper, A., Koch, F. et Cooper, R. L. (2016).** Modulatory action by the serotonergic system: behavior and neurophysiology in *Drosophila melanogaster*. *Neural Plasticity*, 2016.
- Mckay, T., Bianco, T., Rhodes, L. et Barnett, S. (2013).** Prevalence of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) in mosquitoes from northeast Arkansas, the United States. *Journal of Medical Entomology*. 50(4): 871-878.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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. et Chenchouni, H. (2014). Bacterial load of German cockroach (*Blattella germanica*) found in hospital environment. *Pathogens and Global Health.* 108(3):141-147.

Mertz, F.P. et Yao, R.C. (1990). *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology.* 40(1): 34–39.

Milusheva, E., Baranyi, M., Kittel, A., Sperlágh, B. et Vizi, E. S. (2005). Increased sensitivity of striatal dopamine release to H₂ O₂ upon chronic rotenone treatment. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(1), 133-142.

Mkenda, P., Mwanauta, R., Stevenson, P. C., Ndakidemi, P., Mtei, K. et Belmain, S. R. (2015). Extracts from field margin weeds provide economically viable and environmentally benign pest control compared to synthetic pesticides. *PloS One*, 10(11), e0143530.

Moghadam, N. N., Holmstrup, M., Manenti, T., Mouridsen, M. B., Pertoldi, C. et Loeschcke, V. (2015). The role of storage lipids in the relation between fecundity, locomotor activity, and lifespan of *drosophila melanogaster* longevity-selected and control lines. *PloS One*, 10(6), e0130334.

Montchamp-Moreau, C. et Joly, D. (1997). Abnormal spermiogenesis is associated with the X-linked sex-ratio trait in *Drosophila simulans*. *Heredity*, 79(1), 24-30.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D. et Nisbet, A.J. (2005).** Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. et Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, UK. 6, 117–135.
- Mordue, L.A.J., Morgan, E.D. et Nisbet, A.J. (2010).** Addendum: Azadirachtin, a natural product in insect control: An update. In: Gilbert, L.I. et Gill, S.S. (Eds). *Insect Control*. Elsevier, Oxford, UK. 204–206.
- Nässel, D. R. et Broeck, J. V. (2016).** Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2), 271-290.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher U., Salgado, V.L. et Kaussman, M. (2003).** Thiamethoxamis a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry Physiology*. 76: 55-69.
- Neckameyer, W. S. (1996).** Multiple roles for dopamine in *Drosophila* development. *Developmental Biology*, 176(2), 209-219.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. et Hens, L. (2016).** Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4.
- Oberlander, H. et Silhacek, D.L. (1998).** New perspectives on the mode of action of benzoylphenyl urea insecticides. In: Ishaaya, I. and Degheele, D. (Ed). *Insecticides with Novel modes of action: Mechanism and Application*. Springer. 92-105.
- Olson, S. (2015).** An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*, 26(5), 203-206.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z. et Keyhani, N. O. (2015).** Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1057-1068.
- Osorio, A., Martinez, A.M., Schneider, M.I., Diaz, O., Corrales, J.L., Aviles, M.C., Smagghe, G. et Pineda, S. (2008).** Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. *Pest Management Science*, 64(10): 1001–1007.
- Oulhaci, C. M., Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J. C., Kaiser, L., Joly, D. et Aribi, N. (2018).** Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Pest Management Science*, 74: 174-180.
- Pavela, R. et Benelli, G. (2016).** Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in plant science*, 21(12), 1000-1007.
- Pener, M. P. et Dhadialla, T. S. (2012).** An overview of insect growth disruptors; applied aspects. *Advances in Insect Physiology*, 43, 1-162.
- Pineda, S., Schneider, M. I., Smagghe, G., Martínez, A. M., Del Estal, P., Viñuela, E., Valle, J. et Budia, F. (2007).** Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 773-780.
- Piri, F., Sahragard, A. et Ghadamyari, M. (2014).** Sublethal effects of Spinosad on Some biochemical and biological parameters of *glyphodes pyloalis* walker. *Plant Protection Science*, 50, 135-144.
- Poland, T. M., Ciaramitaro, T. M. et McCullough, D. G. (2016).** Laboratory evaluation of the toxicity of systemic insecticides to emerald ash borer larvae. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 705-716.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Popp, J., Pető, K., et Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security. *Agronomy for sustainable development*, 33(1), 243-255.

Puig, O. et Mattila, J. (2011). Understanding forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(4), 635-647.

Qiao, J., Zou, X., Lai, D., Yan, Y., Wang, Q., Li, W., Deng, S., Xu, H. et 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.

Quennedey, A., Aribi, N., Everaerts, C. et Delbecq, J. P. (1995). Postembryonic development of *Zophobas atratus* Fab.(Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. *Journal of Insect Physiology*, 41(2), 143-152.

Quinn, L., Lin J., Cranna N., Lee J.E.A., Mitchell N. et 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.

Rauschenbach, I. Y., Karpova, E. K., Burdina, E. V., Adonyeva, N. V., Bykov, R. A., Ilinsky, Y. Y., Menshanov, N. E. et Gruntenko, N. E. (2017). Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females. *General and Comparative Endocrinology*, 243, 1-9.

Reddy, G. V., Antwi, F. B., Shrestha, G. et Kuriwada, T. (2016). Evaluation of toxicity of biorational insecticides against larvae of the alfalfa weevil. *Toxicology Reports*, 3, 473-480.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Regnault-Roger, C., Vincent, C. et Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual review of entomology*, 57, 405-424.

Remedio, R. N., Nunes, P. H., Anholeto, L. A., Oliveira, P. R. et 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). *Parasitology Research*, 114(2), 431-444.

Remedio, R. N., Nunes, P. H., Anholeto, L. A., Oliveira, P. R., Sá, I. C. G. et Camargo-Mathias, M. I. (2016). Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. *Micron*, 83, 19-31.

Rinkevich, F. D. et Scott, J. G. (2012). Reduction of *dADAR* activity affects the sensitivity of *Drosophila melanogaster* to spinosad and imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 104(2): 163-169.

Romani, P., Gargiulo, G. et Cavaliere, V. (2016). The ecdysone receptor signalling regulates microvilli formation in follicular epithelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2), 409-425.

Sadeghi, A., Van Damme, E. J. et Smagghe, G. (2009). Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *Journal of Insect Science*, 9(65), 1-8.

Sahu, S. S., Gunasekaran, K., Raju, H. K., Vanamail, P., Pradhan, M. M. et Jambulingam, P. (2014). Response of malaria vectors to conventional insecticides in the southern districts of Odisha State, India. *The Indian Journal of Medical Research*. 139 (2): 294-300.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Salehzadeh, A., Jabbar, A., Jennens, L., Ley, S. V., Annadurai, R. S., Adams, R. et Strang, R. H. C. (2002).** The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest Management Science*, 58(3), 268-276.
- 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. et Sparks, T.C. (2005).** The spinosyns: Chemistry, biochemistry, mode of action and resistance. In Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, Oxford, UK. 6: 137–173.
- Saravanan, K. S., Sindhu, K. M. et Mohanakumar, K. P. (2005).** Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. *Brain research*, 1049(2), 147-155.
- Sasaki, K., Akasaka, S., Mezawa, R., Shimada, K. et Maekawa, K. (2012).** Regulation of the brain dopaminergic system by juvenile hormone in honey bee males (*Apis mellifera* L.). *Insect Molecular Biology*, 21(5), 502-509.
- Saxena, A. et Kesari, V. P. (2016).** Lack of genotoxic potential of pesticides, spinosad, imidacloprid and neem oil in mice (*Mus musculus*). *Journal of Environmental Biology*, 37(2), 291.
- Schmutterer, H. (1990).** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual review of entomology*, 35(1), 271-297.
- Schmutterer, H. et Singh, R. P. (1995).** List of insect pests susceptible to neem products. The neem tree: *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceae plants. *VCH*, New York, 326-365.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Schoofs, L., De Loof, A. et Van Hiel, M. B. (2017). Neuropeptides as regulators of behavior in insects. *Annual Review of Entomology*, 62, 35-52.

Scudeler, E. L. et Santos, D. C. D. (2013). Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). *Micron*, 44, 125-132.

Seifert, J. (2014). Neonicotinoids. In: Wexler, P. (Ed). *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Elsevier, Oxford. 3: 477-481.

Senthil-Nathan, S. (2013). Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Frontiers in Physiology*, 4, 359.

Shaltiel-Harpaz, L., Gerling, D., Graph, S., Kedoshim, H., Azolay, L., Rozenberg, T., Nachache, Y., Steinberg, S., Allouche, A. et Alon, T. (2015). Control of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), in open-field tomatoes by indigenous natural enemies occurring in Israel. *Journal of economic entomology*, 109(1), 120-131.

Shannag, H. K., Capinera, J. L. et Freihat, N. M. (2015). Effects of neem-based insecticides on consumption and utilization of food in larvae of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 15(1), 152-165.

Shao, X., Lai, D., Zhang, L. et Xu, H. (2016). Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by Azadirachtin A in *Spodoptera litura* Cells. *Scientific Reports*, 6, 35-48.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shaurub, E. S. H., El-Meguid, A. A. et El-Aziz, N. M. A. (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.
- Sheets, L. P., Li, A. A., Minnema, D. J., Collier, R. H., Creek, M. R. et Pepper, R. C. (2016).** A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Critical reviews in toxicology*, 46(2), 153-190.
- Sheng, Z., Chen, K. et Li, X. (2016).** Advances in the biosynthesis of spinosad. *Acta microbiologica Sinica*, 56(3), 397-405.
- Shingleton, A. W. (2015).** Physiology: female flies have the guts for reproduction. *Current Biology*, 25(16), R716-R718.
- Shivanandappa, T. et Rajashekar, Y. (2014).** Mode of action of plant-derived natural insecticides. In: Singh, D. (Ed). *Advances in Plant Biopesticides*. Springer, New York. 223-345.
- Sieber, M. H. et Spradling, A. C. (2015).** Steroid signaling establishes a female metabolic state and regulates SREBP to control oocyte lipid accumulation. *Current Biology*, 25(8), 993-1004.
- Singh, K., Kochar, E. et Prasad, N. G. (2015).** Egg viability, mating frequency and male mating ability evolve in populations of *Drosophila melanogaster* selected for resistance to cold shock. *PloS One*, 10(6), e0129992.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Singh, K., Samant, M. A., Tom, M. T. et Prasad, N. G. (2016).** Evolution of pre-and post-copulatory traits in male *Drosophila melanogaster* as a correlated response to selection for resistance to cold stress. *PloS One*, 11(4), e0153629.
- Sitnik, J. L., Gligorov, D., Maeda, R. K., Karch, F. et Wolfner, M. F. (2016).** The female post-mating response requires genes expressed in the secondary cells of the male accessory gland in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 202(3), 1029-1041.
- Smagghe, G. et Degheele, D. (1992).** Effects of RH 5849, the first nonsteroidal ecdysteroid agonist, on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 21(2), 119-128.
- Smagghe, G., Gomez, L.E. et 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.
- Smith, D. T., Sirot, L. K., Wolfner, M. F., Hosken, D. J. et Wedell, N. (2012).** The consequences of genetic variation in sex peptide expression levels for egg laying and retention in females. *Heredity*, 109(4), 222-225.
- Soltani-Mazouni, N., Hami, M. et Gramdi, H. (2012).** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction and Development*. 56(2): 157-163.
- Song, Q. et Gilbert, L. I. (1996).** Protein phosphatase activity is required for prothoracicotropic hormone-stimulated ecdysteroidogenesis in the prothoracic glands of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 31(4), 465-480.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sparks, D. E., Jacobs, G., Gnanamani, M. K., Pendyala, V. R. R., Ma, W., Kang, J., Shafer, W.D., Keogh, R. A., Graham, U. M., Gao, P. et Davis, B. H. (2013).** Poisoning of cobalt catalyst used for Fischer–Tropsch synthesis. *Catalysis today*, 215, 67-72.
- 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.
- Swevers, L., Raikhel, A.S., Sappington, T.W., Shirk, P. et Iatrou, K. (2005).** Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, U.K. 6: 87–156.
- Teseo, S., Veerus, L. et Mery, F. (2016).** Fighting experience affects fruit fly behavior in a mating context. *The Science of Nature*, 103(5-6), 1-4.
- Thompson, J. N. et Pellmyr, O. (1991).** Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 65-89.
- Tine, S., Aribi, N. et 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.
- Tofel, K. H., Nukenine, E. N., Stähler, M. et Adler, C. (2016).** Degradation of azadirachtin A on treated maize and cowpea and the persistence of *Azadirachta indica* seed oil on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, 69, 207-212.
- Toivonen, J. M. et Partridge, L. (2009).** Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(1), 39-50.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tomé, H. V. V., Martins, J. C., Corrêa, A. S., Galdino, T. V. S., Picanço, M. C. et Guedes, R. N. C. (2013).** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Protection*, 46, 63-69.
- Tomizawa, M. et Casida, J. E. (2003).** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*, 48(1), 339-364.
- Turchen, L. M., Golin, V., Butnariu, A. R., Guedes, R. N. C. et Pereira, M. J. B. (2016).** Lethal and sublethal effects of insecticides on the egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae). *Journal of Economic Entomology*, 109(1), 84-92.
- Ureña, E., Manjón, C., Franch-Marro, X. et Martín, D. (2014).** Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19), 7024-7029.
- USEPA.** Pesticide industry sales and usage reports. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency; 2011. Available from: <http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/>.
- Vacas, S., Alfaro, C., Primo, J. et Navarro-Llopis, V. (2011).** Studies on the development of a mating disruption system to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pest management science*, 67(11), 1473-1480.
- Vaníčková, L., Nagy, R., Pompeiano, A. et Kalinová, B. (2017).** Epicuticular chemistry reinforces the new taxonomic classification of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae, Dacinae). *PloS one*, 12(9), e0184102.
- Villella, A. et Hall, J. C. (2008).** Neurogenetics of courtship and mating in *Drosophila*. *Advances in Genetics*, 62, 67-184.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vivekananthan, T. et Suresh, N. (2014).** Histopathological observations on testes of adult blister beetle, *Mylabris indica* (thunberg)(Coleoptera: Meloidae) treated with neem. *Journal of Entomological Research*, 38(1), 45-52.
- Vrijheid, M., Casas, M., Gascon, M., Valvi, D. et Nieuwenhuijsen, M. (2016).** Environmental pollutants and child health—A review of recent concerns. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(4), 331-342.
- Walter, E. V. (1918).** Experiments on cockroach control. *Journal of Economic Entomology*, 11, 424-429.
- Wang, D., Lü, L. et He, Y. (2017).** Effects of two conventional insecticides on male-specific sex pheromone discrimination and mate choice in *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Environmental Entomology*, 46(2), 328-334.
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Zhang, W. et Wang, K. (2009).** Effects of spinosad on *Helicoverpa amirigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: tolerance status, synergisme and enzymatic responses. *Pest Management Science*. 65(9): 1040-1046.
- Wang, H., Lai, D., Yuan, M. et Xu, H. (2014).** Growth inhibition and differences in protein profiles in azadirachtin-treated *Drosophila melanogaster* larvae. *Electrophoresis*, 35(8), 1122-1129.
- Wang, L., Phan, D. D. K., Zhang, J., Ong, P. S., Thuya, W. L., Soo, R., Wong, A. L. A., Yong, W. P., Lee, S. C., Ho, P. C. L., Sethi, G. et Goh, B. C. (2016).** Anticancer properties of nimbolide and pharmacokinetic considerations to accelerate its development. *Oncotarget*, 7(28), 44790.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Wang, Q. et Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, 17(3), 2367-2377.

Wang, Z., Cheng, X., Meng, Q., Wang, P., Shu, B., Hu, Q., Hu, M. et Zhong, G. (2015). Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 64, 126-135.

Washburn, J. O., Trudeau, D., Wong, J. F. et Volkman, L. E. (2003). Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *Journal of General Virology*, 84(2), 343-351.

Weeks, E. N., Birkett, M. A., Cameron, M. M., Pickett, J. A. et Logan, J. G. (2011). Semiochemicals of the common bed bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae), and their potential for use in monitoring and control. *Pest management science*, 67(1), 10-20.

Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jackle, H., Janning, W. et Klambt, C. (2003). Fly Move--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends in Genetics* 19: 310-1.

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

Wijesekera, T. P., Saurabh, S. et Dauwalder, B. (2016). Juvenile hormone is required in adult males for drosophila courtship. *PloS One*, 11(3), e0151912.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wilson, T. G., DeMoor, S. et Lei, J. (2003).** Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the Methoprene-tolerant 27 mutant phenotype. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12), 1167-1175.
- Wolfner, M. F. (1997).** Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(3), 179-192.
- Wolfner, M. F. (2009).** Battle and ballet: molecular interactions between the sexes in *Drosophila*. *Journal of Heredity*, 100(4), 399-410.
- Wu, C. L., Fu, T. F., Chou, Y. Y. et Yeh, S. R. (2015).** A single pair of neurons modulates egg-laying decisions in *Drosophila*. *PloS One*, 10(3), e0121335.
- Wu, Z., Guo, W., Xie, Y. et Zhou, S. (2016).** Juvenile hormone activates the transcription of cell-division-cycle 6 (*cdc6*) for polyploidy-dependent insect vitellogenesis and oogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(10), 5418-5427.
- Xu, L., Li, S., Ran, X., Liu, C., Lin, R. et Wang, J. (2016).** Apoptotic activity and gene responses in *Drosophila melanogaster* S2 cells, induced by azadirachtin A. *Pest Management Science*.
- Yang, M.L., Zhang, J.Z., Zhu, K.Y., Xuan, T., Liu, X.J., Guo, Y.P. et 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*. 71(1): 3-15.
- Ye, D., Klein, M., Chang, H. H., Sarnat, J. A., Mulholland, J. A., Edgerton, E. S., Winkquist, A., Tolbert, P.E. et Sarnat, S. E. (2017).** Estimating acute cardiorespiratory effects of ambient volatile organic compounds. *Epidemiology*, 28(2), 197-206.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zheng, H., Yang, X. et Xi, Y. (2016). Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sciences*, 167, 22-31.

Ziegler, A. B., Berthelot-Grosjean, M. et Grosjean, Y. (2013). The smell of love in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, 4, 72.

Zlatnik, M. G. (2016). Endocrine-disrupting chemicals and reproductive health. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 61(4), 442-455.

ANNEXE

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications :

1. **Oulhaci, MC.**, Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, JC., Kaiser, L., Joly, D and Aribi N, 2017. Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). Pest Management Science, 74: 174-180.
2. Aribi, N., **Oulhaci, MC.**, Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, JC., Kaiser, L and Joly, D, 2017. Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 143, 95-101.

Communications Publiée

1. Nadia, A., **Chemssedine, O.**, Bilel, B., Dominique, J and Samira Badji-Mokhtar DBKM, 2015. Negative effects of Azadirachtin (Neem-Azal) on non cibled species *Drosophila melanogaster* (Diptera): delayed effects on reproduction. Toxicology Letters. 2(238), S103.

Communications Internationales et Nationales :

Communications Internationales :

1. **Oulhaci, MC.**, Boulahbel, B., Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Joly, D and Aribi N, 2015. Negative effects of Azadirachtin (Neem-Azal) on non cibled species *Drosophila melanogaster* (Diptera): delayed effects on reproduction. 51st Congress of the European Society of Toxicology. Porto – Potugal du 13 au 16 Septembre 2015.
2. **Oulhaci, MC.**, Boulahbel, B., Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Joly, D et Aribi N, 2015. Negative effects of Azadirachtin (Neem-Azal) on non cibled species *Drosophila melanogaster* (Diptera): delayed effects on reproduction. Journées annuelles de l'institut Evolution, Ecologie et Diversité du Vivant (IDEEV), Orsay France, 23 au 26 Octobre 2015.
3. Denis, B., **Oulhaci, MC.**, Boulahbel, B., Kilani-Morakchi, S., Joly, D et Aribi N, 2016. Etude d'un pesticide naturel, l'azadirachtine ou neem-azal, sur la reproduction d'un insecte non cible. 37^{ème} Réunion annuelle du groupe d'Etude de Biologie et de Génétique des Populations PPD, Amiens France, 27-29 Août 2016.
4. **Oulhaci, MC.**, Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Joly, D et Aribi N, 2017. Effets d'un pesticide naturel l'Azadirachtine (Neem-Azal) sur la reproduction d'une espèce non cible *Drosophila melanogaster* (Diptera). 28^{ème} Congrès International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie, Hammamet Tunisie, 21-24 Mars 2017.

Communications Nationales :

1. Boulahbel, B., Bensebaa, F., **Oulhaci, MC.**, Semouk, D., Kilani-Morakchi, S et Aribi, N.,2013. Activité d'un pesticide naturel, l'azadirachtine seul et combiné au diethylmaleate (dem) chez un modèle de référence *Drosophila melanogaster* (diptera). Journéescientifique sur l'environnement, Guelma, 26 novembre 2013.

Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera)

Chemseddine M Oulhaci,^a Béatrice Denis,^b Samira Kilani-Morakchi,^a Jean-Christophe Sandoz,^b Laure Kaiser,^b Dominique Joly^b and Nadia Aribi^{a*} 



Abstract

BACKGROUND: Azadirachtin is a prominent natural pesticide and represents an alternative to conventional insecticides. It has been successfully used against insect pests. However, its effects on reproduction require further analysis. Here we investigated lethal and sublethal effects of azadirachtin, on treated adults in a model insect, *Drosophila melanogaster* (Meigen). Dose–mortality relationships as well as several parameters of reproduction (mating, spermatogenesis, oogenesis and fertility) were examined.

RESULTS: Neem-Azal, a commercial formulation of azadirachtin, applied topically on newly emerged adults, increased mortality with a positive dose-dependent relationship. The LD₅₀ (0.63 µg) was determined 24 h after treatment using a non-linear regression. Adults surviving this dose had a mating success that was divided by 3 and a progeny production reduced by half when males were treated, and even more when females were treated. When combining probability of survival, of mating and reduced progeny, it appeared that LD₅₀ induced a 98% reduction in reproductive rates. Reduced progeny was partially explained by the effect of adult treatment on gametes number and abnormalities. The number of cysts and the apical nuclei positions within the cysts decreased by 29.7% and 20%, respectively, in males. In females, the number of oocytes per ovary and the volume of basal oocytes also decreased by 16.1% and 32.4%, respectively.

CONCLUSION: Azadirachtin causes significant toxic effects in both sexes and decreases the fecundity and fertility of *D. melanogaster*. Females are more sensitive to azadirachtin.

© 2017 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: natural pesticide; azadirachtin; toxicity; spermatogenesis; oogenesis; *Drosophila*

1 INTRODUCTION

Crop losses caused by pests may represent the equivalent of the food needed to feed over 1 billion people.¹ The use of pesticides is therefore required to protect agrosystems. However, their side effects induce important health^{2,3} and environmental problems.^{4,5} Consequently, natural compounds with pesticidal properties (biopesticides) have been investigated for decades and offer a more sustainable solution to pest control than synthetic or conventional products.^{6–8}

Azadirachtin, a tetranortriterpenoid derived from the seeds of the Indian neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae), is one of the main commercialised biopesticides and remains the most successful botanical pesticide in agricultural use worldwide.^{9,10} It possesses a strong toxicity against insect pests of different orders.^{9,11–14} Besides its insecticidal action, azadirachtin is also used in traditional medicine, in Asia and in Africa as an antidiabetic, immunostimulant, antimicrobial, antiviral, contraceptive and anti-cancer remedy.^{15–17}

Azadirachtin is an insecticide with rapid biodegradability and without resistance problems due to its chemical complexity.⁹ This pesticide is also reported to be relatively safer than most conventional insecticides.^{18,19} It is non-toxic to humans and warm-blooded vertebrates²⁰ and without genotoxicity for mammals.^{21,22} However, because azadirachtin acts as an insect growth disruptor,²³ negative side effects on beneficial arthropods are expected. Studies have reported various effects of neem products on non-target species, such as mites, parasitoids and

* Correspondence to: N Aribi, Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000 Annaba, Algeria. E-mail: nadia.aribi@univ-annaba.dz

a Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, Algeria

b Laboratoire Evolution, Génomes, Comportements, Ecologie, UMR 9191, CNRS, IRD, Université Paris-Sud et Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex, France

bees.^{24–29} For example, behaviour and morphological alterations have been highlighted in bees,²⁹ while Bernades *et al.*²⁷ did not detect any effect on worker bee mortality, flight, or respiration rate. The large panel of potentially affected functions and apparent contradictory conclusions are caused by the level of action of azadirachtin. This molecule interferes with the endocrine system by impairing juvenile hormone (JH) and 20-hydroxyecdysone (20E) pathways, which are involved in the regulation of many physiological functions.⁹ Thus azadirachtin induces growth and moulting abnormalities and can cause significant alterations in the reproductive system of both male and female insects, including ovarian and testes development, fecundity, fertility, oviposition and egg viability.^{9,12,30–32} Azadirachtin also shows moderate to strong cytotoxicity, neurotoxicity and antimitotic effects.^{9,33,34} It acts on the expression of genes related to development in *Drosophila melanogaster*.¹⁸ These studies provide knowledge about the range of functions potentially affected by this molecule, but the effects of azadirachtin on reproductive parameters would benefit from being investigated more deeply. The extensive use of *D. melanogaster*, as a model species for toxicological studies and the wide knowledge acquired about its physiology, endocrinology and genetics, could be instrumental in achieving a precise understanding of pesticide effects on reproduction. Therefore, the aim of this study was double: on the one hand, it quantified the side effects of azadirachtin on *D. melanogaster* flies using doses allowing 25% and 50% of survivors, i.e. mimicking possible exposure to the insecticide residues; on the other hand, it filled some gaps in evaluating azadirachtin reprotoxic effects in both sexes. Effects were assessed (1) following treatment on newly emerged adults, and (2) on various reproductive traits of adult males and females. Previous studies have already shown that azadirachtin impacts the reproduction of *D. melanogaster* treated at the larval³⁵ and pupal stages.³⁶ Thus, we considered its impact on the survival of progeny at various development stages and on fertility in both sexes. We quantified the mating process, fecundity of males and females (number of cysts and potential abnormalities of spermatocyte nucleus positions; number of oocytes and size of basal oocyte) and number of progeny produced by surviving adults (numbers of eggs, larvae, pupae and adults obtained at the F₁ generation). A toxicity study was first carried out to determine lethal doses for *D. melanogaster* adults in our experimental conditions.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Insect rearing

Drosophila melanogaster (Canton-S) was reared on standard corn-meal medium at 25 ± 2°C, 70% relative humidity under a 12-h light/dark photoperiod. Flies were transferred every 3 days to avoid larval competition and to regularly provide abundant progeny for testing.

2.2 Insecticide and toxicity tests

The Neem Azal, commercial formulation (1%; TrifolioM GmbH; Lahnau, Germany), was used. It has the advantage of containing only azadirachtin as an active substance, but at an affordable price, and at a low concentration, ensuring safe use to the experimenters. Sundaram *et al.*³⁷ showed that pure azadirachtin and commercial formulations had similar effects in the spider mite, *Tetranychus urticae*.^{37,38} Neem Azal was dissolved in acetone and applied topically on adults (sexes combined after screening and showing

any difference between male and female) less than 6 h after ecdysis (1 µL per insect according to Di Prisco *et al.*).³⁹ Control insects were treated with solvent alone. Five doses (0.1, 0.2, 0.4, 0.6 and 1.2 µg of Neem Azal acetone solution) were tested,³⁶ considering three replicates per dose, each consisting of 300 insects. Adult mortality percentages were calculated between 24 and 96 h after treatment and corrected in accordance with Abbott.⁴⁰ A non-linear regression was used to determine the lethal doses (LD) LD₂₅ and LD₅₀, corresponding to 25% and 50% of adult mortality respectively, with their corresponding 95% fiducial limits (95% FL) and Hill slope.

2.3 Mating assays

Newly emerged male and female flies (< 6 h post-emergence) were separated and treated topically with azadirachtin. Then control (M_C, F_C) and treated (M_T, F_T) males and females were placed in vials according to sex (25 mm in diameter, 95 mm in height) containing a standard corn-meal medium. After 48 h, one male and one female were placed together in individual vials with food for the mating assay. Two conditions were tested: M_C + F_C and M_T + F_T, and matings were monitored for 3 h in the morning. The number of vials in which mating occurred was counted. Results are presented as a mating percentage in each group.

2.4 Cyst parameters in males

Developmental factors leading to male infertility were investigated by analysing post-meiotic abnormalities, i.e. cyst numbers and spermatocyte nucleus localisation, both parameters influencing the number of sperm produced.⁴¹ Newly moulted male adults (< 6 h) were treated topically with azadirachtin at the LD₅₀ (0.63 µg). Individuals from the control and treated series were placed in vials containing standard corn-meal medium. After 48 h, testes were dissected in a phosphate-buffered saline (PBS) solution with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) allowing nuclei staining.⁴² Cysts were gently spread on the blade and covered with a cover slip. Cysts were then observed under a fluorescence microscope and the number of cysts per male and the position of spermatocyte nuclei within the cyst were counted. Thirty repetitions per condition were performed.

2.5 Ovarian parameters in females

To detect a possible impact of azadirachtin on female fecundity, classical ovarian parameters were investigated (number of oocytes and size of basal oocyte). Newly emerged female adults (< 6 h) were treated topically with the azadirachtin at the LD₅₀ (0.63 µg). Individuals from the control and treated series (LD₅₀, 0.63 µg) were placed in vials containing standard corn-meal medium. After 48 h, ovaries were dissected out. After removal of the circumovarian fat body, the numbers of oocytes were scored together with the volume of the basal oocyte.⁴³

2.6 Progeny output

Newly moulted (< 6 h) *D. melanogaster* adults were treated topically with azadirachtin at the LD₂₅ and LD₅₀. Subsequently, one male and one female from the control and treated series were placed in a Petri dish (90 × 14.2 mm) containing standard corn-meal medium to obtain their progeny. Eight repetitions of different types of couples were realised (control male + control female; control male + female LD₂₅; male LD₂₅ + control female; male LD₂₅ + female LD₂₅; control male + female LD₅₀; male

LD₅₀ + control female, male LD₅₀ + female LD₅₀). After 48 h, the adults were removed and generation 1 (F₁) was followed daily until all adults had emerged. The numbers of eggs, larvae, pupae and adults that emerged from each series of experiments were counted.

2.7 Statistical analysis

The mean $\pm$ standard deviations (SD) were calculated for each experimental group. Data from the toxicity assay were analysed using non-linear sigmoid curve fitting. The goodness of fit to the curve model was evaluated on the basis of R^2 values. The homogeneity of variances was checked using Bartlett's and Shapiro–Wilk tests. Analyses of variance (one-way and two-way) were performed and followed by Tukey's HSD test for multiple comparisons when significant. Repeated-measure ANOVA was also used for progeny output between stages for the same couple. Chi-squared was performed for anomalies of spermatocyte nucleus positions. Numbers of cysts and ovarian parameters were compared between the treated and control groups using Student's t test. In mating experiments, the treated group was compared to the control group using Fisher's exact test. All calculations were performed using GraphPad Prism (v6.01 for Windows; Available at: <http://fr.freownloadmanager.org/Windows-PC/GraphPad-Prism.html>).

3 RESULTS

3.1 Insecticidal activity

Azadirachtin, applied topically on newly emerged adults of *D. melanogaster*, induces an insect mortality 24 h after treatment. Corrected mortality percentages were $13.92 \pm 1.43\%$ for the lowest dose (0.1 μg) and $71.80 \pm 3.11\%$ for the highest dose (1.2 μg). The mortality percentage recorded in untreated animals was $5.48 \pm 0.53\%$ (control mortality, Fig. 1). Statistical analysis revealed a significant dose effect ($F_{4,10} = 62.43$; $P < 0.0001$) and Tukey's HSD test showed a significant increase in mortality with increasing doses (Fig. 1). The lethal doses (LD) recorded with 95% fiducial limits (95% FL) were LD₂₅ = 0.23 (0.13–0.38), LD₅₀ = 0.63 (0.44–0.91) and LD₉₀ = 4.85 (1.47–15.98) μg (Table 1). The non-linear regression fitted on these results indicated a Hill slope of 1.08 (0.54–1.62). No significant effect of the time elapsed after treatment (24 to 96 h) was observed ($F_{5,60} = 1.05$; $P = 0.39$; Table 2).

3.2 Mating tests

In *D. melanogaster*, azadirachtin applied topically (LD₅₀) on the day of adult emergence induced, 48 h after treatment, clear effects on mating success (Fig. 2). In the treated group, the mating percentage significantly declined compared to controls ($M_T + F_T$: 13.8% vs $M_C + F_C$: 43.2%; Fisher's exact test, $P < 0.001$).

3.3 Cyst parameters

The effect of azadirachtin treatment was tested on male fecundity. Azadirachtin was applied topically at LD₅₀ (0.63 μg) on male *D. melanogaster* on the day of emergence. The number of cysts per testis was counted 48 h after emergence. Control adults displayed 28.47 ± 2.16 cysts per testis. This number decreased significantly after topical application of azadirachtin and reached 20 ± 1.69 ($t_{58} = 3.08$; $P = 0.003$) (Fig. 3A). In addition, the percentage of spermatocyte nuclei in abnormal position significant increased in LD₅₀ males ($\chi^2 = 5.30$, 1; $z = 2.30$, $P = 0.021$) (Fig. 3B).

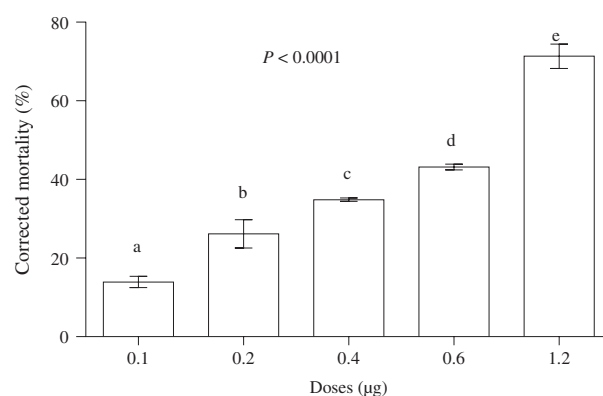


Figure 1. Toxicity of azadirachtin tested by topical application, at different doses, on the day of *Drosophila melanogaster* adult emergence: corrected mortality (%) at 24 h (mean $\pm$ SD; $n = 3$ replicates of 300 insects). Control mortality: $5.48 \pm 0.53\%$. Different letters indicate a significant difference between control and treated series according to Tukey's HSD test.

Table 1. Toxicity of azadirachtin tested by topical application, at different doses, on the day of *Drosophila melanogaster* adult emergence: lethal doses and their fiducial limits

Parameter	Dose (μg)	Fiducial limits
LD 90	4.85	1.47–15.98
LD 50	0.63	0.44–0.91
LD 25	0.23	0.13–0.38
Hill slope	1.08 (0.54–1.61)	
R square	0.96	

Table 2. Toxicity of azadirachtin tested by topical application, at different doses, on the day of *Drosophila melanogaster* adult emergence: corrected mortality (%) from 24 to 96 h (mean $\pm$ SD; $n = 3$ replicates of 300 insects)

Dose (μg)	Time (h)			
	24	48	72	96
0.1	13.92 ± 1.43^A	15.96 ± 2.19^A	14.72 ± 2.24^A	14.65 ± 0.97^A
0.2	26.16 ± 3.58^B	23.67 ± 1.13^B	28.12 ± 1.22^B	27.77 ± 5.84^B
0.4	34.84 ± 0.44^C	33.85 ± 4.61^C	35.02 ± 5.92^C	34.89 ± 4.57^C
0.6	43.16 ± 0.74^D	42.46 ± 2.49^D	43.42 ± 2.47^D	43.87 ± 6.90^D
1.2	71.80 ± 3.11^E	69.88 ± 1.13^E	70.45 ± 6.20^E	69.88 ± 1.16^E

Means followed by the same uppercase letter do not differ significantly according to Tukey's HSD test at the level $P = 0.05$.

3.4 Ovarian parameters

The effect of azadirachtin treatment was tested on female fecundity. Azadirachtin was applied topically at LD₅₀ (0.63 μg) on female *D. melanogaster* on the day of emergence. The number of oocytes was counted 48 h after emergence. We found a significant decrease in the number of oocytes in the treated series (13.90 ± 0.55) compared to controls (16.57 ± 0.53 ; $t_{58} = 3.43$; $P = 0.0011$, Fig. 4A). Furthermore, the volume of the basal oocyte showed a reduction in treated females ($0.0048 \pm 0.0003 \text{ mm}^3$) compared to controls ($0.0071 \pm 0.0005 \text{ mm}^3$) ($t_{58} = 3.87$; $P = 0.0003$, Fig. 4B).

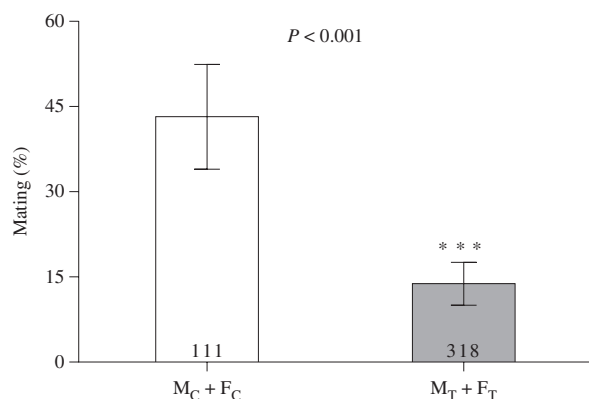


Figure 2. Effects of azadirachtin on mating percentages observed 48 h after treatment (0.63 μ g) by topical application on the day of adult emergence of *D. melanogaster* (mean with 95% confidence intervals); M_C : male control; F_C : female control; numbers within each bar indicate the number of repetitions. *** Indicates significant differences, $P \leq 0.001$.

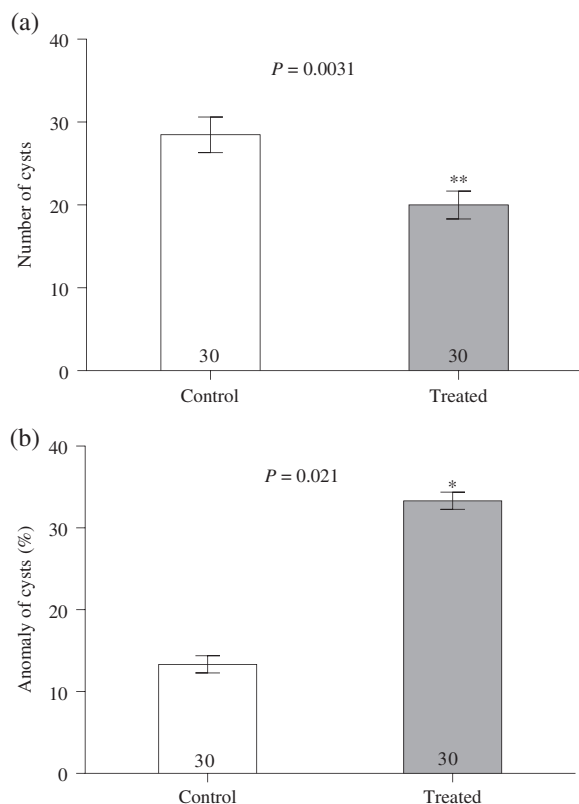


Figure 3. Effects of azadirachtin applied by topical application (0.63 μ g) on day of *Drosophila melanogaster* adult emergence on male fecundity parameters (mean $\pm$ SD). (A) Number of cysts per testis 48 h after emergence. (B) Percentage of spermatocyte nuclei in abnormal position. Numbers within each bar indicate the number of repetitions. * Above bars indicates significant difference at $P \leq 0.05$. ** Above bars indicates significant differences at $P \leq 0.01$.

3.5 Progeny output

To evaluate the progeny from surviving treated adults, we monitored the different developmental stages (eggs, larvae, pupae and adults) in the progeny of couples formed with control animals (female, F_C ; male, M_C) and/or animals treated with the LD_{50} (female, F_T , male M_T). Statistical analysis showed a significant decrease in

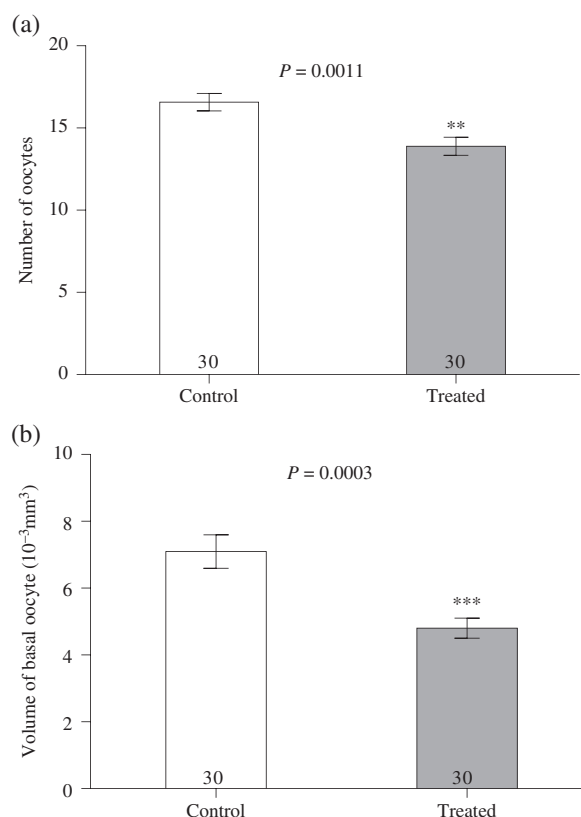


Figure 4. Effects of azadirachtin applied by topical application (0.63 μ g) on the day of *Drosophila melanogaster* adult emergence on female fecundity parameters (mean $\pm$ SD). (A) Number of oocytes per ovary 48 h after emergence. (B) Volume of the basal oocyte 48 h after emergence. Numbers within bar indicate the number of repetitions. ** Above bars indicates significant differences $P \leq 0.01$. *** Above bars indicates significant differences, $P \leq 0.001$.

the numbers of eggs, larvae, pupae and adults in the F_1 generation for all treated series compared to couples from control individuals (repeated-measure ANOVA: treatment effect: $F_{6,42} = 241.90$, $P < 0.0001$; stage effect: $F_{3,21} = 15.94$, $P < 0.0001$; interaction: $F_{18,126} = 0.60$, $P = 0.89$; Fig. 5). The comparison of the different series revealed a significant dose effect. Irrespective of the developmental stage considered, Tukey's HSD test detailed three groups ($M_C + F_C > M_T + F_C > M_C + F_T = M_T + F_T$). This result reveals a greater sensitivity of females to azadirachtin.

In addition, for all stages evaluated, a dose-dependent effect was noted and a more significant reduction was recorded at the LD_{50} than at LD_{25} (Fig. S1, Supporting Information).

3.6 Reproductive rate

When taking into account the observed effects on survival, mating success (see section 3.2) and progeny survival (section 3.5), by multiplying the probabilities of survival and of mating by the mean progeny number per couple, it is possible to infer that a treated couple (with both sexes treated with LD_{50}) would produce a progeny of ~ 0.6 individuals [$P(\text{survival male}) \times P(\text{survival female}) \times P(\text{mating}) \times \text{adult progeny} = 0.5 \times 0.5 \times 0.138 \times 17$], while a control couple (neither sex treated) would produce ~ 31 individuals [$P(\text{mating}) \times \text{adult progeny} = 0.432 \times 72$]. Consequently, azadirachtin treatment at LD_{50} is evaluated to induce a 98% reduction in reproductive yield.

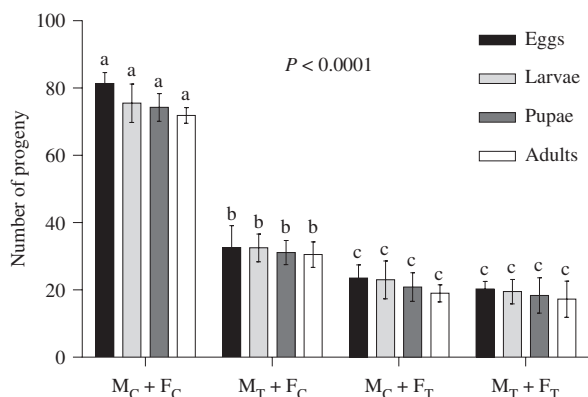


Figure 5. Effect of azadirachtin tested by topical application (0.63 μ g), on the day of *Drosophila melanogaster* adult emergence, on the number of progeny (eggs, larvae L3, pupae, adults; M_C: male control; F_C: female control; M_T: male treated; F_T: female treated) (mean $\pm$ SD; $n = 8$ by couple). Different letters indicate a significant difference between the control and treated series of the same stage of development at level $P \leq 0.05$.

4 DISCUSSION

In this study, we investigated the effects of azadirachtin on adult toxicity and reproduction in a model insect *D. melanogaster*. Azadirachtin, applied topically on newly emerged adults, induced comparable mortality when evaluated at different times (24–96 h) after treatment. This result is in agreement with those of Andreazza et al.⁴⁴ on two other Drosophilidae, *Drosophila suzukii* (Matsumura) and *Zaprionus indianus* (Gupta). Azadirachtin acts with a dose–response relationship and the LD₅₀ we obtained (0.63 μ g or 630 ppm, evaluated 24 h after treatment) is close to that found for *D. melanogaster* last larval instar also by topical application.³⁵ Azadirachtin seems less toxic (1.17 μ g) when applied on newly formed pupae of *D. melanogaster*.³⁶ Neem oil, another azadirachtin formulation applied topically at the same stage, induces similar toxicity in *Drosophila*³⁶ despite a different composition in the formulation. The most likely explanation for this effect is a lower susceptibility due to the metabolism or penetration through the cuticle (puparium) at this stage of development. Nevertheless, the pupal stage, a critical phase for adult formation, remains very responsive to azadirachtin³⁶ due to a drastic remodelling of most tissues and organs.⁴⁵

Azadirachtin presents a stronger toxicity in *D. suzukii* and *Z. indianus* adults compared to *D. melanogaster*.⁴⁴ Indeed, a concentration of only 12 ppm causes 40% mortality in those species. Similar observations were reported by De Andrade-Coelho et al.⁴⁶ in female adults of another Diptera, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). Previously, azadirachtin was reported to impair, with variable effects, the survival of different insect species.^{9,11–14,44–51} Strong variations in insects' susceptibility to azadirachtin were noted depending on insect order, species, formulation, or the method of application.^{9,11–14,25–29,44–51} Sensitivity of insects to insecticides varies also with the regulation of plasma membrane receptor⁵² and/or ion channels,^{34,52} penetration rate through the cuticle,²³ absorption by insects,²³ transport in tissues of the body²³ and metabolism.²³

Several mechanisms may be at play in causing acute azadirachtin toxicity. The effects of azadirachtin on adult mortality may be linked to the cytotoxicity and induction of apoptosis via the impairment of insulin-signalling pathway⁵³ known to interact with JH and ecdysteroid^{54,55} hormones inhibited by this insecticide. Azadirachtin-induced apoptosis causes general disruption

in the organs of *D. melanogaster*⁵⁶ and in other species.^{9,53,57} In particular, detrimental effects on various tissues, such as muscles (suppressed peristalsis), fat body and gut epithelial cells, have been reported.^{9,58} A decrease of food intake and biochemical effects (decrease of α -amylase, chitinase, proteases and lipases), published recently⁵⁹ in *D. melanogaster*, may also contribute to azadirachtin acute toxicity. For instance, azadirachtin affects the chitin present⁶⁰ in the peritrophic membrane so that midgut protection against the mechanical damage and toxic compounds is impaired.⁶⁰

Ecdysteroids, JH and insulin-signalling pathways play a crucial role in reproduction of *D. melanogaster*^{54,55} and observations made in the current study indicate that fecundity and fertility in this species are adversely affected by azadirachtin treatment, resulting in a decreased progeny. First, we observed an impaired mating success after azadirachtin treatment. Then we found a reduced progeny. We also observed a reduction in cyst and oocyte numbers and also an increase in spermatocyte nucleus abnormalities and a decreased size of basal oocytes. All these gamete defects can explain the reduced progeny of treated adults. Together, reduced mating success and lower progeny suggest a strong deleterious impact (98% reduction) of LD₅₀ azadirachtin treatment on reproductive yield.

Mating in *D. melanogaster* can be affected by azadirachtin because JH is required and plays an important role in this regulation processes in this species.⁶¹ Moreover, ecdysone and JH seem to regulate the onset of female sex pheromone production,⁶² mating⁶² and some aspects of courtship in *D. melanogaster*.⁶¹ In addition, the decision to engage courtship activities can be influenced by neuromodulators like dopamine (DA),⁶³ and recent studies show that the insulin-signalling pathway regulates JH and DA metabolism in *D. melanogaster*.⁶³

Azadirachtin was found to inhibit oogenesis and spermiogenesis in several species.^{9,64} Our observation of decreases in the number of oocytes and in the size of the basal oocyte can be explained by the severe degeneration of follicle cells, fragmentation in the germinal vesicle⁹ and alterations of mitochondria caused by this insecticide.⁶⁵ Azadirachtin also alters or prevents the formation of new actin cytoskeleton resulting in the disruption of cell division and nutrients transport.⁹ This disruption may affect the process of dumping the cytoplasmic contents of nurse cells to the oocyte and impact vitellogenesis.⁶⁶ Furthermore, azadirachtin interferes with ecdysteroid synthesis and vitellogenin synthesis (and/or its uptake), affecting oocyte development via JH^{9,64} as noted in *D. melanogaster*.³⁶ The impact of azadirachtin on *D. melanogaster* adult females, as highlighted here, thus may be related to the fact that JH stimulates vitellogenesis for the developing oocytes and, together with 20E and insulin-signalling pathways,^{53–55,66,67} controls the nutrient-sensitive checkpoint in oogenesis.^{53–55} Reduction in the cyst number and the abnormalities observed can be explained by the impact of azadirachtin on the meiotic process responsible for sperm production and on histological and cellular structures.⁹ Indeed, in *Mylabris indica* males (Coleoptera), Vivekananthan et al.⁶⁸ showed changes in the testes, such as vacuolation, shrinkage of testis cyst cells, clumped and fragmented chromatin materials, and disintegration and degeneration of germ cells, such as spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. These effects of azadirachtin, in adult males, could be explained by the antagonistic action on ecdysone required for spermatogenesis; besides, JH is also needed for protein synthesis in male accessory glands.⁵⁴ Our last experiment, showing a reduced progeny in the treated adults, also suggested that

Drosophila females are more sensitive than males despite a similar recorded toxicity. This effect may be explained by the distinct physiologies of the two sexes.⁶⁹ For instance, Argue *et al.*⁶⁹ did indeed show a sexually dimorphic role of JH and presented DA as a candidate neuronal factor that differentially interacts with JH depending on the sex of the animal. Furthermore, the reduction of the egg layer can be explained by the neurotoxic effect³⁴ of azadirachtin that can interfere directly³⁴ or indirectly^{54,55} on different step of the reproductive process in *D. melanogaster*⁷⁰ (e.g. follicular adrenergic signaling in ovulation or oviducte peristalsis).

5 CONCLUSION

Our study shows strong toxic effects of azadirachtin, from 24 h after topical treatment in *D. melanogaster*. We highlight a more drastic impact of azadirachtin on progeny output in treated females compared to males, even if this species is less sensitive than the targeted ones.^{11,44,46} The impact of azadirachtin on *D. melanogaster* may be explained by the widely documented inhibition of JH and ecdysteroids,⁹ and their interaction with insulin-signalling pathways.^{54,55} Further investigations are now needed to achieve a better understanding of these effects and particularly the difference in sensitivity between the sexes. In addition, the molecular tools available when working with *D. melanogaster* should be instrumental for identifying the mechanisms of action of azadirachtin. On a more applied level, our results may provide interesting information for developing reproduction-control measures against the invasive *Drosophila* *suzukii*,⁴⁴ especially since azadirachtin is recommended in integrated pest-management programmes.¹¹

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to M. Bonneau and S. Nortier for their help in insect media preparation. We thank Claude Wicker-Thomas for fruitful discussions and M. Eden for English editing. This work was supported by grants from the National Fund for Scientific Research of Algeria (Laboratory of Applied Animal Biology) to N. Soltani, and from IDEEV (Institut Diversité, Ecologie et Evolution du Vivant, FR 3284, CNRS, AAP-2014) to D. Joly.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

- Birch ANE, Begg GS and Squire GR, How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. *J Exp Bot* **62**:3251–3261 (2011).
- Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P and Hens L, Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front Public Health* **4**:148 (2016).
- Vrijheid M, Casas M, Gascon M, Valvi D and Nieuwenhuijsen M, Environmental pollutants and child health, A review of recent concerns. *Int J Hyg Environ Health* **219**:331–342 (2016).
- Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR *et al.*, Global consequences of land use. *Science* **309**:570–574 (2005).
- Köhler HR and Triebstorn R, Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* **341**:759–765 (2013).
- Villaverde JJ, Sevilla-Morán B, Sandín-España P, López-Goti C and Alonso-Prados JL, Biopesticides in the framework of the European pesticide regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Manag Sci* **70**:2–5 (2014).
- Mkenda P, Mwanauta R, Stevenson PC, Ndakidemi P, Mtei K and Belmain SR, Extracts from field margin weeds provide economically viable and environmentally benign pest control compared to synthetic pesticides. *PloS One* **10**:e0143530 (2015).
- Olson S, An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks Pest Manag* **26**:203–206 (2015).
- Mordue LAJ, Morgan ED and Nisbet AJ, Azadirachtin, a natural product in insect control, in *Comprehensive Molecular Insect Science*, ed. by Gilbert LI, Iatrou K and Gill SS, Elsevier, Oxford, UK, pp. 117–135 (2005).
- Isman MB and Grieneisen ML, Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends Plant Sci* **19**:140–145 (2014).
- Tomé HV, Martins JC, Corrêa AS, Galdino TVS, Picanço MC and Guedes RNC, Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Prot* **46**:63–69 (2013).
- Abedi Z, Saber M, Vojoudi S, Mahdavi V and Parsaeyan E, Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J Insect Sci* **14**:1–9 (2014).
- Dere B, Altuntas H and Nurullahoğlu Z U, Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch Insect Biochem Physiol* **89**:138–152 (2015).
- Poland TM, Ciaramitaro TM and McCullough DG, Laboratory evaluation of the toxicity of systemic insecticides to emerald ash borer larvae. *J Econ Entomol* **109**:705–716 (2016).
- Korim KM, Review on pharmacological and toxicological effects of oleum azadirachtin oil. *Asian Pac J Trop Biomed* **3**:834–840 (2013).
- Hao F, Kumar S, Yadav N and Chandra D, Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochim Biophys Acta* **1846**:247–257 (2014).
- Hummel HE, Langner S, Hein DF, Sanguanpong U and Schmutterer H, Unusually versatile plant genus *Azadirachta* with many useful and so far incompletely exploited properties for agriculture, medicine and industry. *Acta Fytotechn Zootecn* **18**:169–175 (2016).
- Lai D, Jin X, Wang H, Yuan M and Xu H, Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *J Biotechnol* **185**:51–56 (2014).
- Wang H, Lai D, Yuan M and Xu H, Growth inhibition and differences in protein profiles in azadirachtin-treated *Drosophila melanogaster* larvae. *Electrophoresis* **35**:1122–1129 (2014).
- Salehzadeh A, Jabbar A, Jennens L, Ley SV, Annadurai RS, Adams Rand Strang RHC, The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest Manag Sci* **58**:268–276 (2002).
- Celestino D, Braoios GI, Ramos RS, Gontijo LM and Guedes RNC, Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallens*. *Biol Control* **59**:697–705 (2014).
- Saxena A and Kesari VP, Lack of genotoxic potential of pesticides, spinosad, imidacloprid and neem oil in mice (*Mus musculus*). *J Environ Biol* **37**:291–295 (2016).
- Pener MP and Dhadialla TS, An overview of insect growth disruptors; applied aspects. *Adv Insect Phys* **43**:1–162 (2012).
- Lima DB, Melo JWS, Guedes NMP, Gontijo LM, Guedes RNC and Gondim Jr MGC, Bioinsecticide–predator interactions: azadirachtin behavioral and reproductive impairment of the coconut mite predator *Neoseiulus baraki*. *PloS One* **10**:e0118343 (2015).
- Luna-Cruz A, Rodríguez-Leyva E, Lomeli-Flores JR, Ortega-Arenas LD, Bautista-Martínez N and Pineda S, Toxicity and residual activity of insecticides against *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *J Econ Entomol* **108**:2289–2295 (2015).
- Turchen LM, Golin V, Butnariu AR, Guedes RNC and Pereira MJB, Lethal and sublethal effects of insecticides on the egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygastridae). *J Econ Entomol* **109**:84–92 (2016).
- Bernardes RC, Tomé HV, Barbosa WF, Guedes RNC and Lima MAP, Azadirachtin induced antifeeding in Neotropical stingless bees. *Apidologie* **48**:275–285 (2017).
- Banerjee A, Manna S and Saha SK, 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**:4641–4650 (2014).
- Barbosa WF, Tomé HV, Bernardes RC, Siqueira MAL, Smagghe G and Guedes RNC, Biopesticide-induced behavioral and morphological

- alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ Toxicol Chem* **34**:2149–2158 (2015).
- 30 Lucantoni L, Giusti F, Cristofaro M, Pasqualini L, Esposito F, Lupetti P *et al.*, Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue Cell* **38**:361–371 (2006).
 - 31 Dembo EG, Abay SM, Dahiya N, Ogboi JS, Christophides GK, Lupidi G *et al.*, Impact of repeated NeemAzal®-treated blood meals on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Parasit Vectors* **8**:94 (2015).
 - 32 Evans BG and Hallett RH, Efficacy of biopesticides for management of the swede midge (Diptera: Cecidomyiidae). *J Econ Entomol* **109**:2159–2167 (2016).
 - 33 Huang JF, Shui KJ, Li HY, Hu MY and Zhong GH, Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SI-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. *Pestic Biochem Physiol* **99**:16–24 (2011).
 - 34 Qiao J, Zou X, Lai D, Yan Y, Wang Q, Li W *et al.*, Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. *Pest Manag Sci* **70**:1041–1047 (2014).
 - 35 Bezzar-Bendjazia R, Kilani-Morakchi S and Aribi N, Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. *Pestic Biochem Physiol* **133**:85–90 (2016).
 - 36 Boulahbel B, Aribi N, Kilani-Morakchi S and Soltani N, Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone. *Afr Entomol* **23**:224–233 (2015).
 - 37 Sundaram KMS and Sloane L, Effects of pure and formulated azadirachtin a neem-based biopesticide, on the phytophagous spider mite, *Tetranychus urticae*. *J Environ Sci Health B* **30**:801–814 (1995).
 - 38 Riba M, Marti J and Sans A, Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). *J Appl Entomol* **127**:37–41 (2003).
 - 39 Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscio D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F *et al.*, Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:18466–18471 (2013).
 - 40 Abbott WS, A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* **18**:265–267 (1925).
 - 41 Lindsley DL and Tokuyasu KT, Spermatogenesis, in *Genetics and Biology in Drosophila*, 2nd edition, ed. by Ashburner M and Wright T. Academic Press, New York, pp. 225–294 (1980).
 - 42 Montchamp-Moreau C and Joly D, Abnormal spermiogenesis is associated with the X-linked sex-ratio trait in *Drosophila simulans*. *Heredity* **79**:24–30 (1997).
 - 43 Lumbreras CJ, Galante E and Mena J, Ovarian condition as an indicator of the phenology of *Bubas bubalus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Ann Entomol Soc Am* **84**:190–194 (1991).
 - 44 Andreazza F, Bernardi D, Baronio CA, Pasinato J, Nava DE and Botton M, Toxicities and effects of insecticidal toxic baits to control *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Pest Manag Sci* **73**:146–152 (2017).
 - 45 Ureña E, Manjón C, Franch-Marro X and Martín D, Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:7024–7029 (2014).
 - 46 De Andrade-Coelho CA, De Souza NA, Silva VC, Souza AA, Gonzalez MS and Rangel EF, Effects of azadirachtin on the biology of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) adult female, the main vector of American visceral leishmaniasis. *J Med Entomol* **51**:891–895 (2014).
 - 47 Ahmad S, Ansari MS and Muslim M, Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Crop Prot* **68**:72–78 (2015).
 - 48 Da Costa JT, Forim MR, Costa ES, De Souza JR, Mondego JM and Junior ALB, Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* Boheman, 1833 (Coleoptera: Bruchidae) on beans. *J Stored Prod Res* **56**:49–53 (2014).
 - 49 Efrom CFS, Redaelli LR, Meirelles RN and Ourique CB, Side-effects of pesticides used in the organic system of production on *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. *Braz Arch Biol Technol* **55**:47–53 (2012).
 - 50 Asaduzzaman M, Shim JK, Lee S and Lee KY, Azadirachtin ingestion is lethal and inhibits expression of ferritin and thioredoxin peroxidase genes of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *J Asia Pac Entomol* **19**:1–4 (2016).
 - 51 Tofel KH, Nukenine EN, Stähler M and Adler C, Degradation of azadirachtin A on treated maize and cowpea and the persistence of *Azadirachta indica* seed oil on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. *J Stored Prod Res* **69**:207–212 (2016).
 - 52 Lavialle-Defaix C, Moignot B, Legros C and Lapiet B, 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**:264–272 (2010).
 - 53 Shao X, Lai D, Zhang L and Xu H, Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by azadirachtin A in *Spodoptera litura* cells. *Sci Rep* **6**:35482 (2016).
 - 54 Toivonen JM and Partridge L, Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. *Mol Cell Endocrinol* **299**:39–50 (2009).
 - 55 Nässel DR and Broeck JV, Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell Mol Life Sci* **73**:271–290 (2016).
 - 56 Xu L, Li S, Ran X, Liu C, Lin R and Wang J, Apoptotic activity and gene responses in *Drosophila melanogaster* S2 cells, induced by azadirachtin A. *Pest Manag Sci* **72**:1710–1717 (2016).
 - 57 Wang Z, Cheng X, Meng Q, Wang P, Shu B, Hu Q *et al.*, Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Int J Biochem Cell Biol* **64**:126–135 (2015).
 - 58 Shannag HK, Capinera JL and Freihat NM, Effects of neem-based insecticides on consumption and utilization of food in larvae of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Sci* **15**:152–165 (2015).
 - 59 Kilani-Morakchi S, Bezzar-Bendjazia R, Ferdinache M and Aribi N, Preimaginal exposure to azadirachtin affects food selection and digestive enzymes in adults of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pestic Biochem Physiol* **140**:58–64 (2017).
 - 60 Senthil-Nathan S, Physiological and biochemical effect of neem and other plant secondary metabolites against Lepidoptera insects. *Front Physiol* **4**:1–17 (2013).
 - 61 Wijesekera TP, Saurabh S and Dauwalder B, Juvenile hormone is required in adult males for drosophila courtship. *PLoS One* **11**:e0151912 (2016).
 - 62 Bilen J, Atallah J, Azanchi R, Levine JD and Riddiford LM, Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:18321–18326 (2013).
 - 63 Rauschenbach IY, Karpova EK, Burdina EV, Adonyeva NV, Bykov RA, Ilinsky YY *et al.*, Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females. *Gen Comp Endocrinol* **243**:1–9 (2017).
 - 64 Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A, Cahill DM, Barrow CJ, Sehgal R *et al.*, Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Front Plant Sci* **8**:610 (2017).
 - 65 Shaurub ESH, El-Meguid AA and El-Aziz NMA, 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 (2014).
 - 66 Swevers L, Raikhel AS, Sappington TW, Shirk P and Iatrou K, Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle, in *Comprehensive Molecular Insect Science*, ed. by Gilbert LI, Iatrou K and Gill SS. Elsevier, Oxford, UK, pp. 87–156 (2005).
 - 67 Wu Z, Guo W, Xie Y and Zhou S, Juvenile hormone activates the transcription of cell-division-cycle 6 (Cdc6) for polyploidy-dependent insect vitellogenesis and oogenesis. *J Biol Chem* **291**:5418–5427 (2016).
 - 68 Vivekananthan T, Selvisabhanayakam and Suresh N, Histopathological observations on testes of adult blister beetle, *Mylabris indica* (Thunberg) (Coleoptera: Meloidae) treated with neem. *J Entomol Res* **38**:45–52 (2014).
 - 69 Argue KJ, Yun AJ and Neckameyer WS, Early manipulation of juvenile hormone has sexually dimorphic effects on mature adult behavior in *Drosophila melanogaster*. *Horm Behav* **64**:589–597 (2013).
 - 70 Deady LD and Sun J, A follicle rupture assay reveals an essential role for follicular adrenergic signaling in *Drosophila* ovulation. *PLoS Genet* **11**:e1005604 (2015).



Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)

N. Aribi^{a,*}, M.C. Oulhaci^a, S. Kilani-Morakchi^a, J.C. Sandoz^b, L. Kaiser^b, B. Denis^b, D. Joly^b

^a Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000 Annaba, Algeria

^b Laboratoire Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie, UMR 9191, CNRS, IRD, Université Paris-Sud et Université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, F- 91198 Gif-sur-Yvette, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Natural pesticide
Azadirachtin
Remating
Male activity
Sexual selection
Drosophila

ABSTRACT

Azadirachtin, a neem compound (*Azadirachta indica*) with medical and anti-insect properties, is one the most successful botanical pesticides in agricultural use. However, its controversial impact on non-targeted species and its mechanism of action need to be clarified. In addition, Azadirachtin impact on pre- and post-mating traits remains largely undocumented. The current study examined the effects of Azadirachtin on *Drosophila melanogaster* as a non-target and model species. Azadirachtin was applied topically at its LD₅₀ (0.63 µg) on the day of adult emergence and its effect was evaluated on several traits of reproductive behavior: mate choice, male activity, female sexual receptivity, sperm storage and female sterility. In choice and no choice conditions, only male treatment reduced mating probability. Female treatment impaired mating probability only when males had the choice. Males' mating ability may have been impaired by an effect of the treatment on their mobility. Such an effect was observed in the actimeter, which revealed that treated males were less active than untreated ones, and this effect persisted over 8 days. Azadirachtin treatment had, however, no effect on the nycthemeral rhythm of those males. Even when mating occurred, Azadirachtin treatment impaired post-mating responses especially when females or both sexes were treated: remating probability increases and female fertility (presence of larvae) decreases. No impairment was observed on the efficiency of mating, evaluated by the presence of sperm in the spermatheca or the ventral receptacle. Male treatment only had no significant effect on these post-mating responses. These findings provide clear evidence that Azadirachtin alters the reproductive behavior of both sexes in *D. melanogaster* via mating and post-mating processes.

1. Introduction

Reproductive success depends on a large set of traits that can be broadly classified into pre- and post-copulatory traits. Males searching for females use a wide array of sensory stimuli from visual, olfactory, gustatory, tactile, acoustic and mechano sensory modalities [1,2]. Female sexual attractivity and receptivity also depend on a number of physiological, hormonal and behavioral processes underlying the interactions between sexual partners [3,4]. In addition, environmental conditions may strongly impact mating and reproductive success, as for instance the exposure to natural compounds with pesticidal properties (biopesticides) used in agriculture. Because these natural pesticides may also affect non-target species, their effects need to be more deeply investigated, especially on non-target insects, which may be particularly impacted [5].

Azadirachtin is an effective botanical insecticide isolated from the neem tree *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). It is widely used in

agriculture and is considered as having a low environmental impact, because it is non-toxic to vertebrates and has no genotoxicity for mammals [6]. Nevertheless, this pesticide shows a strong toxicity for many insect pests of different orders [7,8,9,10,11,12], so that its toxicity to non-target species remains controversial [5,13,14,15,16,17,18]. Azadirachtin is an insect growth disrupter (IGD), which acts by interfering with the insect endocrine signaling molecules, juvenile hormone (JH) and 20-hydroxyecdysone (20E), leading to deleterious effects on development and reproduction (oocyte structure, fecundity, oviposition and egg viability) [7,10,19,20,21,22]. In addition, some studies suggest Azadirachtin impacts on the nervous system [23] and the insulin-signaling pathway [24]. Several works show that Azadirachtin influences the oviposition behavior of various insects [9,13,25,26], but the exact impact on sexual behavior and post-mating responses is poorly understood. In the present study, we evaluated the possible effects of Azadirachtin on several traits of reproductive behavior in *Drosophila melanogaster*, and in particular on post-mating processes. Knowledge of the

* Corresponding author.

E-mail address: nadia.aribi@univ-annaba.dz (N. Aribi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.09.002>

Received 23 May 2017; Received in revised form 5 August 2017; Accepted 2 September 2017

Available online 05 September 2017

0048-3575/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

physiology, endocrinology and genetics of *Drosophila* is highly valuable for understanding the mechanisms of action of molecules like pesticides. In addition, post-mating behavioral processes are well known in *D. melanogaster*.

In *Drosophila*, ecdysone, JH and insuline-signaling pathways control the mating process [27,28] in tandem with the brain [2,29,30]. Furthermore, ecdysteroid-signaling is essential for pheromone synthesis [31] and JH has been shown to regulate pheromone maturation and female mating behavior [32]. Mated females show post-mating responses (PMR), including decreased mating receptivity, enhanced oogenesis, changes in sperm storage and use, egg-laying and modulated regulation of JH [33,34,35,36]. These PMR are induced by the male seminal fluid transferred during copulation, which is mainly constituted by accessory gland proteins (Acps) [37]. The purpose of this study was to investigate Azadirachtin effects (i) on *D. melanogaster* sexual behavior through the study of male activity and mating success, and (ii) on several PMR, i.e. sperm storage, egg-laying and female receptivity for additional mating.

2. Material and methods

2.1. Insect rearing and treatment

D. melanogaster (Canton-S) was reared on standard corn-meal food at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% relative humidity with a 12 h light/dark photoperiod. Flies were transferred every three days to avoid larval competition and to regularly provide abundant progeny for testing.

The commercial formulation of Azadirachtin, NeemAzal (1% Azadirachtin; TrifolioM GmbH; Lahnau, Germany), was dissolved in acetone and topically applied on adults at the lethal dose or LD_{50} ($0.63 \mu\text{g}$) evaluated previously by Oulhaci et al. [38]. All insects were subjected to a topical application: “control” insects were treated with solvent (acetone) alone [38].

2.2. Mating assays

Newly-emerged male and female flies (< 6 h post-emergence) were separated and treated topically with Azadirachtin. Then control (M_C , F_C) and treated (M_T , F_T) males and females were placed in vials (25 mm in diameter, 95 mm in height) containing a standard corn-meal medium. After 48 h, males and females (survivors) were mated in choice and no-choice assays. In the no-choice assay, one male and one female were placed together in individual vials with food. Four conditions were tested: $M_C + F_C$, $M_C + F_T$, $M_T + F_C$, $M_T + F_T$. In the choice assay, one male and two females or one female and two males were placed together in individual vials. Four conditions were tested: $M_C + F_C/F_T$, $M_T + F_C/F_T$, $F_C + M_C/M_T$, $F_T + M_C/M_T$.

Before Azadirachtin treatment, flies were anesthetized on ice and marked under a binocular microscope by punching a tiny hole with a needle on the posterior part of the right wing. This marking procedure allowed treated and untreated flies to be differentiated. Statistical analysis did not show any effect of this marking on reproductive success (Student's *t*-test, $p > 0.11$ for all conditions). Mating was monitored for 3 h in the morning. For each condition, the number of matings was counted and then expressed as a mating percentage.

2.3. Male activity

In order to understand the impact of Azadirachtin on the males' activity, their motility was analyzed using a tubular actimeter, commonly used for monitoring locomotor activity rhythms in adult fruit flies (*Drosophila* Activity Monitor DAM2-5, Trikinetics, Waltham, MA, USA). Recently emerged males (< 6 h) were separated and treated topically with Azadirachtin at the LD_{50} ($0.63 \mu\text{g}$). Then, control and treated males (survivors) were placed separately in vials containing standard corn-meal medium. After 48 h, control and treated males were

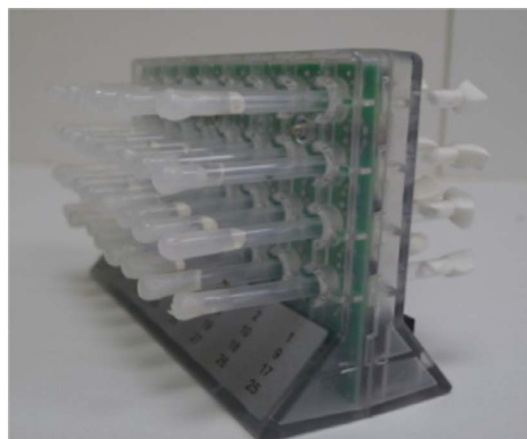


Fig. 1. Actimeter for testing male motility. The DAM actimeter is a monitor made up of a grid pierced with 32 holes. A 65×5 mm polycarbonate tube (5 mm i.d.) is inserted into each hole, which is equipped with an infrared photoelectric detector. This configuration allows for automatic, continuous, and simultaneous recording of the displacements of 32 individuals. At one end of the tube, standard corn-meal medium was inserted and the tube was closed with paraffin.

disposed individually in the tubes of the actimeter containing diet at one end, and their motility was monitored for 8 days (Fig. 1). Displacement of individual *Drosophila* trapped in the tubular unit was detected each time the insect was caught in an infrared beam. The detection events perceived by each cell were transmitted to a computer equipped with the DAMSystem collection software that allows the number of passages to be counted. A comparison of the males' motility in the two groups was performed.

2.4. Sperm storage within females

The effect of Azadirachtin on the success of sperm storage in the female genital tract was assessed in both ventral receptacle and spermatheca. Recently emerged adults (< 6 h) were separated and treated topically with Azadirachtin at LD_{50} ($0.63 \mu\text{g}$). Males and females of the control and treated series (survivors) were placed separately in plastic vials containing standard corn-meal medium. After 48 h, four mating conditions were tested: $M_C + F_C$, $M_C + F_T$, $M_T + F_C$, $M_T + F_T$. Three hours after mating, females were frozen and dissected under a stereo microscope. The number of females exhibiting sperm within the spermatheca or the ventral receptacle was noted and the results were expressed in percentages.

2.5. Female sexual receptivity to remating

Azadirachtin was tested on the receptivity of females to assess their capacity to remate after a first mating with treated or untreated males. Recently emerged adults (< 6 h) were separated and treated topically with Azadirachtin at the LD_{50} ($0.63 \mu\text{g}$). Males and females of the control and treated series (survivors) were placed separately in vials containing standard corn-meal medium. After 48 h, four conditions were tested: $M_C + F_C$, $M_C + F_T$, $M_T + F_C$, $M_T + F_T$. Seven days after the first mating, which is less than the time needed by females to recover their sexual receptivity [39], a new 4 day-old male was proposed to the female for remating. The number of remating was noted and results were expressed in percentages.

2.6. Female sterility

Newly emerged adults (< 6 h) were separated and treated topically with Azadirachtin at the LD_{50} ($0.63 \mu\text{g}$). Males and females of the control and treated series (survivors) were placed separately in vials containing standard corn-meal medium. After 48 h, four conditions

were tested: $M_C + F_C$, $M_C + F_T$, $M_T + F_C$, $M_T + F_T$. Two days later, females without larvae were counted as sterile and results were expressed in percentage.

2.7. Statistical analysis

In all experiments except for the one evaluating male activity, the recorded data were dichotomous 0 and 1 (mating, sperm storage, remating and female offspring percentages). Most experiments contained one control group ($M_C + F_C$) in which both male and female were untreated, and three test groups in which at least one sex was treated: $M_C + F_T$, $M_T + F_C$ and $M_T + F_T$. In these experiments, each treated group was compared to the control group using Fisher's exact test. In the two choice mating experiments, insects had a choice between one treated and one untreated individual of the opposite sex. Mating success, defined as the proportion of trials in which the focal animal mated with one of the choice animals, was compared between groups using Fisher's exact test. Within each group, the proportion of mating with the control and with the treated individual was compared to a 50% theoretical distribution (equal attractiveness) using the exact binomial test.

In the experiment evaluating male activity, actimeter data provide numbers of passages per male per day. For statistical analysis, the data were square-roots transformed to achieve normality (tested using Shapiro-Wilk's test) and homoscedasticity (tested using Brown-Forsythe's test). Then a repeated-measure ANOVA was used on the transformed data, with *Day* as repeated measure and *Treatment* as between-group factor. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (v 6.01 for Windows), Statistica 10 (Statsoft) and R 3.3.1 (RDevelopment Core Team, 2008).

3. Results

3.1. Mating tests in choice and no-choice conditions

In *D. melanogaster*, Azadirachtin applied topically (LD_{50}) the day of adult emergence induced, 48 h after treatment, clear effects on mating success in all tested conditions (Fig. 2A, B and C).

In the no-choice condition (Fig. 2A), the mating percentage, compared to controls ($M_C + F_C$, 43.2%), declined when only males were treated ($M_T + F_C$, 16.8%, Fisher's exact test, $p < 0.001$) or when both sexes were treated ($M_T + F_T$, 13.8%, Fisher's exact test, $p < 0.001$). However, results showed no effect when only the females were treated ($M_C + F_T$, 39.4%, Fisher's exact test, $p = 0.55$).

In the male choice condition (Fig. 2B), two groups were tested, with either an untreated male (two left bars) or a treated male (two right bars), which each had a choice between a treated and an untreated female. When assessing mating success of the focal male, i.e. the proportion of replicates in which mating was successful with either one of the females, we found that treated males mated less often than control males (30.7% vs 61.6% respectively, Fisher's exact test, $p < 0.001$). Generally, males tended to mate more often with the untreated female than with the treated female. The comparison was highly significant for treated males (M_T choosing F_C , 23.5% vs M_T choosing F_T , 7.2%, Exact binomial test, $p < 0.001$) and on the verge of significance for control males (M_C choosing F_C , 39.5% vs M_C choosing F_T , 22.1%, Exact binomial test, $p = 0.053$).

In the female choice condition (Fig. 2C), two groups were also tested, with either an untreated female (two left bars) or a treated female (two right bars), which had a choice between a treated and an untreated male. When assessing the mating success of the focal female (proportion of replicates in which mating was successful with either one of the males), we found that treated and control females mated just as frequently (59.0% vs 46.7% respectively, Fisher's exact test, $p = 0.15$). In both conditions, males mated more often with the untreated female than with the treated female (F_C choosing M_C , 36.0% vs F_C choosing M_T ,

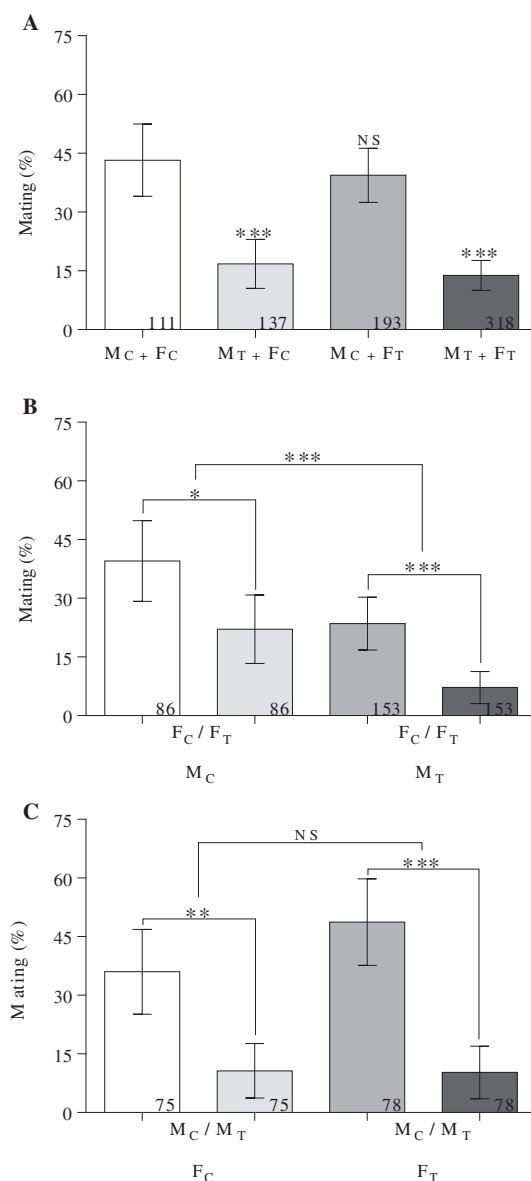


Fig. 2. Effects of Azadirachtin on mating observed 48 h after treatment (0.63 μ g) by topical application on the day of adult emergence of *D. melanogaster* (mean with 95% confidence intervals; $n = 75$ –318; M_C : male control; F_C : female control; M_T : male treated; F_T : female treated). Mating percentages in the no-choice condition (A); the male choice condition (B); the female choice condition (C). Numbers within each bar indicate the number of repetitions; * indicates significant difference at $p \leq 0.05$; ** indicate significant differences at $p \leq 0.01$; *** indicates significant differences $p \leq 0.001$.

10.7%, Exact binomial test, $p < 0.01$ and F_T choosing M_C , 48.7% vs F_T choosing M_T , 10.3%, Exact binomial test, $p < 0.001$).

3.2. Male activity

The number of male passages was observed for 8 days, starting 48 h after Azadirachtin treatment. Fig. 3 shows the average profiles of male activity throughout the day in control and treated flies (average of 8 days). While both groups showed the same activity profile, treated males displayed lower activity between 3 and 21 h (Fig. 3). When evaluating male activity throughout the 8 days of the experiment (Fig. 4), we found a general reduction in the total number of passages made by treated males compared to controls (Fig. 4, repeated-measure ANOVA, *Treatment effect*, $F_{1, 581} = 8.66$, $p < 0.01$). While there was a significant effect of the day considered (*Day effect*, $F_{7, 581} = 5.90$,

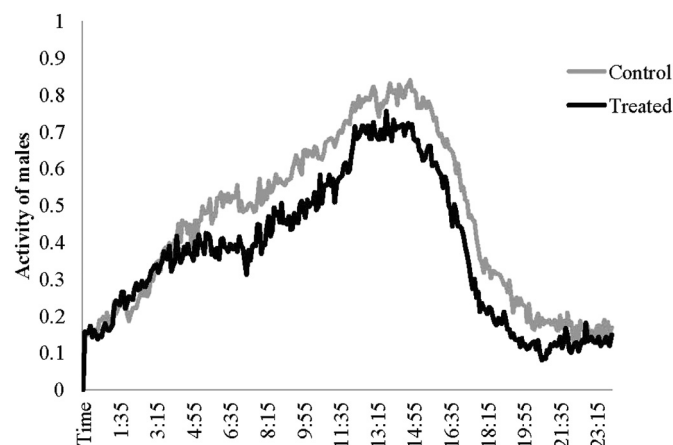


Fig. 3. Effects of Azadirachtin applied topically (0.63 μ g) on the day of *D. melanogaster* male emergence on cumulative activity profiles for 8 days. The activity profiles were observed 48 h after treatment ($n = 42$ –43).

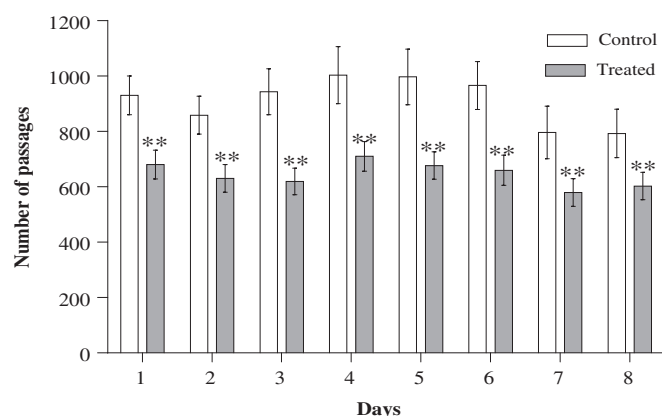


Fig. 4. Effects of Azadirachtin applied topically (0.63 μ g) on the day of emergence on male activity for 8 days. The number of passages was observed 48 h after topical application (mean $\pm$ SE; $n = 42$ –43). ** indicate significant differences at $p \leq 0.01$ between controls and treated for each day.

$p < 0.001$), the interaction between *Day* and *Treatment* was not significant ($F_{7, 581} = 0.75$, $p = 0.65$). We conclude that treated males were less active than control males throughout the 8 days of the experiment.

3.3. Sperm storage within females

Azadirachtin topical application (0.63 μ g) on the day of adult emergence did not produce any effects on the number of females storing sperm in the ventral receptacle (Fig. 5A) and the spermatheca (Fig. 5B). Treated and control females were able to store sperm similarly. Indeed, no significant differences appeared between the treated groups ($M_C + F_T$, $M_T + F_C$ and $M_T + F_T$) and the control group ($M_C + F_C$), both in the spermatheca (Fisher's exact test, $p = 0.36$) and in the ventral receptacle (Fisher's exact test, $p = 0.25$).

3.4. Female sexual receptivity to remating

Azadirachtin applied topically (LD_{50}) on the day of adult emergence had an effect on female remating (Fig. 6). Compared to the control ($M_C + F_C$, 15.3%), the proportion of remating was significantly higher when both sexes were treated ($M_T + F_T$, 32.7%, Fisher's exact test, $p < 0.05$). The effect was near significant when only females were treated ($M_C + F_T$, 28.4%, Fisher's exact test, $p = 0.078$). No difference appeared however when only males were treated ($M_T + F_C$, 15.8%,

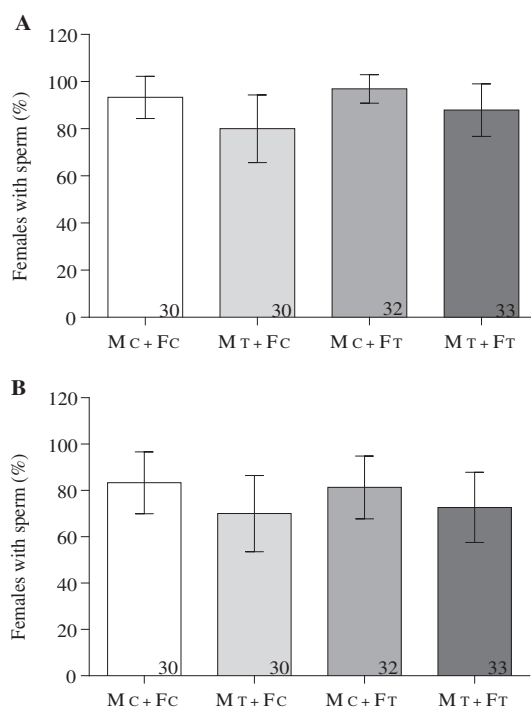


Fig. 5. Effects of Azadirachtin applied topically (0.63 μ g) on the day of adult emergence on sperm storage in ventral receptacle (A) and spermatheca (B). The females with sperm were observed 3 h after mating (M_C : male control; F_C : female control; M_T : male treated; F_T : female treated) occurring 48 h after treatment (mean with 95% confidence intervals; $n = 30$ –33). Numbers within each bar indicate the number of repetitions; for all treated series, no significant differences for ventral receptacle ($p = 0.25$) and for spermatheca ($p = 0.36$) with respect to controls.

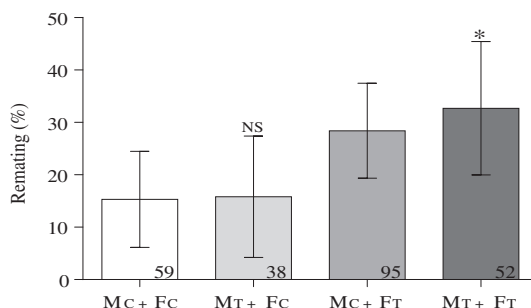


Fig. 6. Effects of Azadirachtin applied topically (0.63 μ g) on the day of adult emergence on female remating. Remating percentages were measured 7 days after the first mating (M_C : male control; F_C : female control; M_T : male treated; F_T : female treated), occurring 48 h after topical application (mean with 95% confidence intervals; $n = 38$ –95). Numbers within each bar indicate the number of repetitions; * indicates significant difference with respect to controls at $p \leq 0.05$.

Fisher's exact test, $p = 1.0$).

3.5. Female offspring

Azadirachtin applied topically (LD_{50}) also had an effect on female sterility (Fig. 7). The percentage of mated females without larvae in spawning increased when both sexes were treated (26.9%) compared to the controls (8.5%, Fisher's exact test, $p < 0.05$). When only the males (5.3%) or the females (18.9%) were treated, no significant effect was observed compared to controls (Fisher's exact test, respectively $p = 0.70$ and $p = 0.10$).

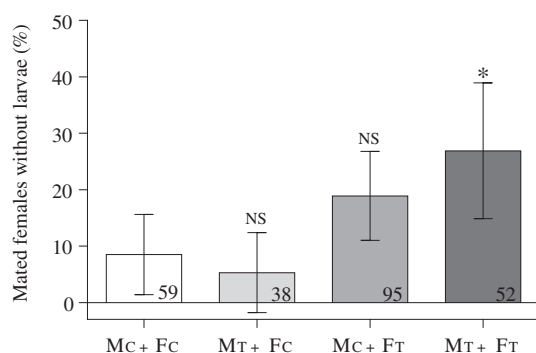


Fig. 7. Effects of Azadirachtin applied topically (0.63 μ g) on the day of adult emergence. The number of females without larvae in spawning was counted 2 days after mating (MC: male control; Fc: female control; MT: male treated; Ft: female treated) occurring 48 h after topical application (mean with 95% confidence intervals; $n = 38$ –95). Numbers within each bar indicate the number of repetitions; * indicate significant difference with respect to controls at $p \leq 0.05$.

4. Discussion

Our results show that reproduction in a non-targeted insect like *D. melanogaster* is impacted by Azadirachtin. This botanical insecticide reduced mating probability and motility in the treated males, but had no effect on the nycthemeral rhythm. When mating occurred, Azadirachtin treatment impaired female fertility, as noticed by an absence of larvae but increased remating probability. No impairment of the efficiency of mating was observed (presence of sperm in the spermatheca and ventral receptacle).

Topical application of Azadirachtin induced a reduction of mating success in all choice conditions. Previous reports using other IGDs, like ecdysteroid agonists, demonstrated decrease infertility with a reduction in mating success in several insects [40,41,42,43]. Male mating behavior in *D. melanogaster* appears to be controlled by an insulin/insulin-like growth factor and ecdysone-signaling pathways [27] but JH also plays an important role in mating regulation processes [28]. Consequently, the observed impact of Azadirachtin on mating can be explained by the widely documented inhibition of JH and ecdysteroids by Azadirachtin action [7] and their interaction with insulin-signaling [44]. In choice and no choice conditions, only male treatment reduced mating probability in *D. melanogaster*. When females had the choice, they mated less frequently with treated males. However, female treatment also impaired mating probability, because when males had the choice, they mated less frequently with treated females. Males' mating ability may have been impaired by an effect of the treatment on their motility or activity. Such an effect was observed in the actimeter, which revealed that the treated males were less active than untreated ones, in spite of similar nycthemeral rhythms. These results are in agreement with those of Lima et al. [16], who reported similar results in *Neoseiulus baraki* (Acari). These authors also showed that while the pesticide impairs the overall activity of the males, the search for females is not affected [16]. Thus, the observed differences between all tested conditions may be attributable both to the female physiological state and male motility. Indeed, since mating is a negotiation between the two sexes, the behaviors of both are likely to interact and influence mating outcomes [45]. Consequently, changes in females' sexual attractiveness can be explained by Azadirachtin antagonist action on major hormones (JH and ecdysteroids), in the reproduction process [46] and can be linked to the observed infertility induced by the pesticide [7,21,38]. It is well established that feedback/release of ecdysone and JH depend on a neural regulation [47,48]. Moreover, Azadirachtin is known for its neurotoxic action by blocking of voltage-gated calcium channels [23]. For courtship and mating success, many sensory modalities, including olfaction, are needed by *D. melanogaster* males to find their mates [2,29,30]. Thus, a mating decrease, observed in all conditions, may also

be due to an impact of Azadirachtin on these sensory modalities in the treated males.

Mating decisions are controlled by a balance of excitatory and inhibitory drives onto central courtship-promoting neurons [49]. Neuromodulators like serotonin (5-HT), octopamine (OA) and dopamine (DA) have central effects on the adult *Drosophila* brain in relation with learning and behavior and their actions can influence the decision to engage in locomotion, fight or courtship activities [50,51,52]. In *Drosophila*, the sexually dimorphic circuit (motor neurons, interneurons and mechanosensory neurons) controls reproductive processes such as sperm ejection in males, ovipositor extension, sperm storage and egg-laying decisions in females [53,54,55]. Furthermore, DA interacts differentially with JH depending on the sex of the animal [56] and is known to mediate ovarian development, sexual receptivity and fertility [57,58,59]. Recent studies show that the insulin-signaling pathway regulates JH and DA metabolism [60]; consequently, Azadirachtin impact on insulin and JH signaling as well as also its neurotoxic action could explain the greater sensitivity of *D. melanogaster* treated females noted in our experiments; this, in spite of similar survival to Azadirachtin between males and females [38]. Indeed, no significant effect was observed on post-mating responses in treated males. Mating stimulates female germline stem cell (GSC) proliferation in *D. melanogaster* via ecdysteroid-signaling [61]; GSC activity is coordinately regulated by the neuroendocrine system to sustain the reproductive success in response to mating [48,61]. In addition, oogenesis, vitellogenesis, egg maturation and oviposition are controlled by ecdysteroid and JH [45,46]. Therefore, a wide range of possible mechanisms could be involved in the observed impact of Azadirachtin on female fertility. Results obtained on sterility in treated females show higher values comparatively to those obtained in treated males but they are not significantly different. This could be linked with impairment of oviposition inducing considerable variability in oviposition delay between individuals. We might have observed a significant difference during a longer period of experimentation. When mating occurred, however, no impairment was observed on the efficiency of mating, evaluated by the presence of sperm in female genital tracts (spermatheca and ventral receptacle). In *D. melanogaster* females, sperm release is regulated by neuromodulators like OA [62]. At this level, Azadirachtin could have impacted sperm use through a potential blockage in the genital tracts via the neurotoxic action.

In our results, female sterility was positively correlated with a remating increase. In untreated females, the decrease of productivity or production of infertile eggs can induce new mating [63]. Consequently, Azadirachtin impact on female fertility could explain the remating increase when both sexes were treated. Remating increase can also be linked to an impact of Azadirachtin on protein synthesis in the male accessory glands (for instance on the Sex peptide) via JH involvement [64]. Such potential modifications of the seminal fluid could favor female remating receptivity. Furthermore, the *D. melanogaster* female remating rate can be modulated by JH action via regulation of the sex pheromones and hydrocarbon production [32,65]. Like JH, ecdysteroid-signaling is essential in pheromone synthesis for the maintenance of cuticular lipids and oenocytes throughout adulthood, [31] and these parameters may alter both the reproductive physiology and behavior of treated flies. Finally, in *D. melanogaster* an optimal nutritional level is required to maximize reproductive success through the initiation of effective pre- and post-mating responses in females [66,67]. Thus, an effect of Azadirachtin on nutrition [68] and on insulin-signaling [24] could also negatively impact several reproductive traits. Indeed, Azadirachtin induces, in *D. melanogaster*, a decrease in food intake, biochemical effects (decrease in α -amylase, chitinase, proteases and lipases), [69] and detrimental impacts on various tissues [7]. In addition, oxidative stress induced by Azadirachtin in *D. melanogaster* [21] can interact with ecdysteroid and insulin-signaling pathways [70].

D. melanogaster males and females showed a similar survival at LD₅₀

of Azadirachtin [38]. This effect was also found in other species like *Blatta orientalis* treated with Azadirachtin [71] or the *Blattella germanica* treated with Spinosad (another natural pesticide) [72]. However, in the *Blattella germanica* and for several other pesticides (Bendiocarb, Chlorpyrifos, Cyfluthrin, Cypermethrin, Fenvalerate, Hydramethylnon, Malathion, Propetamphos, propoxur, and pyrethrins) a difference of toxicity at LD₅₀ was observed between males and females, but also between females, gravid or not [73]. Thus pesticides may act differently within the same species. Indeed, in *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera) Beta-cypermethrin exposure (LD₂₀) induced a decrease of male-specific sex pheromone production and mating rate but without decreasing locomotor activity of treated males, whereas Spinosad exposure (LD₂₀) caused a significant decrease in male locomotor activity of *T. chilonis*, but did not affect male-specific sex pheromone production or mating rate [74].

In conclusion, our study documents several impairments of reproductive traits in *D. melanogaster* by topical application of Azadirachtin. These effects can be explained by a direct and/or an indirect action or through domino effects on the endocrinal, neuroendocrinal and neuronal complex [44,60,75]. Studying the sublethal effects of pesticides (like Azadirachtin or others molecules) is particularly important because it allows to better understand toxicological and physiological mechanisms induced by the treatment; consequently, the choice of pesticides and their use (single or combined treatment) in integrated pest management may be facilitated. Future work will aim to decipher which of the proposed effects actually play a crucial role in the observed reproductive defects.

Acknowledgements

We are very grateful to M. Bonneau and S. Nortier for their help in insect media preparation. We thank Claude Wicker-Thomas for fruitful discussions and M. Eden for English editing. This work was supported by the National Fund for Scientific Research of Algeria (Laboratory of Applied Animal Biology to Pr. N. Soltani) and a Grant from IDEEV (Institut Diversité, Ecologie et Evolution du Vivant, FR3284, CNRS, AAP-2014 to Dr. D. Joly).

References

- A. Vilella, J.C. Hall, Neurogenetics of courtship and mating in *Drosophila*, *Adv. Genet.* 62 (2008) 67–184, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)00603-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660(08)00603-2).
- A.B. Ziegler, M. Berthelot-Grosjean, Y. Grosjean, The smell of love in *Drosophila*, *Front. Physiol.* 4 (2013), <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00072>.
- J. Hunt, C.J. Breuker, J.A. Sadowski, A.J. Moore, Male–male competition, female mate choice and their interaction: determining total sexual selection, *J. Evol. Biol.* 22 (2009) 13–26, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01633.x>.
- M.F. Wolfner, Battle and ballet: molecular interactions between the sexes in *Drosophila*, *J. Hered.* 100 (2009) 399–410, <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esp013>.
- W.F. Barbosa, L. De Meyer, R.N. Guedes, G. Smaghe, Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), *Ecotoxicology* 24 (2015) 130–142, <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-014-1365-9>.
- A. Saxena, V.P. Kesari, Lack of genotoxic potential of pesticides, spinosad, imidacloprid and neem oil in mice (*Mus musculus*), *J. Environ. Biol.* 37 (2016) 291–295.
- A.J. Mordue, E.D. Morgan, A.J. Nisbet, Azadirachtin, a natural product in insect control, in: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier Oxford, UK, 2005, pp. 117–135.
- E.L. Scudeler, D.C.D. Santos, Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae), *Micron* 44 (2013) 125–132, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.05.009>.
- H.V.V. Tomé, J.C. Martins, S. Correea, T.V.S. Galdino, M.C. Picançon, R.N.C. Guedes, Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*, *Crop. Prot.* 46 (2013) 63–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.12.021>.
- Z. Abedi, M. Saber, S. Vojoudi, V. Mahdavi, E. Parsaeyan, Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, *J. Insect. Sci.* 14 (2014) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1673/031.014.30>.
- B. Dere, H. Altuntas, Z.U. Nurullahoglu, Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 89 (2015) 138–152, <http://dx.doi.org/10.1002/arch.21231>.
- T.M. Poland, T.M. Ciaramitaro, D.G. McCullough, Laboratory evaluation of the toxicity of systemic insecticides to emerald ash borer larvae, *J. Econ. Entomol.* 109 (2016) 705–716, <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov381>.
- E.M.G. Cordeiro, A.S. Corrêa, M. Venzon, R.N.C. Guedes, Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*, Chemospheremes and surnames have been identified correctly and are presented in the desired order, and please carefully verify the spe 81 (2010) 1352–1357, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.021>.
- S. Kumar, R.P. Raman, P.K. Pandey, S. Mohanty, A. Kumar, K. Kumar, 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 (2013) 564–573, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.038>.
- A. Banerjee, S. Manna, S.K. Saha, 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 (2014) 4641–4650, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4155-7>.
- D.B. Lima, J.W.S. Melo, N.M.P. Guedes, L.M. Gontijo, R.N.C. Guedes, M.G.C. Gondim Jr., Bioinsecticide–predator interactions: azadirachtin behavioral and reproductive impairment of the coconut mite predator *Neoseiulus baraki*, *PLoS One* 10 (2015) e0118343, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118343>.
- A. Luna-Cruz, E. Rodríguez-Leyva, J.R. Lomeli-Flores, L.D. Ortega-Arenas, N. Bautista-Martínez, S. Pineda, Toxicity and residual activity of insecticides against *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), *J. Econ. Entomol.* 108 (2015) 2289–2295, <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov206>.
- L.M. Turchen, V. Golini, A.R. Butnariu, R.N.C. Guedes, M.J.B. Pereira, Lethal and sublethal effects of insecticides on the egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae), *J. Econ. Entomol.* 109 (2016) 84–92, <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov273>.
- M.A. Silva, G.C.D. Bezerra-Silva, J.D. Vendramim, M.R. Forim, I.C.G. Sá, Threshold concentration of limonoids (azamax) for preventing infestation by mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae), *J. Econ. Entomol.* 108 (2015) 629–639, <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tou056>.
- E.G. Dembo, S.M. Abay, N. Dahiya, J.S. Ogoi, G.K. Christophides, G. Lupidi, G. Chianese, L. Lucantoni, A. Habluetzel, Impact of repeated NeemAzal®-treated blood meals on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes, *Parasit. Vectors* 8 (94) (2015) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0700-1>.
- B. Boulahbel, N. Aribi, S. Kilani-Morakchi, N. Soltani, Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone, *Afr. Entomol.* 23 (2015) 224–233, <http://dx.doi.org/10.4001/003.023.0104>.
- B.G. Evans, R.H. Hallett, Efficacy of biopesticides for management of the swede midge (Diptera: Cecidomyiidae), *J. Econ. Entomol.* 109 (2016) 2159–2167, <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tow192>.
- J. Qiao, X. Zou, D. Lai, Y. Yan, Q. Wang, W. Li, S. Deng, H. Xu, H. Gu, Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*, *Pest Manag. Sci.* 70 (2013) 1041–1047, <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3644>.
- X. Shao, D. Lai, L. Zhang, H. Xu, Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by Azadirachtin A in *Spodoptera litura* Cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35482, <http://dx.doi.org/10.1038/srep35482>.
- D.L. Ma, G. Gordh, M.P. Zalucki, Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on cotton and artificial diet, *Aust. J. Entomol.* 39 (2000) 301–304, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-6055.2000.00180.x>.
- R. Bezzar-Bendjazia, S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 133 (2016) 85–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.02.009>.
- S. Teseo, L. Veerus, F. Mery, Fighting experience affects fruit fly behavior in a mating context, *F. Sci. Nat.* 103 (2016) 1–4, <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-016-1368-x>.
- T.P. Wijesekera, S. Saurabh, B. Dauwalder, Juvenile hormone is required in adult males for *Drosophila* courtship, *PLoS One* 11 (2016) e0151912, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151912>.
- S.R. Lone, A. Venkataraman, M. Srivastava, S. Potdar, V.K. Sharma, Or47b-neurons promote male-mating success in *Drosophila*, *Biol. Lett.* 11 (2015) 20150292, <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0292>.
- W.Y. Lin, C. Williams, C. Yan, T. Koledachkina, K. Luedke, J. Dalton, S. Bloomsburg, N. Morrison, K.E. Duncan, C.C. Kim, J.Z. Parrish, The SLC 36 transporter synaptic is required for extreme dendrite growth in *Drosophila* sensory neurons, *Genes Dev.* 29 (2015) 1120–1135, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.259119.115>.
- Y.N. Chiang, K.J. Tan, H. Chung, O. Lavrynenko, A. Shevchenko, J.Y. Yew, Steroid hormone signaling is essential for pheromone production and oenocyte survival, *PLoS Genet.* 12 (2016) e006126, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1006126>.
- J. Bilen, J. Atallah, R. Azanchi, J.D. Levine, L.M. Riddiford, Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 18321–18326, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1318119110>.
- F.W. Avila, L.K. Sirot, B.A. LaFlamme, C.D. Rubinstein, M.F. Wolfner, Insect seminal fluid proteins: identification and function, *Annu. Rev. Entomol.* 56 (2011) 21–40, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144823>.

- [34] D.T. Smith, L.K. Sirot, M.F. Wolfner, D.J. Hosken, N. Wedell, The consequences of genetic variation in sex peptide expression levels for egg laying and retention in females, *Heredity* 109 (2012) 222–225, <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2012.32>.
- [35] J.L. Sitnik, D. Gligorov, R.K. Maeda, F. Karch, M.F. Wolfner, The female post-mating response requires genes expressed in the secondary cells of the male accessory gland in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 202 (2016) 1029–1041, <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.115.181644>.
- [36] K. Singh, M.A. Samant, M.T. Tom, N.G. Prasad, Evolution of pre-and post-copulatory traits in male *Drosophila melanogaster* as a correlated response to selection for resistance to cold stress, *PLoS One* 11 (2016) e0153629, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153629>.
- [37] P.S. Chen, E. Stumm-Zollinger, T. Aigaki, J. Balmer, M. Bienz, P. Böhlen, A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *Drosophila melanogaster*, *Cell* 54 (1988) 291–298, [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90192-4](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90192-4).
- [38] C.M. Oulhaci, B. Denis, S. Kilani-Morakchi, J.C. Sandoz, L. Kaiser, D. Joly, N. Aribi, Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera), *Pest Manag. Sci.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1002/ps.4678> available on line 24 July.
- [39] M.F. Wolfner, Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27 (1997) 179–192.
- [40] R. Dallaire, A. Labrecque, M. Marcotte, E. Baucé, J. Delisle, The sublethal effects of tebufenozide on the precopulatory and copulatory activities of *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana*, *Entomol. Exp. Appl.* 112 (2004) 169–181, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00193.x>.
- [41] S. Pineda, M.I. Schneider, G. Smaghe, A.M. Martínez, P. Del Estal, E. Viñuela, J. Valle, F. Budia, Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodopteralitoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), *J. Econ. Entomol.* 100 (2007) 773–780, [http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493\(2007\)100\[773:LASEOM\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493(2007)100[773:LASEOM]2.0.CO;2).
- [42] S. Kilani-Morakchi, N. Aribi, J.P. Farine, G. Smaghe, N. Soltani, Halofenozide affects sexual behaviour, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae), *Belg. J. Zool.* 139 (2009) 147–155.
- [43] S. Kilani-Morakchi, A. Badi, N. Aribi, J.P. Farine, N. Soltani, Toxicity of Tebufenozide, an ecdysteroid agonist, to *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae), *Afr. Entomol.* 22 (2014) 337–342, <http://dx.doi.org/10.4001/003.022.0211>.
- [44] D.R. Nässel, J.V. Broeck, Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 271–290, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-2063-3>.
- [45] S. Jagadeeshan, U. Shah, D. Chakrabarti, R.S. Singh, Female choice or male sex drive? The advantages of male body size during mating in *Drosophila melanogaster*, *PLoS One* 10 (2015) e0144672, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0144672>.
- [46] L. Swevers, A.S. Raikhel, T.W. Sappington, P. Shirk, K. Iatrou, Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle, in: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier Oxford, UK, 2005, pp. 87–156.
- [47] Q. Song, L.I. Gilbert, Protein phosphatase activity is required for prothoracicotropic hormone-stimulated ecdysteroidogenesis in the prothoracic glands of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31 (1996) 465–480, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1996\)31:4<465::AID-ARCH8>3.0.CO;2-U](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:4<465::AID-ARCH8>3.0.CO;2-U).
- [48] L. Schoofs, A. De Loof, M.B. Van Hiel, Neuropeptides as regulators of behavior in insects, *Annu. Rev. Entomol.* 62 (2017) 35–52, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035500>.
- [49] B.R. Kallman, H. Kim, K. Scott, Excitation and inhibition onto central courtship neurons biases *Drosophila* mate choice, *elife* 4 (2015) e11188, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.11188.001>.
- [50] E.D. Hoopfer, Neural control of aggression in *Drosophila*, *Curr. Opin. Neurobiol.* 38 (2016) 109–118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.007>.
- [51] H.H. Lin, D.S. Cao, S. Sethi, Z. Zeng, J.S. Chin, T.S. Chakraborty, A.K. Shepherd, C.A. Nguyen, J.Y. Yew, C.Y. Su, J.W. Wang, Hormonal modulation of pheromone detection enhances male courtship success, *Neuron* 90 (2016) 1272–1285, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.004>.
- [52] Z.R. Majeed, E. Abdeljaber, R. Soveland, K. Cornwell, A. Bankemper, F. Koch, R.L. Cooper, Modulatory action by the serotonergic system: behavior and neurophysiology in *Drosophila melanogaster*, *Neural. Plast.* 2016 (2016) 1–23, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7291438>.
- [53] K.M. Lee, I. Daubnerova, R.E. Isaac, C. Zhang, S. Choi, J. Chung, Y.J. Kim, A neuronal pathway that controls sperm ejection and storage in female *Drosophila*, *Curr. Biol.* 25 (2015) 790–797, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.050>.
- [54] K.I. Kimura, C. Sato, M. Koganezawa, D. Yamamoto, *Drosophila* ovipositor extension in mating behavior and egg deposition involves distinct sets of brain interneurons, *PLoS One* 10 (2015) e0126445, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126445>.
- [55] C.L. Wu, T.F. Fu, Y.Y. Chou, S.R. Yeh, A single pair of neurons modulates egg-laying decisions in *Drosophila*, *PLoS One* 10 (2015) e0121335, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121335>.
- [56] K.J. Argue, A.J. Yun, W.S. Neckameyer, Early manipulation of juvenile hormone has sexually dimorphic effects on mature adult behavior in *Drosophila melanogaster*, *Horm. Behav.* 64 (2013) 589–597, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.08.018>.
- [57] W.S. Neckameyer, Multiple roles for dopamine in *Drosophila* development, *Dev. Biol.* 176 (1996) 209–219, <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1996.0128>.
- [58] N.E. Gruntenko, E.K. Karpova, A.A. Alekseev, N.A. Chentsova, E.V. Bogomolova, M. Bownes, I.Y. Rauschenbach, Effects of octopamine on reproduction, juvenile hormone metabolism, dopamine, and 20-hydroxyecdysone contents in *Drosophila*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65 (2007) 85–94, <http://dx.doi.org/10.1002/arch.20187>.
- [59] K. Sasaki, S. Akasaka, R. Mezawa, K. Shimada, K. Maekawa, Regulation of the brain dopaminergic system by juvenile hormone in honey bee males (*Apis mellifera* L.), *Insect Mol. Biol.* 21 (2012) 502–509, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01153.x>.
- [60] I.Y. Rauschenbach, E.K. Karpova, E.V. Burdina, N.V. Adonyeva, R.A. Bykov, Y.Y. Ilinsky, P.N. Menshanov, N.E. Gruntenko, Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females, *Gen. Comp. Endocrinol.* 243 (2017) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.11.004>.
- [61] T. Ameku, R. Niwa, Mating-induced increase in germline stem cells via the neuroendocrine system in female *Drosophila*, *PLoS Genet.* 12 (2016) e1006123, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1006123>.
- [62] F.W. Avila, M.C.B. Qazi, C.D. Rubinstein, M.F. Wolfner, A requirement for the neuromodulators octopamine and tyramine in *Drosophila melanogaster* female sperm storage, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 109 (2012) 4562–4567, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117689109>.
- [63] M.H. Gromko, D.G. Gilbert, R.C. Richmond, Sperm transfer and use in the multiple mating system of *Drosophila*, in: R.L. Smith (Ed.), *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*, Academic Press Inc., Orlando, 1984, pp. 371–426.
- [64] T.G. Wilson, S. De Moor, J. Lei, Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the Methoprene-tolerant 27 mutant phenotype, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33 (2003) 1167–1175, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.06.007>.
- [65] G. Bontou, H.A. Shaik, B. Denis, C. Wicker-Thomas, AcP70A Regulates *Drosophila* pheromones through juvenile hormone induction, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 56 (2015) 36–49, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.11.008>.
- [66] C. Fricke, A. Bretman, T. Chapman, Adult male nutrition and reproductive success in *Drosophila melanogaster*, *Evolution* 62 (2008) 3170–3177, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00515.x>.
- [67] N.N. Moghadam, M. Holmstrup, T. Manenti, M.B. Mouridsen, C. Pertoldi, V. Loeschcke, The role of storage lipids in the relation between fecundity, locomotor activity, and lifespan of *Drosophila melanogaster* longevity-selected and control lines, *PLoS One* 10 (2015) e0130334, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130334>.
- [68] R.N. Remedio, P.H. Nunes, L.A. Anholetto, P.R. Oliveira, I.C.G. Sá, M.I. Camargo-Mathias, Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration, *Micron* 83 (2016) 19–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004>.
- [69] S. Kilani-Morakchi, R. Bezzar-Bendjazia, M. Ferdnache, N. Aribi, Preimaginal exposure to azadirachtin affects food selection and digestive enzymes in adults of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), *Pestic. Biochem. Physiol.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.009> (article in Press, Available online 20 June 2017).
- [70] O. Puig, J. Mattila, Understanding Forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (2011) 635–647, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3407>.
- [71] S. Tine, N. Aribi, N. Soltani, Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blattella orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae): insecticidal activity and reproductive effects, *Afr. J. Biotechnol.* 10 (85) (2011) 19816–19824, <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.24971> <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- [72] A. Maiza, N. Aribi, G. Smaghe, S. Kilani-Morakchi, M. Bendjedid, N. Soltani, Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad and indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*, *Bull. Insectol.* 66 (1) (2013) 11–20.
- [73] S.F. Abd-Elghafar, A.G. Appel, T.P. Mack, Toxicity of several insecticide formulations against adult German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae), *J. Econ. Entomol.* 83 (6) (1990) 2290–2294.
- [74] D. Wang, L. Lü, Y. He, Effects of two conventional insecticides on male-specific sex pheromone discrimination and mate choice in *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Environ. Entomol.* 46 (2) (2017) 328–334, <http://dx.doi.org/10.1093/ee/nvw172>.
- [75] J.M. Toivonen, L. Partridge, Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*, *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (2009) 39–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.07.005>.