



**HAL**  
open science

# Aliments supplémentés en *Moringa oleifera* en Afrique du Sud : Une approche multidisciplinaire combinant études consommateurs et analyses physicochimiques et nutritionnelles

Amel Hedhili

► **To cite this version:**

Amel Hedhili. Aliments supplémentés en *Moringa oleifera* en Afrique du Sud : Une approche multidisciplinaire combinant études consommateurs et analyses physicochimiques et nutritionnelles. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCK009 . tel-03230081

**HAL Id: tel-03230081**

**<https://theses.hal.science/tel-03230081v1>**

Submitted on 19 May 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A :**

**Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation**

**UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA**

**Laboratoire de Biologie Animale Appliquée**

Ecole doctorale n°554

Ecole Doctorale Environnement-Santé

Doctorat de Physiologie

Par

Mme HAMIDA Zahia Cirine

---

**Effet subléta! d'un produit phytosanitaire à faible risque environnemental (Oberon) sur les réponses physiologique et comportementale chez la Drosophile.**

---

Soutenance prévue le 12 juillet 2021 à Annaba (ALGERIE)

**Composition du Jury :**

Mme BAGNERES Anne-Geneviève	Directrice de Recherche, HDR CNRS, Université Montpellier	Rapporteure
M. KELOUCHE Abdallah	Professeur, Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou	Rapporteur
M. BOUDJELIDA Hamid	Professeur, Université Badji Mokhtar – Annaba	Examineur
M. NEIRES Fabrice	Maitre de conférences, HDR, Université de Bourgogne – Dijon	Examineur
M. SOLTANI Noureddine	Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba	Directeur de thèse
M. FERVEUR Jean-Fançois	Directeur de Recherche, HDR, Université de Bourgogne – Dijon	Codirecteur de thèse



**Titre :** Effet subléthal d'un produit phytosanitaire à faible risque environnemental (Oberon) sur les réponses physiologique et comportementale chez la *Drosophile*.

**Mots clés :** *Drosophila melanogaster*, Spiromésifène, Lipides, Acides gras, Hydrocarbures cuticulaires.

**Résumé :** Cette étude vise à examiner les effets d'un produit phytosanitaire largement utilisé contre les ravageurs phytophages, le spiromésifène un inhibiteur de la synthèse des lipides, sur diverses réponses (toxicologique, physiologique et comportementale) chez *Drosophila melanogaster*, Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), un modèle de référence.

Dans un premier temps, une formulation commerciale du spiromésifène (Oberon<sup>R</sup>) a été testée par application topique sur les larves du dernier stade (L3), et les paramètres de létalité (droite de régression, doses sublétales et létales avec leurs intervalles de confiance et Slope) ont été déterminés selon les procédures conventionnelles de toxicologie (Analyse des probit). Les concentrations sublétales déterminées précédemment (CL10 : et CL25 : µg/larve) entraînent une réduction significative du taux de lipides chez les pupes à tous les âges et ceci selon une relation dose-réponse. Le traitement induit une augmentation rapide du taux de malondialdéhyde par rapport aux témoins.

Dans un second temps, cette formulation a été administré par ingestion (et contact) uniquement au cours du développement pré-imaginal chez *D. melanogaster*. Cinq concentrations variant entre 1 et 10 µg/g ont été testées. La molécule manifeste une activité insecticide avec une relation dose-réponse significative. Aux plus fortes concentrations, elle allonge la durée du développement larvaire et pupal, et diminue le poids frais et sec des adultes avec un effet dose-dépendant, ainsi qu'une réduction de la survie des mâles, et ce, comparativement aux témoins.

Le traitement provoque une diminution du poids frais des ovaires, ainsi qu'une réduction de la teneur en glucides, protéines et lipides totaux au cours de la maturation sexuelle. Le spiromésifène affecte aussi la fécondité des femelles en réduisant de manière significative le nombre d'œufs pondus. En outre, il réduit quantitativement le taux des acides gras et des hydrocarbures cuticulaires, à rôle potentiellement phéromonal chez les mâles et les femelles selon la concentration appliquée. Le spiromésifène affecte aussi le comportement d'accouplement de *D. melanogaster* en retardant sa latence et en réduisant sa durée.

En outre, il influence le choix du site d'oviposition des femelles survivantes au traitement. Une préférence claire d'oviposition sur un milieu non traité par rapport à un milieu traité est notée reflétant une aversion à cette molécule. L'exposition pré-imaginale à cet insecticide renforce cette aversion suggérant une mémorabilité de l'aversion à cette molécule.

Enfin, le spiromésifène affecte les choix olfactif et alimentaire des mâles adultes, ceci traduit une modification de l'attraction envers cette molécule. Nos résultats confirment le mécanisme d'action primaire du spiromésifène sur les lipides. Il est probable que les perturbations du métabolisme lipidique soient responsables des altérations du potentiel reproducteur (comportement, phéromones cuticulaires) *via* la vitellogénèse.

**Title :** Sublethal effect of a crop protection product with low environmental risk (Oberon) on physiological and behavioral responses in *Drosophila*.

**Keywords :** *Drosophila melanogaster*, Spiromesifen, Lipids, Fatty acids, Cuticulars hydrocarbons.

**Abstract :** This study aims to examine the effects of spiromesifen, a widely used crop protection product, an inhibitor of lipid synthesis, against phytophagous pests. In our study, we measured, various responses (toxicological, physiological and behavioural) in *Drosophila melanogaster*, Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), a reference model.

First, a commercial formulation of spiromesifen (OberonR) was tested by topical application on late third instar larvae (L3), and lethality parameters (regression line, sublethal and lethal doses with their confidence intervals and Slope) were determined according to conventional toxicology procedures (Probit Analysis). The previously determined sublethal concentrations (LC10: and LC25:  $\mu\text{g}/\text{larve}$ ) resulted in a significant reduction of lipid levels in pupae, at all ages with a dose-response relationship. Treatment induced a rapid increase in MDA levels as compared to controls.

Second, this formulation was administered by ingestion (and contact) only during pre-imaginal development in *D. melanogaster*. Five concentrations ranging from 1 to 10  $\mu\text{g}/\text{g}$  were tested. The molecule showed insecticidal activity with a significant dose-response relationship. At the highest concentrations, it increased the duration of nymphal and pupal development, and decreased the fresh and dry weight of adults with a dose-dependent effect. It also reduced survival of adult males as compared to controls.

The treatment caused a decrease in fresh weight of the ovaries, as well as a reduction in carbohydrate, protein and total lipid content during sexual maturation. Spiromesifen also affects fecundity by significantly reducing the number of eggs laid. In addition, it reduced the levels of fatty acids and cuticular hydrocarbons, some of which having a pheromonal role, in males and females depending on the concentration used.

Spiromesifen also affects the copulatory behavior of *D. melanogaster* by delaying its latency and reducing its duration. In addition, it influences the choice of oviposition site of females surviving to treatment. A clear preference for oviposition on an untreated medium over a treated medium reflecting an aversion to this molecule. Pre-imaginal exposure to this insecticide reinforces this aversion suggesting a memorability of aversion to this molecule.

Finally, spiromesifen affects the olfactory and food choices of adult males, suggesting a modification of the attraction to this molecule. Our results confirm the primary mechanism of action of spiromesifen on lipids. It is likely that disturbances in lipid metabolism are responsible for alterations in reproductive potential (behavior, cuticular pheromones) *via* the vitellogenesis process.



Université Bourgogne Franche-Comté  
06, Boulevard Gabrielle  
21000 Dijon

## Remerciements

Ce travail est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai bénéficié de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes, à qui je tiens à dire profondément et sincèrement merci. Je remercie **ALLAH** tout puissant de m'avoir donné la force et la capacité d'effectuer ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci tout d'abord à Madame **Anne-Geneviève BAGNERES** (DR 1 CNRS à l'Université de Montpellier France) et Monsieur **Abdallah KELLOUCHE** (Professeur à l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Algérie), d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi qu'à Monsieur **Hamid BOUDJELIDA** (Professeur à l'université de Badji Mokhtar, Algérie) et Monsieur **Fabrice NEIERS** (Maitre de conférences HDR à l'université de Bourgogne Franche-Comté, France) d'avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse.

Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à Monsieur le professeur **Noureddine SOLTANI**, Directeur du laboratoire de Biologie Animale Appliquée pour l'excellent encadrement fourni, son soutien, sa disponibilité et sa patience malgré ses nombreuses tâches. Merci d'avoir en toutes occasions pris le temps de m'écouter et de me comprendre. Pour tout cela mais aussi pour votre humanisme, votre bonté et votre gentillesse.

Mes sincères gratitudes et reconnaissances s'adressent également à mon codirecteur de thèse Monsieur **Jean-François FERVEUR** (DR 1 CNRS, Université de Bourgogne Franche Comté pour sa disponibilité, son aide tout au long de ce travail et pour avoir bien voulu m'accueillir au sein de son équipe au Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation. Il a toujours été présent pendant ma thèse pour répondre à mes questions et aiguiller mon travail mais il a aussi su me laisser autonome pour me permettre de développer moi-même mes propres protocoles et réfléchir sur mes expériences.

Ma reconnaissance particulière est adressée à monsieur **Jean-René MARTIN** (DR 1 CNRS Université Paris-Saclay) et à monsieur **Loïc BRIAND** (Directeur du CSGA) pour avoir orienté ce travail grâce à leurs conseils et leurs suggestions durant les comités de suivi de ma thèse.

Un grand merci à Monsieur **Jean-Pierre FARINE**, chargé de recherche à l'université de Bourgogne Franche Comté pour son implication dans le projet, notamment pour le temps

précieux qu'il m'a fait gagner avec les analyses en CPG. J'ai apprécié son enthousiasme et sa sympathie

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe 2 du CSGA qui m'ont aidé à bien m'intégrer parmi eux ce qui m'a permis de travailler dans un bon environnement convivial. Merci pour les bons moments passés ensemble. Merci à **Jean-Philippe, François, Stéphane DUPAS, Julien** et **Claude** pour leur soutien et leurs bonnes humeurs.

Je suis particulièrement reconnaissante à **Jérôme** de m'avoir initié à la CPG et pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci à ma très chère **Isabelle** pour son aide et son soutien au quotidien ; il n'y a pas de mot pour qualifier sa gentillesse et sa bonté, Ce fut un très grand plaisir de partager son bureau pendant mon séjour à Dijon. Merci également à **Stéphane FRAICHARD** pour son soutien, son aide et ses bons conseils. Merci à vous deux pour les moments détentes au Mirande ou autour de crêpe-party.

Un grand merci à mes compagnonnes de thèse, de galère et de vie. Merci les filles pour les moments passés ensemble, nos rigolades au sein du laboratoire et en dehors. Sans vous, ces deux années auraient été bien fades. Merci particulièrement à ma **Karen** de m'avoir montré le chemin, j'ai beaucoup appris à tes cotés. Merci à toi ma **Laurie** pour avoir bien pris soins de mes petites mouches pendant mon absence. Je remercie aussi mes camarades de thèse **Elodie, Adrien, Salomé, Clémentine** pour les pauses café/déjeuner.

Une thèse, bien entendu, c'est un travail de longue haleine. Mais c'est surtout une formidable histoire de relations, de rencontres et d'amitié. Je voulais remercier mes chers amis que j'ai eu l'occasion de rencontrer à Dijon : **Mouhamed, Basma, Meriem, Souheila, Fatima, Ryma**. Et spécialement à **Amel, Fairouz** et **Selma** pour leur présence au quotidien, merci d'être toujours là pour me soutenir. Merci pour nos soirées ensemble, nos conversations, nos faux-rires, nos voyages ainsi que pour vos talents culinaires,

Mes vifs remerciements sont adressés à l'équipe du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (UBMA, Annaba) enseignants, personnel ATS et doctorants. Merci à Madame **Ladjamaa, Zahra, Hayette** et mes amis et collègues doctorants : **Hiba, les deux Asma, Yasmine, Yousra, Jiji, Nesrine, Roumaissa, Rim, Rachid, Said** et la liste est longue...

Merci à mes meilleures amies, **Biba, Randa** et **Marwa**. Je vous aime fort. Merci pour vos soutiens, vos encouragements et les bons moments que nous avons vécus ensemble.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années.

Merci particulièrement à mon très cher papa. Merci pour sa tendresse, ses sacrifices, son amour infini et sa confiance. Merci de m'avoir épaulée au cours de ma vie et de mes études, Merci de croire en moi.

Merci à ma belle-mère pour son soutien tout au long de mon travail merci de m'avoir aidée lorsque j'avais besoin et je lui adresse à travers cette page mon profond respect.

Mon frère **Amine** et ma sœur **Amina**, vous avez toujours eu confiance en moi et m'avez toujours encouragé et poussé à aller plus loin. Merci à vous deux pour votre amour et votre présence je vous aime beaucoup.

Mon petit frère, mon ami éternel, je t'aime beaucoup et je te remercie pour ton grand cœur et tes magnifiques qualités personnelles. Je te souhaite tout le succès du monde.

Un grand merci à **tata Nadia**, **tonton Yacine** et **Ramzi** de m'avoir si bien accueilli dans leur famille, et de m'avoir bien aidé ses derniers mois. Merci pour vos encouragements et votre soutien. Je vous suis profondément reconnaissante pour tout ce qu'avez fait pour moi.

Tous mes remerciements à mon mari bien aimé, sans lequel cette thèse n'aurait jamais vu le jour, pour la rigueur et la qualité de son approche scientifique sur la paillasse et devant la feuille. Merci pour ton amour, ton soutien et tes encouragements.

Enfin je voudrais dédier mon travail de recherche à mon petit rayon de soleil Ilyan qui a pu illuminer ma vie et me redonner espoir, mon fils né cette année 2021.

*« À la mémoire de ma très chère Maman  
C'est grâce à toi et pour toi que j'en suis là ... »*



## SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	1
2. MATERIEL ET METHODES.....	7
2.1. Présentation du matériel biologique.....	7
2.2. Technique d'élevage au laboratoire.....	10
2.3. Présentation de l'insecticide. ....	11
2.4. Traitement et tests de toxicité.....	11
2.5. Mesure des paramètres du développement.....	12
2.5.1. Durée du développement larvaire et nymphal.....	12
2.5.2. Poids et teneur en eau des adultes.....	12
2.5.3. Survie des mâles.....	13
2.6. Extraction et dosages des constituants biochimiques dans le corps.....	13
2.6.1. Dosage des lipides totaux.....	13
2.6.2. Dosage des protéines totales.....	15
2.6.3. Extraction et dosage du malondialdéhyde.....	16
2.6.4. Extraction des acides gras et analyse par chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse.....	17
2.6.5. Extraction des hydrocarbures cuticulaires et analyse par chromatographie en phase gazeuse.....	18
2.7. Extraction et dosage des constituants biochimiques des ovaires.....	18
2.7.1. Dissection et prélèvement des ovaires.....	18
2.7.2. Extraction des constituants.....	19
2.7.3. Dosage des lipides ovariens.....	19
2.7.4. Dosage des glucides ovariens.....	20
2.7.5. Dosage des protéines ovariennes.....	20
2.8. Tests de comportement.....	21
2.8.1. Comportement de préférence olfactive.....	21
2.8.2. Préférence alimentaire (test multiCAFE) .....	22
2.8.3. Comportement sexuel et progéniture.....	23
2.8.4. Préférence d'oviposition.....	25
2.9. Analyses statistiques.....	25

3. RESULTATS.....	27
3.1. Toxicité du spiromésifène à l'égard de <i>D. melanogaster</i> .....	27
3.1.1 Toxicité du spiromésifène par application topique chez les larves.....	27
3.1.2. Toxicité du spiromésifène administré par ingestion/contact au cours des stades immatures.....	29
3.2. Effets du spiromésifène sur le développement.....	31
3.2.1. Effets sur la durée de développement larvaire et pupal.....	31
3.2.2. Effets sur le poids corporel et la teneur en eau des adultes.....	32
3.2.3 Effets sur la survie des mâles.....	35
3.3. Effets du spiromésifène sur les lipides corporels.....	36
3.3.1. Effets sur le taux de lipides totaux corporels.....	36
3.3.2. Effets sur le taux de malondialdéhyde.....	38
3.3.3. Effet sur les acides gras corporels.....	39
3.3.4. Effets sur les hydrocarbures cuticulaires.....	43
3.4. Effet sur le poids et la composition biochimique des ovaires.....	47
3.4.1. Effets sur le poids des ovaires.....	47
3.4.2. Effets sur le taux des lipides ovariens.....	48
3.4.3. Effets sur le taux des glucides ovariens.....	50
3.4.4. Effets sur le taux des protéines ovariennes.....	52
3.5. Effets du spiromésifène sur le comportement.....	54
3.5.1. Effets sur la préférence olfactive.....	54
3.5.2. Effets sur la préférence alimentaire.....	56
3.5.3. Effets sur le comportement sexuel et progéniture.....	57
3.5.3.1 Effet sur le potentiel reproducteur.....	57
3.5.3.2 Effet sur la latence et la durée d'accouplement.....	58
3.5.3.3 Effet sur la fécondité.....	59
3.5.4. Effets sur la fécondité et la préférence du site d'oviposition.....	60
4. Discussion.....	64
4.1. Toxicité du spiromésifène à l'égard de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	65
4.2. Effet du spiromésifène sur le développement.....	66
4.3. Effet du spiromésifène sur la reproduction.....	69
4.4. Effet sur les lipides corporels.....	73
4.4.1. Effet du spiromésifène administré par application topique sur les lipides totaux corporels et le malondialdéhyde.....	73

4.4.2. Effet du spiromésifène administré par ingestion sur le taux d'acides gras et le profil des hydrocarbures cuticulaires.....	75
4.5. Effet sur le comportement.....	76
4.5.1. Effet sur la préférence olfactive et alimentaire.....	77
4.5.2. Effet sur le comportement sexuel et l'oviposition.....	79
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	82
RESUMES.....	85
Français.....	85
Anglais.....	87
Arabe.....	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	90
ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE (publications et communications)	

**LISTES DES  
TABLEAUX ET  
FIGURES**

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Réalisation de la gamme d'étalonnage des lipides..	14
2	Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines	16
3	Dosage des lipides ovariens : réalisation de la gamme d'étalonnage.	19
4	Dosage des glucides dans les ovaires de <i>D. melanogaster</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	20
5	Dosage des protéines dans le corps entier de la puppe de <i>D. melanogaster</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	21
6	Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) administré <i>in vivo</i> par application topique sur les Larves L3 de <i>D. melanogaster</i> , sur le taux de mortalité observée ( $m \pm \text{SEM}$ , $n= 3$ répétitions comportant chacune 30 individus).	27
7	Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) administré <i>in vivo</i> par application topique sur les larves L3 de <i>D. melanogaster</i> , sur le taux de mortalité corrigée ( $m \pm \text{SEM}$ , $n = 3$ répétitions comportant chacune 30 individus).	27
8	Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) administré <i>in vivo</i> par application topique sur des larves L3 de <i>D. melanogaster</i> . Transformation angulaire du taux de mortalité corrigée ( $m \pm \text{SEM}$ , $n = 3$ répétitions comportant chacune 30 individus).	28
9	Toxicité du spiromésifène administré <i>in vivo</i> par application topique sur les larves L3 de <i>D. melanogaster</i> : détermination des concentrations létales (CL $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) avec leur intervalle de confiance (IC).	28
10	Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) administré par ingestion/contact au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur le taux de mortalité observée ( $m \pm \text{SEM}$ , $n= 3$ répétitions comportant chacune 500 œufs).	29
11	Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) administré par ingestion/contact au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur le taux de mortalité corrigée ( $m \pm \text{SEM}$ , $n= 3$ répétitions comportant chacune 500 œufs).	30

<b>12</b>	Toxicité du spiromésifène administré <i>in vivo</i> par ingestion au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> : détermination des concentrations létales (CL $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) avec leur intervalle de confiance (IC).	31
<b>13</b>	Taux de lipides totaux corporels ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au cours du développement nymphal de <i>D. melanogaster</i> après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm \text{SEM}$ ; n= 5 répétitions chacune correspondant à un groupe de 4 pupes).	37
<b>14</b>	Taux de MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les pupes de <i>D. melanogaster</i> après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm \text{SEM}$ ; n= 5 répétitions chacune correspondant à un groupe de 4 pupes).	38
<b>15</b>	Effets du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal sur les acides gras des femelles <i>D. melanogaster</i> ( $m \pm \text{SEM}$ , n = 10 répétitions; Total AGs = Total des acides gras ; AGS = acide gras saturé ; AGIS = acide gras insaturé).	40
<b>16</b>	Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal sur les acides gras des mâles <i>D. melanogaster</i> ( $m \pm \text{SEM}$ , n = 10 répétitions; Total AGs = Total des acides gras ; AGS = acide gras saturé ; AGIS = acide gras insaturé).	41
<b>17</b>	Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations, au stade pré-imaginal de <i>D.melanogaster</i> , sur les hydrocarbures cuticulaires des femelles ( $\text{moyenne} \pm \text{SEM}$ ; n = 15 répétitions; ng/femelles).	44
<b>18</b>	Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations, au stade pré-imaginal de <i>D.melanogaster</i> , sur les hydrocarbures cuticulaires des mâles ( $m \pm \text{SEM}$ ; n = 15 répétitions; ng/mâles).	45
<b>19</b>	Effet du spiromésifène, administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur le poids des ovaires ( $m \pm \text{SEM}$ ; n = 5 répétitions chacune comportant 4 paires d'ovaires).	47

20	Effet du spiromésifène, administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur le taux des lipides ovariens ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions chacune comportant 4 paires d'ovaires).	49
21	Effet du spiromésifène, administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur le taux des glucides ovariens ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions chacune comportant 4 paires d'ovaires).	51
22	Effet du spiromésifène, administré par ingestion/contact à différentes concentrations au stade pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur le taux des protéines ovariens ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions chacune comportant 4 paires d'ovaires).	53

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Dimorphisme sexuel chez <i>D. melanogaster</i> : vue latérale du corps mâle et femelle (A) ; vue dorsale ; (B) vue ventrale ; (C) vue des pattes (Source: FlyMove, <a href="http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/GeneFliespage.html">http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/GeneFliespage.html</a> ).	8
2	Cycle de développement de <i>D. melanogaster</i> . La durée d'une génération est d'environ 10 jours à 25°C, avec environ 1 jour pour l'embryogenèse, 1 jour pour le premier stade larvaire, 1 jour pour le second stade larvaire, 3 jours pour le troisième stade larvaire et 5 jours pour le stade pupal  (Source: FlyMove, <a href="http://flymove.unimuenster.de/Genetics/Flies/GeneFliespage.html">http://flymove.unimuenster.de/Genetics/Flies/GeneFliespage.html</a> ).	10
3	Formule de structure du spiromésifène (European Food Safety Authority, 2012)	11
4	Procédure expérimentale pour l'évaluation de la survie des adultes de <i>D. melanogaster</i>	13
5	Extraction des protéines et lipides totaux selon Shibko <i>et al.</i> , (1966).	15
6	Représentation schématique de l'olfactomètre Y utilisé pour évaluer la préférence olfactive entre le milieu contenant du Spiromésifène (allant de 1 µg/g à 7,5 µg/g) ou le milieu témoin vierge.	22
7	Représentation schématique du test multiCAFE utilisé pour évaluer la préférence de consommation entre une solution de contrôle sans spiromésifène (T) et une solution qui contient du spiromésifène (1µg/µl ou 5µg/µl).	23
8	Dispositif utilisé pendant les tests de comportement sexuel	24
9	Procédure expérimentale pour l'évaluation de la préférence d'oviposition en condition de choix ou de non choix.	25
10	Toxicité du spiromésifène (µg/µl) en application topique sur des larves L3 de <i>D. melanogaster</i> .	28
11	Mortalité corrigée (%) des adultes après administration du spiromésifène et classement des doses testées par le test HSD de Tukey. Les lettres différentes indiquent la présence d'une différence significative entre les concentrations.	30
12	Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme de la concentration du spiromésifène (µg/g).	30



13	Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> sur la durée de développement (h) des stades larvaire (A) et pupal (B) ( $m \pm SEM$ , $n = 94 - 485$ ). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes $p > 0,05$ .	32
14	Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> sur le poids frais des adultes femelle (A) et mâle (B), (5 jours après l'émergence) ( $n = 10$ répétitions de 10 adultes). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes $p > 0,05$ .	33
15	Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> sur le poids secs des adultes femelle (A) et mâle (B), (5 jours après l'émergence) ( $n = 10$ répétitions de 10 adultes). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes $p > 0,05$ .	34
16	Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> sur la teneur en eau des adultes femelle (A) et mâle (B), (5 jours après l'émergence) ( $n = 10$ répétitions de 10 adultes). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes $p > 0,05$ .	35
17	Effets du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> sur la survie des mâles adultes ( $n = 100$ ).	36
18	Evolution du taux de lipides totaux corporels ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au cours du développement nymphal de <i>D. melanogaster</i> après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions de 4 pupes chacune); pour un même âge, les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes à $p > 0,05$ .	37
19	Effet du spiromésifène sur le taux de MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) au cours du développement nymphal de <i>D. melanogaster</i> après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions de 4 pupes chacune); pour un même âge, les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes à $p > 0,05$ .	39

20	Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact, à différentes concentrations au stade pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur la quantité d'acides gras chez les adultes femelles (A) et mâles (B) ( $m \pm SEM$ ; $n = 10$ répétitions; Total AGs = Total des acides gras ; AGS = acide gras saturé ; AGIS = acide gras insaturé). Pour un même acide gras, les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives à $p < 0,05$ .	42
21	Effet du spiromésifène administré par ingestion, à différentes concentrations, au stade pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i> , sur la quantité d'hydrocarbures cuticulaires chez les femelles (A) et les mâles (B) ( $m \pm SEM$ ; $n = 15$ répétitions). Pour un même groupe d'hydrocarbures cuticulaires, les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives à $p < 0,05$ .	46
22	Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i> , sur le poids des ovaires ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires ; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à $p > 0,05$ ).	48
23	Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i> , sur les lipides ovariens ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires ; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à $p > 0,05$ ).	50
24	Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i> , sur les glucides ovariens ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires ; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à $p > 0,05$ ).	52
25	Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i> , sur les protéines ovariennes ( $m \pm SEM$ ; $n = 5$ répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires ; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à $p > 0,05$ ).	54

26	<p>Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal sur la préférence olfactive des mâles de <i>D. melanogaster</i>. <b>A</b> : Milieu témoin vs Milieu avec 1 µg/g de spiromésifène ; <b>B</b> : Milieu témoin vs milieu avec 5 µg/g de spiromésifène; <b>C</b> : Milieu témoin vs milieu avec 7,5 µg/g de spiromésifène (m ± SEM ; n = 50 mâles ; pour un même milieu les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ; tandis que pour un même traitement, les différences significatives sont les suivantes : * p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01 ; *** p ≤ 0,001). 15 adultes ; pour un même milieu les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à p &gt; 0,05).</p>	55
27	<p>Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i>, sur la préférence alimentaire <b>A</b> : Solution 1 µg/g, <b>B</b> : 5 µg/g (m ± SEM ; n = 15 adultes ; pour un même milieu les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à p &gt; 0,05).</p>	56
28	<p>Effet du spiromésifène, administré par ingestion/contact à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i>, sur la fréquence d'accouplement (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; n = 30 répétitions ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à des expositions à 1 µg / g, 2,5 µg / g, 5 µg / g, 7,5 µg / g, 10 µg / g), les barres ornées de lettres différentes indiquent des différences significatives à p &lt; 0,05.</p>	57
29	<p>Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i>, sur la latence d'accouplement (moyennes ± SEM ; n = 30 répétitions ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à des expositions à 1 µg / g, 2,5 µg / g, 5 µg / g, 7,5 µg / g, 10 µg / g d'insecticide), les barres ornées de lettres différentes indiquent des différences significatives à p &lt; 0,05.</p>	58
30	<p>Effet du spiromésifène , administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i>, sur la durée d'accouplement (moyennes ± SEM ; n = 30 répétitions ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à des expositions à 1 µg / g, 2,5 µg / g, 5 µg / g, 7,5 µg / g, 10 µg / g d'insecticide), les barres ornées de lettres différentes indiquent des différences significatives à p &lt; 0,05.</p>	59

31	<p>Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal de <i>D. melanogaster</i>, sur le nombre de descendants (n = 30 couples ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à 1 µg / g, 2,5 µg / g, 5 µg / g, 7,5 µg / g, 10 µg / g), Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes <math>p &gt; 0,05</math>.</p>	60
32	<p>Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez <i>D. melanogaster</i>, sur le nombre d'œufs pondus en condition de non choix du milieu de ponte (<math>m \pm SEM</math> ; n = 15-20 femelles ; pour un même milieu les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à <math>p &gt; 0,05</math>).</p>	62
33	<p>Indice de préférence d'oviposition (IPO) des femelles <i>D. melanogaster</i> en condition de choix du milieu de ponte. <b>A</b> : Milieu témoin vs milieu avec 1 µg/g de spiromésifène, <b>B</b> : Milieu témoin vs milieu avec 5 µg/g de spiromésifène, <b>C</b> : Milieu avec 1 µg/g vs milieu avec 5 µg/g de spiromésifène. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (<math>p &gt; 0,05</math>). Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et ceux traités pour un même milieu.</p>	63

**LISTES**

**DES**

**ABREVIATIONS**

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AG : Acides Gras

Total AGs : Total des acides gras

AGS : acide gras saturé

AGIS : acide gras insaturé

ANOVA : Analyse de la variance

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BBC : Bleu brillant de coomassie

BSA : Albumine de sérum de bœuf

CS : Canton S

CL : concentration létale

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DO : Densité optique

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

FAO : Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture

HC : Hydrocarbures Cuticulaires

IP : Indice de préférence

IPO : Indice de Préférence d'Oviposition

IRAC : Insecticide Resistance Action Committee

ONU : Organisation des Nations Unies

UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes

U.S. EPA : Agence de la Protection de l'Environnement des Etats Unis

MDA : Malondialdéhyde

PCR : Réaction par chaîne de polymérase

RT-qPCR : Quantitative reverse transcription PCR

SEM : Erreur standard de la moyenne

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloroacétique

V : Volume

V<sub>s</sub> : Volume du surnageant utilisé

V<sub>t</sub> : Volume total de la cuve

X : Taux du MDA

### **Abréviation des acides gras**

C12:0 : Laurique

C14:0 : Myristique

C16:0 : Palmitique

C18:0 : Stearique

C14:1n5 : Myristoleique

C16:1n-7 : Palmitoleique

C18:1n9 : Oleique

C18:2n-6 : Linoleique

C18:3n-3 :  $\alpha$  linolenique

### **Abréviation des hydrocarbures cuticulaires**

n-C21 : n-Heneicosane

cVA : (Z)-11-Vaccenyl Acetate

7-D : (Z)-7-Docosene

n-C22 : n-Docosane

23-Br : 2-Methyldocosane

9-T : (Z)-9-Tricosene

7-T : (Z)-7-Tricosene

5-T : (Z)-5-Tricosene

n-C23 : n-Tricosane

25-Br : 2-Methyltetracosane

9-P : (Z)-9-Pentacosene

7-P : (Z)-7-Pentacosene

5-P : (Z)-5-Pentacosene

n-C25 : n-Pentacosane

27-Br : 2-Methylhexacosane

7-H : (Z)-7-Heptacosene

n-C27 : n-Heptacosane

29-Br : 2-Methyloctacosane

n-C29 : n-Nonacosane

31-Br : 2-Methyltriacontane

7,11-TD : (Z,Z)-7,11-Tricosadiene

n-C24 : n-Tetracosane

9,13-PD : (Z,Z)-9,13-Pentacosadiene

7,11-PD : (Z,Z)-7,11-Pentacosadiene

5,9-PD : (Z,Z)-9,5-Pentacosadiene

9,13-HD : (Z,Z)-9,13-Heptacosadiene

7,11-HD : (Z,Z)-7,11-Heptacosadiene

9-H : (Z)-9-Heptacosene

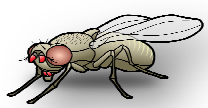
28-Br : 2-Methylheptacosane

9,13-ND : (Z,Z)-9,13-Nonacosadiene

7,11-ND : (Z,Z)-7,11-Nonacosadiene



# **INTRODUCTION**

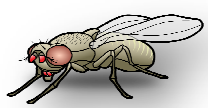


## 1. INTRODUCTION

Après la seconde guerre mondiale, les pesticides ont permis le développement de l'agriculture et ont contribué à l'augmentation des rendements et à la régulation de la production agricole. En effet, ce domaine doit faire face à une demande croissante pour l'alimentation, car selon l'ONU (Organisation Des Nations Unies), la population mondiale en 2030 dépassera 8 milliards de personnes et en 2050, plus de 9 milliards, ce qui contraste avec la disponibilité de nouvelles terres agricoles dans le monde (United Nations, 2017). En absence de ces produits, on estime que 30 à 40% des récoltes seraient détruites par les maladies, les insectes ravageurs etc..., à travers le monde (rapport d'activité UIPP ; Union des Industries de la Protection des Plante 2011/2012). L'utilisation des produits phytosanitaires a également limité ou éradiqué un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières (Pimentel, 2005 ; Saguez *et al.*, 2007 ; Bolzonella *et al.*, 2019).

Néanmoins, aujourd'hui, les pesticides sont fortement soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement (Huang *et al.*, 2020 ; Schreinemachers *et al.*, 2020). Historiquement, c'est à l'américaine Rachel Carson que l'on doit la première dénonciation des effets des pesticides sur l'environnement et la santé. C'est son ouvrage intitulé «le printemps silencieux», en 1963, qui a entraîné l'interdiction du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) aux Etats-Unis en 1972. De nombreux écrits ont, depuis, vu le jour.

Ces dernières décennies, la très large utilisation de pesticides, et leur présence ubiquiste, conduisent à retrouver de faibles quantités de ces produits dans les différents compartiments environnementaux et dans les denrées alimentaires (Carvalho, 2017). En effet moins de 1% des pesticides utilisés pour la lutte antiparasitaire atteignent finalement les ravageurs cibles, tandis que la quantité restante pénètre dans le sol, l'eau et l'air, causant une pollution environnementale rémanente (Harsimran et Garg, 2014 ; Meghdadi et Mirza Mohammad, 2017 ; Singh *et al.*, 2020), Les pesticides sont ainsi à l'origine de contamination de populations humaines et ils suscitent de nombreuses inquiétudes quant à leurs effets sur la

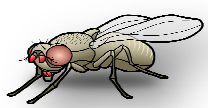


santé (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016 ; Vrijheid *et al.*, 2016 ; Zlatnik, 2016 ; Ye *et al.*, 2017). Révélés toxiques ou cancérigènes pour l'homme, bon nombre de pesticides ont été interdits. Malgré cela, certains se retrouvent encore actuellement dans l'environnement de nombreuses années après leur interdiction (DDT, dieldrine, chlordécone, triazine) (Band *et al.*, 2011 ; Hellou *et al.*, 2013). En outre, on signale la perte massive de biodiversité liée à l'usage des insecticides à large spectre (Altieri et Nicholls, 2004 ; Bianchi *et al.*, 2006 ; Hallmann *et al.*, 2017), ainsi que l'impact sur les organismes auxiliaires (Stark et Banks, 2003 ; Desneux *et al.*, 2007). L'usage intensif de ces produits provoque également le développement de formes résistantes de ravageurs vis à vis de différents types d'insecticides limitant ainsi leur efficacité (Yang *et al.*, 2009 ; Toma *et al.*, 2011 ; Carvalho *et al.*, 2013 ; Harrop *et al.*, 2014 ; Sparks et Nauen, 2015).

Dans les pays dits « sous-développés », même les produits très toxiques, dont l'usage a été interdit dans les pays industrialisés, sont encore largement utilisés, et avec beaucoup moins de précautions. Selon un communiqué de presse de l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2001), environ 30% des pesticides commercialisés dans les pays en voie de développement ne sont pas conformes aux standards de qualité internationaux.

Face à cette situation, les enjeux pour la recherche sont considérables; cependant, l'industrie phytosanitaire a développé des molécules plus sélectives; ces molécules présentent des profils de sécurité humaine et environnementale améliorée (Guedes *et al.*, 2016) dégradables et moins toxiques pour les organismes non visés (Kostyukovsky *et al.*, 2000) ou encore, plus spécifiques ciblant les paramètres biologiques, physiologiques et biochimiques des organismes vivants, tant à l'échelle du simple individu que des écosystèmes entiers. Ces alternatives permettront un fonctionnement équilibré et durable des agro-écosystèmes (Ramade, 2011).

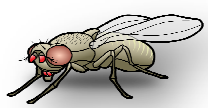
Des molécules synthétiques de moindre impact environnemental, alternative aux pesticides conventionnels, ont pu être développées puis commercialisées par des firmes phytosanitaires. En 2002, la société Bayer CropScience a introduit le spiroadiclofène, un dérivé de l'acide tétronique est le premier cétoénol cyclique, un acaricide à large spectre avec un nouveau mode d'action, l'inhibition de l'acétyl CoA carboxylase. Peu de temps après, le spiromésifène a été introduit, également un dérivé de l'acide tétronique, un acaricide et un insecticide destiné à lutter contre les acariens phytophages et les aleurodes. Le spirotétramate, un dérivé d'acide tétramique, est le troisième membre du groupe des cétoénols ; il a été



récemment commercialisé comme insecticide efficace contre les aleurodes, les pucerons des feuilles et d'autres homoptères nuisibles.

Le spiromésifène est un insecticide/acaricide systémique appartenant au groupe chimique des dérivés de l'acide tétronique également connu sous le nom de kétoénols (Nauen et Konanz, 2005). Ce composé, introduit dans plusieurs pays au cours des dernières années, devient un produit clé pour le contrôle des aleurodes et des acariens. Il est également devenu un élément important du programme de gestion de la résistance (Ishaaya et Horowitz, 2007) en raison à la fois de son action sélective sur la synthèse des lipides (Zhao *et al.*, 2009 ; Bensafi-Gheraibia *et al.*, 2013 ; Abdel-Fatah *et al.*, 2019 ; Kissoum *et al.*, 2020) et de sa faible toxicité contre les organismes non ciblés (Planes *et al.*, 2013 ; Bouabida *et al.*, 2017a ; Cherif *et al.*, 2018). En Algérie, il est actuellement homologué pour une utilisation sur les plantes ornementales, légumières et fruitières cultivées sous serres et en plein champ. L'activité biologique des acides tétroniques est en corrélation avec l'inhibition de la lipogenèse, en particulier les triglycérides et les acides gras (AG) libres (Varghese et Mathew, 2013). Il est répertorié dans le «groupe 23» comme inhibiteurs de l'acétyl CoA carboxylase dans la classification de l'Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). Cette enzyme catalyse la carboxylation de l'acétyl CoA en malonyl CoA, qui est l'une des premières étapes de la biosynthèse des AGs.

Précédemment, il a été reporté que le spiromésifène manifeste une activité insecticide à l'égard des pupes de *Drosophila melanogaster* et réduit le taux de lipides totaux corporels. Il a également été démontré qu'il augmente le taux de malondialdéhyde (MDA), un biomarqueur de la peroxydation lipidique après un traitement topique chez *D. melanogaster* (Bensafi-Gheraibia *et al.*, 2013) et lorsqu'il est ajouté à l'eau d'élevage chez *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae) (Bouabida *et al.*, 2017b). Abdel-Fatah *et al.* (2019) ont constaté que le spirotétramate et le spiromésifène affectent qualitativement et quantitativement les AGs chez *Spodoptera littoralis*. Chez les pupes de *D. melanogaster*, il a été démontré que ce composé a réduit les quantités de glucides totaux et de glycogène et augmenté l'activité du lactate déshydrogénase (Kissoum *et al.*, 2016). Plus récemment, il a également été rapporté qu'il affectait la fécondité et la viabilité des œufs chez les mouches résultant de pupes traitées (Kissoum *et al.*, 2020) ; une telle réduction de la capacité de reproduction suggère que le spiromésifène affecte le processus de vitellogenèse via l'inhibition des précurseurs lipidiques et le comportement sexuel peut-être via la synthèse des phéromones cuticulaires. Bensafi-Gheraibia *et al.* (2020) ont noté une perturbation du profil

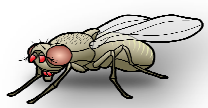


électrophorétique des protéines ovariennes et une diminution de la quantité de certains HCs chez les adultes de *D. melanogaster* après traitement par application topique des pupes.

Les lipides sont des molécules de stockage primaires impliquées dans plusieurs fonctions vitales, allant du stockage d'énergie à la biosynthèse d'hormones en passant par la signalisation cellulaire ou la composition des membranes cellulaires (Flaven-Pouchon *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2018 ; Kraus *et al.*, 2019 ; Toprak, 2020). En outre, les phéromones sexuelles, parmi lesquelles se trouvent les hydrocarbures cuticulaires (HCs), ainsi que diverses sécrétions défensives contiennent ou sont synthétisés à partir des lipides (Klowden, 2007). Les HCs, principaux composés de la fine couche de lipides couvrant la cuticule, protègent les insectes contre la dessiccation et jouent de multiples rôles dans la communication chimique, y compris l'agrégation, la reconnaissance du partenaire et la signalisation de l'état de reproduction (Ferveur, 2005 ; Ferveur *et al.*, 2018 ; Snellings *et al.*, 2018 ; Feyereisen, 2020). Ces molécules dérivent des AGs et leur biosynthèse a été particulièrement étudiée chez *D. melanogaster*, un insecte modèle clé. Chez cette mouche, les HCs présentent des profils sexuellement dimorphes (Jallon, 1984 ; Jallon et Wicker-Thomas, 2003).

Dans la nature, les insectes comme les Drosophiles sont confrontés à une exposition aux insecticides. Bien que les insecticides soient généralement appliqués à des concentrations qui entraînent une mort rapide des espèces nuisibles, les résidus se dégradent avec le temps sur les plantes, les animaux, l'eau et les sols, entraînant des expositions sublétales (Desneux *et al.*, 2005 ; Badji *et al.*, 2007). En outre, les espèces non ciblées, y compris les espèces d'Arthropodes, peuvent être exposées à des concentrations sublétales de pesticides pendant de longues périodes, ce qui entraîne des conséquences imprévisibles telles que les épidémies de ravageurs (Cordeiro *et al.*, 2013 ; Haddi *et al.*, 2015).

L'exposition à des concentrations sublétales d'insecticides a été associée à une modification de la physiologie, du comportement et, en fin de compte, de l'aptitude de la population d'insectes utiles pour les activités humaines (Henry *et al.*, 2012 ; Rundlöf *et al.*, 2015 ; Mitchell *et al.*, 2017). Des essais expérimentaux approfondis sur l'exposition aux insecticides à des doses sublétales ont été réalisés pour de multiples traits comportementaux (Guedes *et al.*, 2016), en particulier l'altération de l'apprentissage olfactif et de la mémoire chez les abeilles (Siviter *et al.*, 2018). L'accent a également été mis sur l'activité en raison de

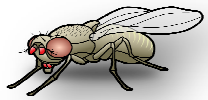


l'importance de la prédation (Tooming *et al.*, 2017) et de la recherche de nourriture (Schneider *et al.*, 2012 ; Lämsä *et al.*, 2018) .

Le stade larvaire de l'insecte correspond au moment où l'individu ingurgite continuellement de grosses quantités de nourriture (de l'œuf à la larve de 3<sup>ème</sup> stade, il y a un accroissement de la masse d'environ 200x) ; C'est donc la larve qui est la plus susceptible d'être fortement exposée aux pesticides et sa capacité de fuite est limitée. Le stade adulte correspond au stade de reproduction avec une mobilité accrue et donc une capacité de fuite (Chareonviriyaphap *et al.*, 2013 ; Cordeiro *et al.*, 2013 ; Nansen *et al.*, 2016). Ces deux stades montrent des aspects physiologiques distincts permettant de compléter des fonctions différenciées ; l'effet de l'exposition aux insecticides peut donc varier considérablement d'un stade à l'autre de la vie de l'insecte (Liu *et al.*, 2013 ; Zhu *et al.*, 2002). Des études récentes ont révélé que l'exposition des larves à des concentrations subléthales d'insecticides peut en outre entraîner des déclin et des altérations des comportements sociaux chez les adultes de différentes espèces d'insectes non ciblées (Fourrier *et al.*, 2015 ; Tüzün et Stoks, 2017 ; Whitehorn *et al.*, 2018). De tels effets de transfert se produisent non seulement lors de la métamorphose, mais aussi la génération suivante peut être affectée négativement, bien qu'elle ne soit plus directement exposée aux insecticides (Costa *et al.*, 2014 ; Ceuppens *et al.*, 2015 ; Müller *et al.*, 2017).

Les larves, comme les adultes, sont capable de diverses formes d'apprentissage passant d'une simple habitude aux apprentissages associatifs divers (Gerber et Stocker, 2007 ; Gerber *et al.*, 2009). L'impact de l'alimentation sur diverses formes d'apprentissage est de plus en plus étudié, chez les larves comme chez les adultes (Dethier, 1980 ; Russell *et al.*, 2013). Ainsi, de nombreuses études ont démontré que ce type de décision peut être influencé par l'expérience sensorielle individuelle et modifiée en fonction d'une expérience larvaire ou adulte (Desneux *et al.*, 2007 ; Dukas, 2008 ; Tricoire-Leignel *et al.*, 2012).

Les connaissances acquises en physiologie, endocrinologie et génétique depuis plus d'un siècle chez *D. melanogaster* représentent une base fondamentale qualitativement appréciable pour une meilleure compréhension des effets et mécanismes d'action des pesticides. 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.



La présente étude vise à évaluer l'effet du spiromésifène comme produit alternatif aux pesticides conventionnels dans la gestion de la résistance. Nous avons émis l'hypothèse que l'interférence du produit testé sur la biosynthèse des lipides pourrait affecter à la fois la quantité d'AGs et les profils des HCs et par conséquent le comportement sexuel. En particulier, nous déterminons ses effets sur les lipides mais aussi sur les HCs ; ces derniers étant parmi les principaux composants biochimiques impliqués dans la communication chimique et la reproduction. Nous avons aussi émis l'hypothèse qu'une exposition précoce (pendant la vie pré-imaginale) pourrait avoir des conséquences sur les mécanismes de reconnaissance des molécules présentes dans l'environnement et détectées soit par olfaction (à distance) ou par gustation (contact).

Les principaux objectifs de notre étude sont :

1. Evaluer la toxicité d'une formulation commerciale du spiromésifène (Oberon) administré par application topique, sur des larves du troisième stade larvaire (L3) de *D. melanogaster*. mais aussi par ingestion/contact au cours du développement pré-imaginal.
2. Tester les effets de deux concentrations sublétales (CL10 et CL25) obtenues par application topique sur l'évolution du taux des lipides corporels chez les pupes et du malondialdéhyde (MDA), un biomarqueur de la peroxydation lipidique.
3. Envisager l'effet de l'exposition pré-imaginale de cette molécule sur le développement larvaire et pupal, le poids corporel des adultes et leur survie.
4. Evaluer l'impact du spiromésifène, administré par ingestion, sur le taux des acides gras et des hydrocarbures cuticulaires.
5. Comparer les réponses comportementales entre individus adultes exposés ou non au cours de leur développement pré-imaginal au spiromésifène (Préférence alimentaire, olfaction, comportement sexuel, choix de ponte).
6. Examiner l'effet différé du spiromésifène, administré par ingestion/contact, sur l'évolution du poids et des principaux constituants biochimiques des ovaires (glucides, protéines et lipides totaux) au cours de la maturation sexuelle des femelles survivants au traitement.

**MATERIEL**

**ET**

**METHODES**





## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Présentation du matériel biologique

Les études menées dans mon projet de thèse ont été réalisées sur l'espèce *Drosophila melanogaster*, appartenant à la lignée Canton S. *Drosophila melanogaster* (du Grec *droso* : la rosée et *philos* : qui aime), est un insecte diptère, élevé depuis le début du vingtième siècle à la suite des travaux pionniers de Thomas Hunt Morgan (1830). Il en établit la première cartographie génétique ce qui lui valut le prix Nobel en 1933. La drosophile est rapidement devenue un organisme modèle sur lequel travaillent aujourd'hui plusieurs dizaines de milliers de chercheurs en génétique et en biologie du développement (Gilbert *et al.*, 2013) mais également en neurogénétique de l'apprentissage (Dukas, 2008), de nombreux scientifiques l'utilisent aussi comme modèle pour certaines maladies humaines, comme la maladie de Parkinson ou celle de Huntington (Whitworth, 2011).

*D. melanogaster* (Meigen, 1830) est connue sous le nom de « mouche de vinaigre » pour son attirance envers les produits fermentés (McKenzie, 1974 ; McKenzie et McKechnie, 1979 ; Hoffmann et Parsons, 1991). C'est un insecte Diptère Brachycère hygrophile et holométabole à métamorphose complète. Ces mouches, sont de couleur jaune brunâtre et pèsent environ 0,5 mg et mesurent 3 à 4 mm de long, ailes incluses (Gilbert, 1996 ; Slack, 2004). *D. melanogaster* est caractérisée par une reproduction très rapide (Griffiths *et al.*, 2002) cet insecte élevé au laboratoire, se reproduit toute l'année, sans interruption, avec une nouvelle génération tous les 10 jours à une température de 25°C donnant ainsi plus de 20 générations par an (Ashburner et Thompson, 1978).

Les Drosophiles présentent un dimorphisme sexuel (Fig. 1). Pour différencier les mâles et les femelles, plusieurs caractères peuvent être considérés.

**a. Taille :** Les femelles sont généralement plus grandes que les mâles.

- Femelles : 4 mm
- Mâles : 3 mm



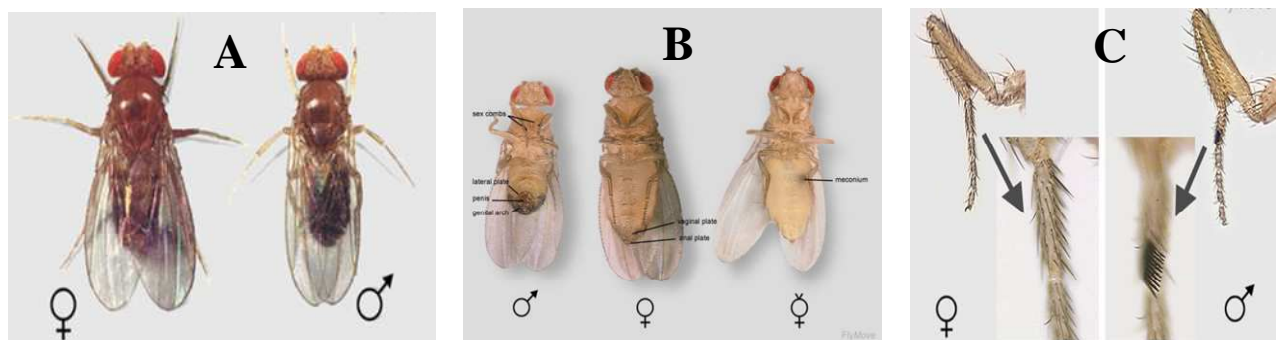
**b. Abdomen :** L'abdomen de la femelle est de forme pointue, avec des segments terminaux de couleur claire et bien distincts. L'abdomen du mâle est plus arrondi, avec des segments terminaux où leur pigmentation est fusionnée.

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

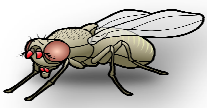
**d. Peignes sexuels**

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

Les femelles sont sexuellement matures et s'accouplent environ 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 un jour plus tard (Tavernier et Lizeaux, 2002).



**Figure 1.** Dimorphisme sexuel chez *D. melanogaster* : vue latérale du corps mâle et femelle (A) ; vue dorsale ; (B) vue ventrale ; (C) vue des pattes (Source : FlyMove, <http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/GeneFliespage.html>).



La classification systématique de *D. melanogaster* est la suivante :

Règne Animalia  
Embranchement Arthropoda  
Sous- Embranchement Hexapoda  
Classe Insecta  
Sous-Classe Pterygota  
Ordre Diptera  
Sous- Ordre Brachycera  
Famille Drosophilidae  
Sous- Famille Drosophilinae  
Genre *Drosophila*  
Espèce *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830)

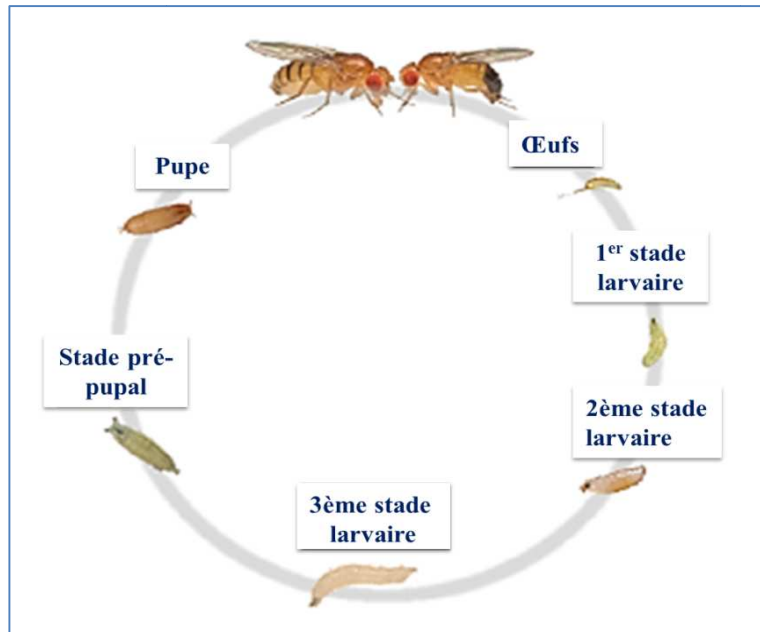
Les femelles connaissent un développement plus rapide que celui des males (Greenspan et Ferveur, 2000). Chez *D. melanogaster*, la femelle pond directement ses œufs sur un milieu qui servira de substrat alimentaire aux larves qui en sortiront. La femelle peut pondre au maximum deux centaines d'œufs au cours de sa vie selon la qualité du substrat alimentaire et surtout de la température ambiante.

Le cycle de vie de *D. melanogaster* comprend l'embryogénèse, trois stades larvaires, un stade pupal qui se termine par l'émergence d'une mouche qui est capable de voler et de se reproduire. Le cycle de développement complet de l'œuf à l'œuf dure 2 semaines environ.

- **Stades larvaires** : Une trentaine d'heures après la ponte, les œufs vont éclore pour donner naissance à une petite larve blanchâtre. Celle-ci se nourrit alors de la pulpe du fruit en creusant des galeries. La drosophile vit sous forme de larve durant 5 à 6 jours environ en munt à travers 3 stades larvaires, pendant lesquels elle mange et croît énormément (Campbel et Reece, 2004).
- **Stade pupal** : Les périodes embryonnaire et larvaire se succèdent et conduisent à la formation d'une pupe. La taille de l'animal est déterminée par la taille de la larve à l'issue d'une période de forte croissance larvaire (Colombani *et al.*, 2006) ; la larve rampe jusqu'à une portion sèche des aliments, ou à l'extérieur et après environ 4 à 5 jours passés sous forme de pupe, apparait, enfin l'adulte ailé (Watson *et al.*, 1994).



- **Stade adulte** : Après une nymphose de 5 jours, à une température de 25°C et à un taux d'humidité de 70%, la *Drosophila* adulte non encore pigmentée sort de la pupe et au bout de 8 heures la pigmentation est définitive et les ailes sont gonflées. Les adultes s'alimentent des fruits mûrs ou avariés, de végétaux et de champignons en décomposition ainsi que les liquides fermentés (Tracqui et Demongeot, 2003).



**Figure 2.** Cycle de développement de *D. melanogaster*. La durée d'une génération est d'environ 10 jours à 25°C, avec environ 1 jour pour l'embryogenèse, 1 jour pour le premier stade larvaire, 1 jour pour second stade larvaire, 3 jours pour le troisième stade larvaire et 5 jours pour le stade pupal (Source : FlyMove, <http://flymove.unimuenster.de/Genetics/Flies/GeneFliespage.html>).

### 2.2. Technique d'élevage au laboratoire

Les *Drosophiles* utilisées pour l'ensemble des expérimentations sont des mouches Canton S (CS ; lignée sauvage originaire d'Amérique du Nord et maintenue en laboratoire depuis 1935). Cette lignée est utilisée dans de nombreux laboratoires de recherche. L'élevage se fait sur milieu artificiel, dans des flacons en plastique de 30 ml contenant 10 ml du milieu nutritif standard semi-solide composé de farine de maïs (33,33 g), d'agar-agar (4,8 g), de levure (33,33 g) et d'antifongique [25 ml de méthyl-hydroxy-4-benzoate à 10 % dans l'éthanol 95%]. L'élevage se fait à une température de 25° C et un taux d'humidité relative de 65% ± 5% avec une scotophase de 12h de lumière. Pour assurer un bon rendement, on fait séquentiellement des repiquages. La densité des parents a été maintenue à un niveau limité afin d'éviter toute compétition entre les larves.



### 2.3. Présentation de l'insecticide

Le spiromésifène (Oberon® 240 SC : solution concentrée ; Bayer CropScience, Germany) a été fourni par Bayer CropScience (Algeria). C'est le nom commun du 3,3-diméthylbutyrate de 3-mésityl-2-oxo-1-oxaspiro [4.4] non-3-en-4-yle. Sa formule brute est  $C_{23}H_{30}O_4$  et sa masse molaire est de 370,48 g (Fig.6). C'est un nouvel insecticide/acaricide systémique dérivé des acides tétroniques spirocyclique, doté d'un mode d'action unique, l'inhibition de la synthèse des lipides en empêchant la biosynthèse des acides gras (Mann *et al.*, 2012).

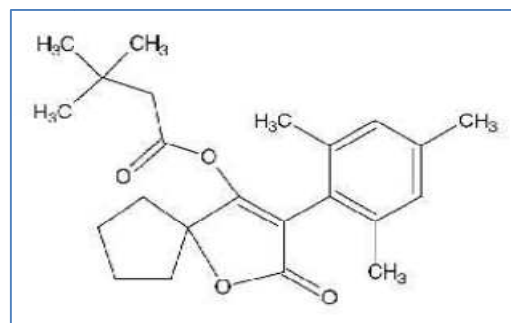


Figure 3. Formule de structure du spiromésifène (European Food Safety Authority, 2012).

### 2.4. Traitement et tests de toxicité

Afin de caractériser l'efficacité du spiromésifène chez *drosophila melanogaster* deux types de traitement ont été envisagés :

**Application topique :** Après un screening préalable, le spiromésifène a été testé à différentes concentrations (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 et 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Le produit a été administré par application topique sur les larves de dernier stade (L3 : 12h avant la formation du puparium) de *D. melanogaster* à raison d'1  $\mu\text{l}$  de matière active dilué dans un mélange acétone/eau (50/50). Les larves témoins reçoivent 1 $\mu\text{l}$  de solvant seul (acétone/eau : 50/50). Les tests de toxicité ont été réalisés dans des boîtes de Pétri en plastique comportant chacune 30 individus ; trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration.

**Incorporation dans le milieu :** après des observations préliminaires, plusieurs concentrations (1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10  $\mu\text{g}$  de matière active /g de milieu standard) ont été testées. Le produit a été mélangé au milieu nutritif et administré lors du développement pré-imaginal de *D. melanogaster*. Pour chaque test, 50 œufs (<4 heures) ont été placés dans chaque flacon



contenant 4 g du milieu nutritif mélangé ou non à différentes concentrations de spiromésifène. Le milieu non traité a été utilisé comme témoin. Le test a été réalisé avec 30 répétitions par concentration.

Après émergence des adultes, la mortalité est enregistrée et le pourcentage de mortalité observée est corrigé par la formule d'Abbott. (1925) qui permet de soustraire la mortalité naturelle. Les pourcentages de mortalités corrigées subissent une transformation angulaire selon Bliss. (1938) cité par Fisher et Yates. (1957). Les données normalisées font l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification. Les mortalités corrigées obtenues permettent d'établir une courbe des probits en fonction des logarithmes décimaux des doses. Les pourcentages se convertissent en leurs probits (Fisher et Yates, 1957). Le logarithme décimal des concentrations de létalité de l'exuviation adulte (CL50 et CL90) sont déterminés à partir des droites de régression selon le procédé mathématique de Finney. (1971). Les intervalles de confiances sont ensuite calculés selon la méthode de Swaroop *et al.* (1966) avec une probabilité de 95%. La régression non linéaire exprimant le pourcentage de létalité corrigée en fonction du logarithme de la concentration a permis également d'estimer les concentrations létales ainsi que les concentrations sublétales utilisées dans cette étude (CL10 et CL25). Les calculs sont effectués à l'aide du logiciel GraphPad prism version 6.01 (GraphPad software, La Jolla California, U.S.A.).

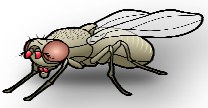
### **2.5. Mesure des paramètres du développement**

#### **2.5.1. Durée du développement larvaire et nymphal**

Afin d'évaluer la durée du développement larvaire et nymphal des séries témoin et traitées, des observations ont été faites toutes les 12 heures jusqu'à la pupaison puis toutes les 24 heures jusqu'à l'émergence des adultes. Trente répétitions par concentration ont été effectuées pour chaque série.

#### **2.5.2. Poids et teneur en eau des adultes**

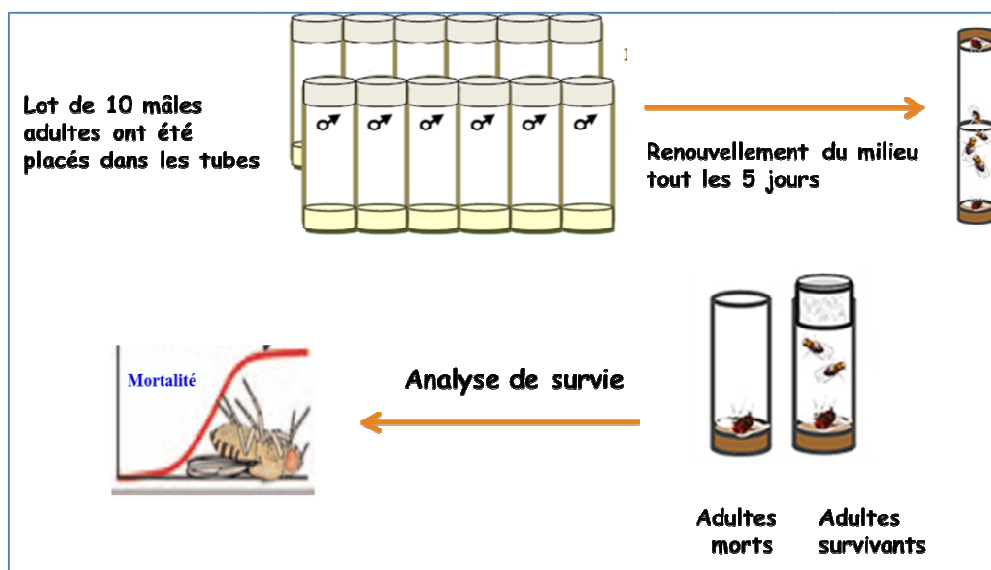
Les mâles et femelles adultes survivants ont été prélevés 5 jours après l'émergence. Leurs poids frais et sec ont été déterminés à l'aide d'une balance analytique ( $\pm 10 \mu\text{g}$  ; Sartorius R160-P). Des lots de 10 mouches anesthésiées vivantes ont été pesés pour obtenir leur poids frais. Ensuite, chaque lot a été conservé pendant 24 h dans un flacon en verre vide dans un incubateur à 45°C pendant 24 heures pour permettre une dessiccation complète avant d'être de nouveau



pesé. Le niveau relatif d'eau dans chaque lot a été estimé sur la base du rapport poids frais/sec. Chaque expérience a été répétée 12 fois sur des échantillons contenant 10 individus, pour chaque sexe.

### 2.5.3. Survie des mâles

Les mâles ayant survécu aux traitements pré-imaginaux ont été conservés par groupes de 10 dans des flacons en verre contenant du milieu standard. Chaque semaine, les mouches vivantes ont été transférées dans de nouveaux flacons avec du milieu frais et le nombre d'individus morts a été noté.

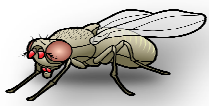


**Figure 4.** Procédure expérimentale pour l'évaluation de la survie des adultes de *D. melanogaster*

## 2.6. Extraction et dosages des constituants biochimiques dans le corps

### 2.6.1. Dosage des lipides totaux

Le contenu en lipides corporels totaux est déterminé selon la méthode de [Goldsworthy et al. \(1972\)](#) utilisant le réactif sulfophosphanillinique (0,38 g de vanilline, 55 ml d'eau distillée, 195 ml d'acide orthophosphorique à 85%) et une solution mère de lipides à 25 mg/ml (25 mg d'huile de table, 1 ml éther/chloroforme (v/v)) comme standard. Après évaporation des prises aliquotes de 100 µl du surnageant II dans un bain à sec à 40°C pendant environ 20 mn, on additionne 1 ml d'acide sulfurique concentré (96%) ; les tubes fermés sont agités puis chauffés dans un bain à sec à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on prélève 200 µl de chaque tube eppendorf qu'on met dans des tubes à essai auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif

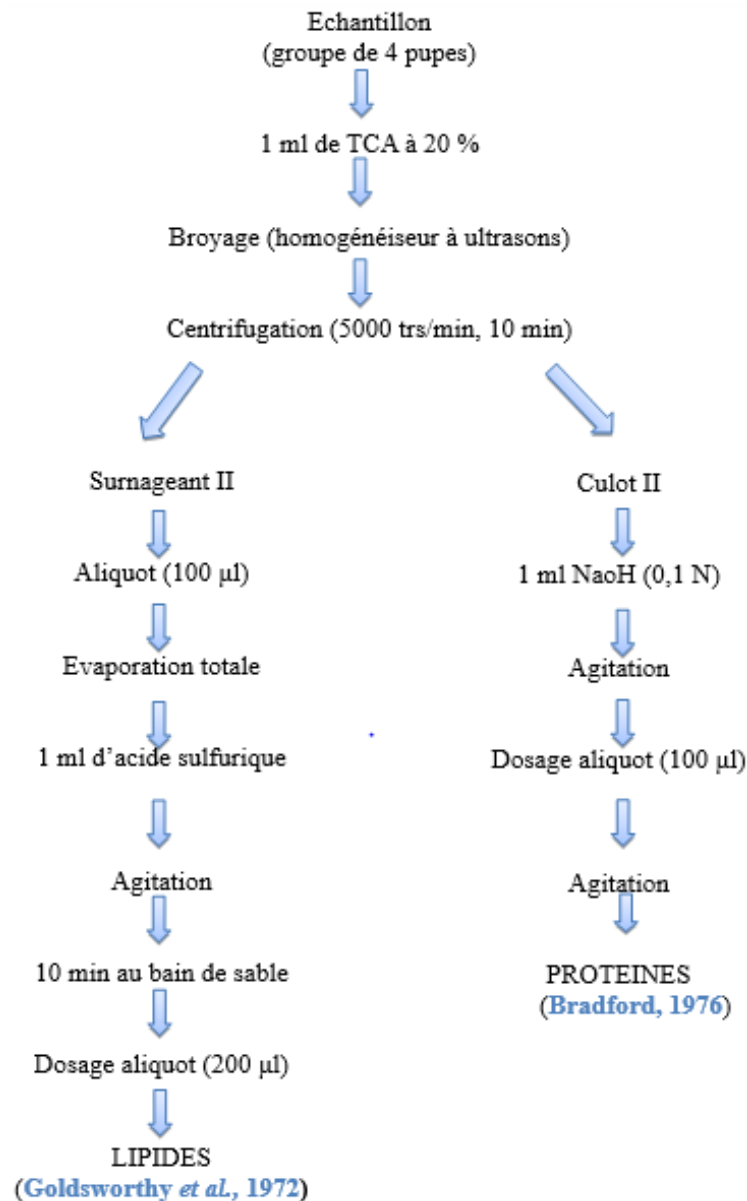
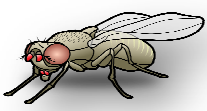


sulfo-phospho-vanillinique. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. La quantité de lipides est estimée à partir de la droite de régression obtenue après une gamme d'étalonnage (Tableau 1), effectuée à partir d'une solution mère de lipides (prendre 2,5 mg d'huile de tournesol 99% triglycérides) dans un tube eppendorf et ajouter 1 ml d'éther

**Tableau 1** : Réalisation de la gamme d'étalonnage des lipides.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides ( $\mu$ l)	0	20	40	60	80	100
Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V)	100	80	60	40	20	00
Réactif de vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

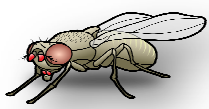




**Figure 5.** Extraction des protéines et lipides totaux selon *Shibko et al. (1966)*.

### 2.6.2. Dosage des protéines totales

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de *Bradford. (1976)*, qui utilise le bleu brillant de coomassie comme réactif (BBC) (G 250, Merck) et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard (Sigma). La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml) et du BBC (On homogénéise 100 mg de BBC dans 50 ml d'éthanol 95°, on y ajoute 100 ml d'acide orthophosphorique à 85% et le tout est complété à 1000 ml avec de l'eau distillée). La durée de la conservation du réactif est de 2 à 3 semaines à 4°C. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme (Tableau 2).

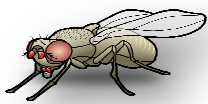
**Tableau 2** : Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de BSA ( $\mu$ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée ( $\mu$ l)	100	80	60	40	20	00
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

### 2.6.3. Extraction et dosage du malondialdéhyde

Les pupes nouvellement exuvies des lignées témoins et traitées sont prélevées à différents âges (24, 72 heures) de leur développement nymphal. L'essai est conduit avec 5 à 6 répétitions, chacune correspondant à un lot de 4 pupes. Les pupes sont broyées aux ultrasons dans 1 ml de tampon tris-HCl (50 mM, pH 7,5) [1,5137g tris, 0,0730 g EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), 42,78 g sucrose, 250 ml eau distillée]. Une fois l'homogénéisation réalisée, une centrifugation est effectuée pendant 10 min à 10000 tours/min et le surnageant récupéré servira au dosage du malondialdéhyde (MDA). Le dosage est réalisé avec 500  $\mu$ l du surnageant, additionné de 2,5 ml de TCA (acide trichloroacétique) (100 g TCA et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée). Après chauffage au bain marie à 100°C pendant 15 min et refroidissement dans de la glace, une deuxième centrifugation est effectuée à 10 000 tours/min pendant 10 min. Une fraction aliquote de 2 ml du surnageant est alors prélevée à laquelle on ajoute 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) [6,7 g TBA, 1000 ml eau distillée].

Après un second chauffage (100 °C, 15 min) et refroidissement, 1,5 ml de butanol sont rajoutés. Après agitation, une dernière centrifugation (10000 tours/min, 10 min) est réalisée et le surnageant constitué de 1 ml de butanol renfermant le complexe ATB (acide thiobarbiturique) /MDA est récupéré. Le MDA est dosé selon la méthode de [Draper et Hadley \(1990\)](#). La méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre ATB avec le MDA, composé issu de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires, donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm contre un blanc (tampon tris-HCl). Le taux de MDA est déterminé selon la formule suivante :



$$X = [(DO/156) \times (Vt/ Vs)] / \text{mg de protéines}$$

**X** : Taux du MDA (mM/mg de protéines).

**DO**: La densité optique obtenue après hydrolyse du substrat à 532 nm.

**156**: Coefficient d'extinction molaire de l'ATB (mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Vt** : Volume total de la cuve (1ml).

**Vs** : Volume du surnageant utilisé (0,5 ml).

**mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

La détermination du taux de MDA nécessite le dosage des protéines réalisé selon la méthode décrite précédemment.

#### 2.6.4. Extraction des acides gras et analyse par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

Les acides gras (AGs) contenus dans le corps entier ont été extraits selon [Shen et al. \(2010\)](#). Des mouches vierges âgées de cinq jours ayant survécu aux traitements pré-imaginal ont été conservées par groupes de 5, selon le sexe, et à -20°C. Le broyage a été réalisé en deux étapes à l'aide d'un broyeur et de billes de broyage métalliques (Biospecs Products 1 mm de diamètre) placées au fond d'un flacon contenant 1,5 ml de méthanol. Après décantation de quelques minutes dans la glace, le surnageant a été transféré dans un flacon en verre et mélangé avec 11,4 µl de C15:0 (acide pentadécanoïque; étalon interne) et 2,5 ml de BF<sub>3</sub> MetOH (solution méthanolique à 14% de trifluorure de bore). La solution a été bouchée sous azote, chauffée à 100°C pendant 1 h puis refroidie à une température ambiante. 0,25 ml de KCl 0,37 M et 1,5 ml d'hexane ont été ajoutés avant centrifugation (3000 tr / min pendant 5 minutes à 16°C).

Les extraits ont été analysés en utilisant un appareil QP2010 Shimadzu GC-MS équipé d'une colonne capillaire de type CP 58 FFAP (50 m x 0,25 mm de diamètre intérieur, épaisseur de film de 0,20 mm, Agilent). La colonne a été maintenue de manière isotherme à 40°C pendant 2 min, puis programmée à la vitesse de 3°C min<sup>-1</sup> à 240°C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à une vitesse linéaire de 47 cm s<sup>-1</sup>. L'orifice d'injection a été réglé à 280°C. Le spectromètre de masse a fonctionné à 70 eV et le balayage a été effectué de 29 à 600 amu à 0,5 balayages s<sup>-1</sup>. La fente d'injection a été ouverte 1 min après l'injection. L'acétoïne a été identifiée en utilisant son temps de rétention et son modèle de fragmentation ; les ions diagnostiques ont été comparés à la fois à la bibliothèque NIST / EPA / NIH et au spectre de masse du standard chimique de synthèse (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) analysés dans les mêmes



conditions. La quantité (ng/5 insectes) de chaque composant a été calculée sur la base des données obtenues à partir de l'étalon interne (C15:0).

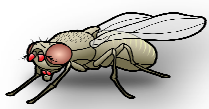
### **2.6.5. Extraction des hydrocarbures cuticulaires et analyse par chromatographie en phase gazeuse**

Les hydrocarbures cuticulaires (HCs) ont été extraits selon le protocole décrit par [Antony et Jallon \(1982\)](#) et [Marcillac \*et al.\* \(2005\)](#). Des mouches vierges âgées de 5 jours ont été congelées à -20 °C puis extraites individuellement pendant 5 min dans 30 µl d'hexane contenant 3,33 ng/µl de C26 (n-hexacosane) et 3,33 ng/µl de C30 (n-triacontane) utilisés comme standards internes. Les analyses chimiques des extraits ont été effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse CP3380 Varian, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur split-splitless (60 ml / min split-flow ; ouverture de la valve 30 s après injection). Une colonne CP-sil 5CB (25 mx 0,25 mm DI, épaisseur de film 0,12 µm, Agilent) a été utilisée pour les analyses. Le programme de température a commencé à 120°C, augmentant de 10°C / min à 140°C, puis augmentant de 2°C / min à 290°C, et en se maintenant pendant 10 min. De l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (vitesse de 50 cm/s à température ambiante). Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 280 et 290°C. L'identité chimique des hydrocarbures cuticulaires a été vérifiée en utilisant un système de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse équipé d'une colonne CP Sil 5CB.36 La quantité (ng/insecte) de chaque composant a été calculée sur la base des lectures obtenues à partir des étalons internes.

## **2.7. Extraction et dosage des constituants biochimiques des ovaires**

### **2.7.1. Dissection et prélèvement des ovaires**

Après l'émergence des adultes, les femelles âgées de 0, 3, 5 et 7 jours sont disséquées sous une loupe binoculaire, fixées sur le ventre par une aiguille sur une boîte de paraffine ; les pattes et les ailes sont sectionnées et le tégument de l'abdomen est coupé avec des micro-ciseaux afin de récupérer les ovaires. Ces derniers sont ainsi prélevés afin de déterminer leur masse. Les ovaires prélevés des séries témoins et traitées ont été pesés à l'aide d'une balance de précision ( $\pm 0,1$  mg) Model GD-503-NTEP, Sartorius (Goettingen, Germany) et conservés à 4°C par lots de 4 dans 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 % jusqu'aux dosages biochimiques.



### 2.7.2. Extraction des constituants

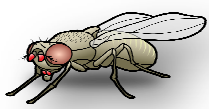
L'extraction des principaux constituants biochimiques des ovaires de *D. melanogaster* a été réalisée selon le procédé de [Shibko et al. \(1966\)](#). Les ovaires sont prélevés par lot de 4 et conservés dans 1 ml de TCA (20%) à 4°C ; quatre à cinq répétitions sont réalisées par série. Après un broyage aux ultrasons (Sonifier B-30) et centrifugation (5000 tours/min pendant 10 mn), le surnageant I est récupéré et servira au dosage des glucides totaux. Tandis qu'au culot, on ajoute 1ml d'un mélange éther/chloroforme (1V/1V), après une seconde centrifugation (5000 tours/min pendant 10 min), on obtient le surnageant II qui sera utilisé pour le dosage des lipides ([Goldsworthy et al., 1972](#)) tandis que le culot II dissout dans la soude (0,1 N), servira pour la quantification des protéines selon (Bradford, 1976).

### 2.7.3. Dosage des lipides ovariens

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de [Goldsworthy et al. \(1972\)](#) qui utilise la vanilline [0,38 g vanilline, 55 ml eau distillée, 195 ml acide orthophosphorique 85%] comme réactif et une solution mère de lipides à 2,5 mg/ml [2,5 mg d'huile de table (ELIO), 1 ml éther/chloroforme (v/v)] comme standard. Le dosage est réalisé sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de la gamme étalon auxquelles on ajoute 1 ml d'acide sulfurique (96 %). Après agitation et chauffage dans des bains à sec à 100 °C pendant 10 mn, puis refroidissement, 200 µl sont repris auxquels sont ajoutés 2,5 ml du réactif vanilline. Le mélange une fois agité et mis à l'obscurité pendant 30 minutes, une coloration rose se développe dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 530 nm (Tableau 3).

**Tableau 3 :** Réalisation de la gamme d'étalonnage des lipides ovariens.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Lipide (µl)	0	20	40	60	80	100
Ether/Chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Quantité de lipides (µg)	0	50	100	150	200	250
Réactif Vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5



#### 2.7.4. Dosage des glucides ovariens

Le dosage des glucides a été réalisé selon la technique de [Duchateau et Florkin. \(1959\)](#). Elle consiste à additionner 4 ml de réactif d'anthrone à 100 µl du surnageant I contenu dans un tube à essai et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 mn. Une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucides présente dans l'échantillon. La lecture de l'absorbance est faite à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Visible-Proche IR, ES11430) à une longueur d'onde de 620 nm. La quantification est effectuée à partir d'une gamme d'étalonnage (Tableau 4), réalisée avec une solution mère de glucose (Sigma-Aldrich, USA) (1 mg/ml d'eau distillée) comme standard.

**Tableau 4** : Réalisation de la gamme d'étalonnage des glucides ovariens.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

#### 2.7.5. Dosage des protéines ovariennes

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de [Bradford. \(1976\)](#) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 (Fluka, UK) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (Sigma-Aldrich, USA) (1mg/ml) comme standard. Le dosage des protéines dans les ovaires a été effectué dans une fraction aliquote de 100 µl. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme (Tableau 5).

**Tableau 5** : Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines ovariennes.

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA ( $\mu$ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée ( $\mu$ l)	100	80	60	40	20	0
Quantité de protéines ( $\mu$ g)	0	20	40	60	80	100
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

## 2.8. Tests de comportement

### 2.8.1. Comportement de préférence olfactive

Les mouches vierges ayant survécu aux traitements au cours des stades pré-imaginaux ont été collectées et conservées individuellement dans des flacons contenant du milieu nutritif frais. Après 4 à 7 jours, ces mouches ont été mise à jeûner sur un morceau de papier filtre humide 18h avant le test. Chaque adulte est ensuite introduit dans un olfactomètre en forme de Y. Un papier filtre préalablement incubé à 25° C pendant 18h dans un milieu traité avec le spiromésifène (1  $\mu$ g/g ; 5  $\mu$ g/g ou 7,5  $\mu$ g/g) ou un milieu standard vierge a été déposé dans chaque bras de l'olfactomètre avant le début du test.

Au bout de 4h maximum, on note sa réponse (attraction, répulsion, absence de réponse) vis-à-vis d'un choix entre le milieu contenant du Spiromésifène (allant de 1  $\mu$ g/g à 7.5 $\mu$ g/g) ou le milieu témoin vierge. Toutes les expériences ont été réalisées entre 9 et 13 heures du matin. Le test a été réalisé sous une lumière rouge lointaine (ampoules LED).



**Figure 6.** Représentation schématique de l'olfactomètre Y utilisé pour évaluer la préférence olfactive entre le milieu contenant du Spiromésifène (allant de 1 µg/g à 7,5 µg/g) ou le milieu témoin vierge.

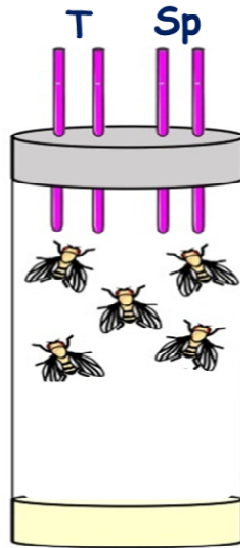
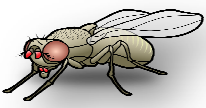
### 2.8.2. Préférence alimentaire (test multiCafe)

La préférence alimentaire entre une solution de contrôle sans spiromésifène (T) et une solution qui contient du spiromésifène (1µg/µl ou 5µg/µl) a été évaluée. Ces tests sont effectués sur des groupes de 5 mouches âgées de 4 à 6 jours (mâles et femelles séparés) placées pendant quatre heures dans un dispositif multiCafe comprenant 4 capillaires remplis de chacune des deux solutions (5 µl).

Les mouches ont été affamées pendant 18 heures dans des flacons avec un morceau de coton humidifié placé au fond du flacon avant la réalisation du test. Les solutions contenant du spiromésifène ont été diluées dans de l'eau distillée. Ils ont été colorés en rouge avec la sulforhodamine afin de visualiser facilement la limite de surface de la solution à examiner.

Des images de capillaires ont été capturées avant et après le test avec un appareil photo de 8 mégapixels. Cela nous a permis de déterminer le volume de la solution ingérée par les mouches lors du test d'alimentation. Ensuite, le niveau d'évaporation a été soustrait des niveaux expérimentaux et la quantité de nourriture ingérée a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. La consommation en sp a été évaluée avec un indice de préférence (PI) selon l'équation suivante :  $PI = (V_{sp} - V_t) / (V_{sp} + V_t)$ ,  $V_{sp}$  et  $V_t$  représentant respectivement le volume des solutions contenant du spiromésifène et des solutions témoin de contrôle.





**Figure 7.** Représentation schématique du test multiCafe utilisé pour évaluer la préférence de consommation entre une solution de contrôle sans spiromésifène (**T**) et une solution qui contient du spiromésifène ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ou  $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

### 2.8.3. Comportement sexuel et progéniture

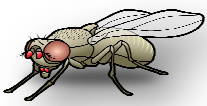
Les mouches vierges nouvellement écloses ayant survécu aux traitements au cours des stades pré-imaginaux ont été collectées. Les mâles ont été gardés séparément tandis que les femelles ont été élevées en groupes (5 par flacon). L'isolement des mâles permet d'éviter les interactions entre eux qui, lorsqu'elles ont lieu lors de premiers jours de la vie adulte, entraînent une diminution de l'agressivité et du pourcentage d'accouplement (Svetec et Ferveur, 2005). Tous les insectes utilisés étaient âgés entre 3 et 5 jours afin qu'ils soient sexuellement matures. Concernant les tests d'accouplement, le mâle est d'abord introduit dans la cellule de comportement puis, cinq minutes après, la femelle. Les tests comportementaux ont toujours été réalisés entre 8 et 12 heures du matin, correspondant au premier pic d'activité comportementale des mouches (Grillet *et al.*, 2006). Ces tests se déroulent dans une salle à une température et une hygrométrie ambiantes constantes. L'intensité de la parade des mâles et la capacité à s'accoupler sont notées pendant une heure.

Les paramètres suivants sont enregistrés :

Le taux d'accouplement : nombre de mâles accouplés sur le nombre total de mâles.

La latence d'accouplement : temps écoulé entre le début du test et le début de l'accouplement.

La durée de l'accouplement : temps de copulation.



Différentes combinaisons de couples ont été testées : (F: femelle; M: mâle; T: témoin; 1: 1  $\mu\text{g/g}$  ; 2,5: 2,5  $\mu\text{g/g}$ ; 5: 5  $\mu\text{g/g}$ ; 7,5: 7,5  $\mu\text{g/g}$ ; 10: 10  $\mu\text{g/g}$ ):

**Couples 1 : F<sub>T</sub> x M<sub>T</sub> :** Femelles Témoins X Mâles Témoins

**Couples 2 : F<sub>1</sub> x M<sub>T</sub> :** Femelles <sub>1</sub> X Mâles Témoins

**Couples 3 : F<sub>T</sub> x M<sub>1</sub> :** Femelles Témoins X Mâles <sub>1</sub>

**Couples 4 : F<sub>1</sub> x M<sub>1</sub> :** Femelles <sub>1</sub> X Mâles <sub>1</sub>

**Couples 5 : F<sub>2,5</sub> x M<sub>T</sub> :** Femelles <sub>2,5</sub> X Mâles <sub>T</sub>

**Couples 6 : F<sub>T</sub> x M<sub>2,5</sub> :** Femelles Témoins X Mâles <sub>2,5</sub>

**Couples 7 : F<sub>2,5</sub> x M<sub>2,5</sub> :** Femelles <sub>2,5</sub> X Mâles <sub>2,5</sub>

**Couples 8 : F<sub>5</sub> x M<sub>T</sub> :** Femelles <sub>5</sub> X Mâles Témoins

**Couples 9 : F<sub>T</sub> x M<sub>5</sub> :** Femelles Témoins X Mâles <sub>5</sub>

**Couples 10 : F<sub>5</sub> x M<sub>5</sub> :** Femelles <sub>5</sub> X Mâles <sub>5</sub>

**Couples 11 : F<sub>7,5</sub> x M<sub>T</sub> :** Femelles <sub>7,5</sub> X Mâles Témoins

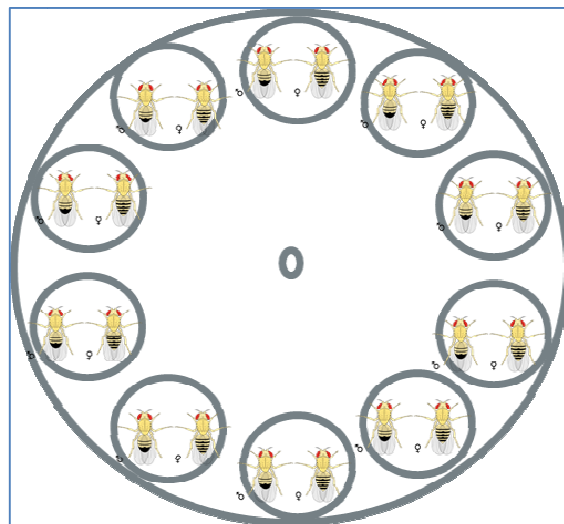
**Couples 12 : F<sub>T</sub> x M<sub>7,5</sub> :** Femelles Témoins X Mâles <sub>7,5</sub>

**Couples 13 : F<sub>7,5</sub> x M<sub>7,5</sub> :** Femelles <sub>7,5</sub> X Mâles <sub>7,5</sub>

**Couples 14 : F<sub>10</sub> x M<sub>T</sub> :** Femelles <sub>10</sub> X Mâles Témoins

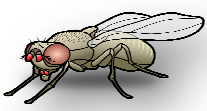
**Couples 15 : F<sub>T</sub> x M<sub>10</sub> :** Femelles Témoins X Mâles <sub>10</sub>

**Couples 16 : F<sub>10</sub> x M<sub>10</sub> :** Femelles <sub>10</sub> X Mâles <sub>10</sub>



**Figure 8.** Dispositif utilisé pendant les tests de comportement

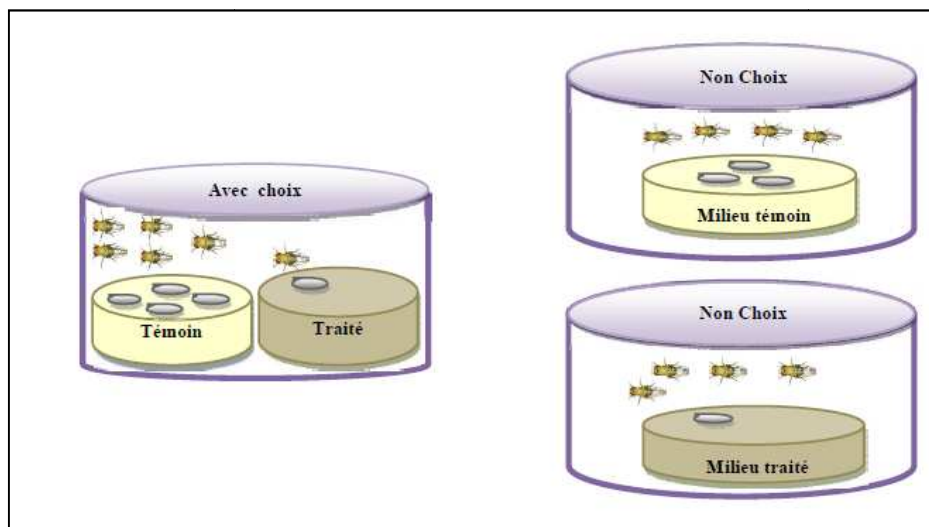
Après l'accouplement, chaque femelle a été introduite dans un flacon contenant environ 4g de milieu afin de compter sa progéniture. Le nombre d'adultes obtenus 12 jours après l'accouplement est noté.



#### 2.8.4. Préférence d'oviposition en condition de choix ou de non choix

Des adultes mâles et femelles (5 mâles et 5 femelles) vierges âgées de 3 à 5 jours, ayant survécus au traitement préalable au stade pré-imaginal sont mis à s'accoupler pendant 4h, puis sont libérés pendant 24h dans un dispositif expérimental en verre ( $\varnothing = 8,5$  cm) fermés par un couvercle renfermant deux petites cuvettes remplies avec du milieu nutritif (diamètre = 35 mm, hauteur = 5 mm), l'une contenant le milieu nutritif témoin et l'autre le milieu nutritif traité (spiromésifène 1 ou  $5\mu\text{g/g}$ ). Ces cuvettes servant de pondoirs, les œufs déposés sur chaque pondoir peuvent être dénombrés.

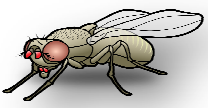
Un Indice de Préférence d'Oviposition (IPO) est calculé selon Flaven-Pouchon *et al.* (2014) comme suit 
$$\text{IPO} = \frac{(\text{nombre d'œufs sur milieu traité}) - (\text{nombre d'œufs sur milieu témoin})}{(\text{nombre d'œufs sur milieu traité}) + (\text{nombre d'œufs sur milieu témoin})}$$



**Figure 9.** Procédure expérimentale pour l'évaluation de la préférence d'oviposition en condition de choix ou de non choix.

#### 2.9. Analyses statistiques

La moyenne et l'erreur standard (SEM) 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 Bartlett 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 (un et deux critères de classification) suivie du test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey est utilisée pour traiter les résultats concernant le poids corporel, le nombre de descendant, les lipides totaux, le malondialdéhyde, les acides gras, les hydrocarbures, le poids des ovaires, les lipides ovariens, les glucides ovariens, les protéines ovariennes, respectivement. Les données concernant la durée de développement, les temps de latences et la durée d'accouplements, le nombre d'œufs pondus, la préférence alimentaire sont analysés grâce au test de Kruskal-Wallis combiné avec le test de Dunn's. Le test de Mann-Whitney est utilisé pour comparer l'indice de préférence d'oviposition (IPO). Les tests log-rank Mantel-Cox et Kaplan-Meier sont utilisés pour traiter les données de la survie. Le test du Chi-square ( $\chi^2$ ) est utilisé pour comparer le potentiel reproducteur et la préférence olfactive. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism d'analyse et de traitement statistique des données version 6.01 pour Windows XP.

# **RESULTATS**



### 3. RESULTATS

#### 3.1. Toxicité du spiromésifène à l'égard de *D. melanogaster*

##### 3.1.1 Toxicité du spiromésifène par application topique chez les larves

L'efficacité du spiromésifène a été testée par application topique sur les larves L3 de *D. melanogaster* avec différentes concentrations (12,5, 25, 50, 100, 150 et 200 µg/µl). Les individus témoins reçoivent 1 µl du solvant seul (acétone/eau : 50/50). La mortalité observée des adultes est mentionnée dans le tableau 6 avec des taux variant de 14 % (12,5 µg/µl) à plus de 89 % (200µg/µl), avec une relation dose-réponse. Les pourcentages de mortalité observée chez les séries traitées ont été ensuite corrigés par la formule d'Abbott (1925) afin de soustraire la mortalité naturelle (Tableau 7). Après une transformation angulaire des pourcentages de mortalité (Tableau 8), les données ont fait l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification qui révèle un effet concentration très hautement significatif ( $p < 0,001$ ).

**Tableau 6 :** Effet du spiromésifène (µg/µl) administré par application topique sur les larves L3 de *D. melanogaster*, sur le taux de mortalité observée (moyenne ± SEM ; n= 3 répétitions comportant chacune 30 individus).

Répétitions	Concentrations (µg/µl)						
	Témoin	12,5	25	50	100	150	200
<b>1</b>	4	13	28	50	64	82	88
<b>2</b>	4	15	32	68	64	80	88
<b>3</b>	12	14	24	48	68	76	92
<b>m ± SEM</b>	<b>6,66±2,66</b>	<b>14,00 ± 0,57</b>	<b>28,00±2,30</b>	<b>55,33±6,36</b>	<b>65,33±1,33</b>	<b>79,33±1,76</b>	<b>89,33±1,33</b>

**Tableau 7 :** Effet du spiromésifène (µg/µl) administré par application topique sur les larves L3 de *D. melanogaster*, sur le taux de mortalité corrigée (m ± SEM ; n = 3 répétitions comportant chacune 30 individus).

Répétitions	Concentrations (µg/µl)					
	12,5	25	50	100	150	200
<b>1</b>	9,37	25	47,91	62,5	81,25	87,50
<b>2</b>	11,45	29,16	53,12	62,5	79,16	87,50
<b>3</b>	8,51	19,14	43,75	65,95	74,46	91,66
<b>m ± SEM</b>	<b>9,77±0,87</b>	<b>24,43±2,90</b>	<b>48,26±2,71</b>	<b>63,65±1,15</b>	<b>78,29±2,00</b>	<b>88,89±1,38</b>



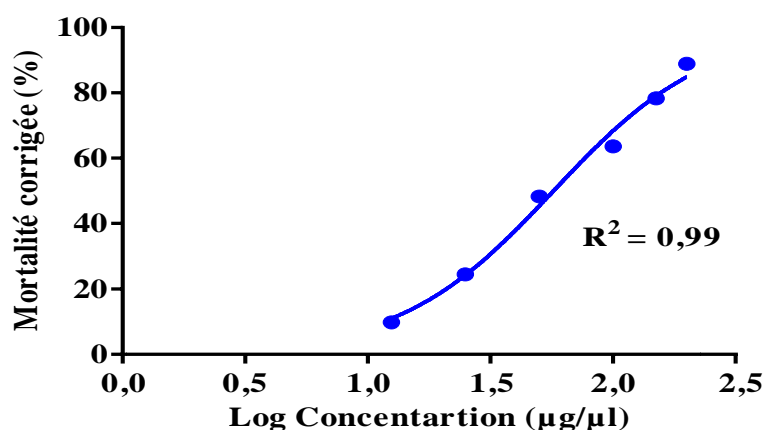
**Tableau 8 :** Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) administré par application topique sur les larves L3 de *D. melanogaster*. Transformation angulaire du taux de mortalité corrigée ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n = 3$  répétitions comportant chacune 30 individus).

Répétitions	Concentrations ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )					
	12,5	25	50	100	150	200
1	17,46	30,00	43,28	51,94	64,16	68,87
2	19,37	32,58	46,72	51,94	62,73	68,87
3	16,43	25,84	40,98	53,73	59,34	71,57
<b>m <math>\pm</math> SEM</b>	<b>17,75<math>\pm</math>0,86</b>	<b>29,47<math>\pm</math>1,96</b>	<b>43,66<math>\pm</math>1,66</b>	<b>52,54 <math>\pm</math> 0,59</b>	<b>62,08 <math>\pm</math> 1,42</b>	<b>69,77 <math>\pm</math> 0,90</b>

La courbe dose-réponse exprimant les pourcentages de mortalité en fonction du logarithme de la concentration appliquée (Fig. 10) a permis l'estimation des valeurs des différentes concentrations létales (CL) ainsi que leurs intervalles de confiance (IC) (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Toxicité du spiromésifène administré *in vivo* par application topique sur les larves L3 de *D. melanogaster* : détermination des concentrations létales (CL  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) avec leur intervalle de confiance (IC).

CL ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Valeur	Intervalle de confiance
CL <sub>10</sub>	11,61	7,81 – 17,24
CL <sub>25</sub>	25,76	20,06 – 33,09
CL <sub>50</sub>	57,18	48,71 – 67,14
CL <sub>90</sub>	281,70	198,30 – 400,20



**Figure 10.** Toxicité du spiromésifène ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en application topique sur les larves L3 de *D. melanogaster*.



### 3.1.2. Toxicité du spiromésifène administré par ingestion/contact au cours des stades immatures

Le spiromésifène a été testé par ingestion/contact (incorporé dans le milieu d'élevage) sur les stades pré-imaginaux à des concentrations variant de 1 à 10  $\mu\text{g/g}$ , induisant une mortalité chez les adultes avec des pourcentages précisés dans le tableau 10. La mortalité des adultes, de l'ordre de  $5,06 \pm 0,13\%$  chez les témoins (mortalité « naturelle ») augmente avec la concentration, chez toutes les séries traitées ; ainsi, le pourcentage de mortalité observée qui est de  $8,06 \pm 0,15\%$  avec la concentration la plus faible est de  $91,40 \pm 0,30\%$  avec la concentration la plus élevée.

Les pourcentages de mortalités observées chez les séries traitées ont été ensuite corrigés par la formule d'Abbott (1925) afin de soustraire la mortalité naturelle (Tableau 11). Les résultats de la mortalité corrigée montrent des pourcentages variant de  $3,15 \pm 0,02\%$  à la concentration la plus faible ( $1\mu\text{g/g}$ ) à  $90,93 \pm 0,33\%$  à la concentration la plus forte ( $10\mu\text{g/g}$ ).

L'analyse de la variance à un critère de classification effectuée après transformation angulaire des pourcentages de mortalité révèle un effet traitement hautement significatif ( $p < 0,001$ ). Le classement des doses par le test HSD de Tukey révèle l'existence de 5 groupes statistiques (Fig. 11).

La courbe dose-réponse exprimant les pourcentages de mortalité en fonction du logarithme de la concentration appliquée (Fig. 12) a permis l'estimation des valeurs des différentes concentrations létales (CL) ainsi que leurs intervalles de confiance (IC) (Tableau 12).

**Tableau 10 :** Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g/g}$ ) administré par ingestion/contact au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* sur le taux de mortalité observée des adultes ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n= 3$  répétitions comportant chacune 500 œufs).

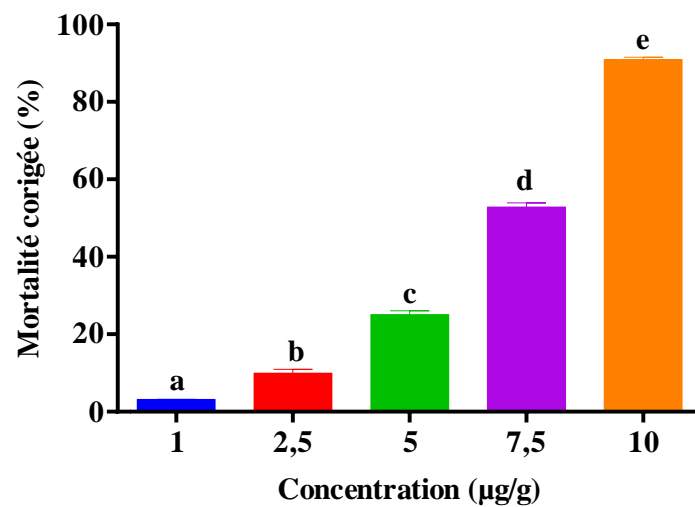
Répétitions	Témoins	1	2,5	5	7,5	10
R1	5,20	8,22	13,50	29,70	54,28	91,20
R2	5,20	8,22	15,32	29,24	55,24	91,00
R3	4,80	7,76	14,66	27,50	56,24	92,00
<b>m <math>\pm</math> SEM</b>	<b>5,06<math>\pm</math>0,13</b>	<b>8,06<math>\pm</math>0,15</b>	<b>14,49<math>\pm</math>0,53</b>	<b>28,81<math>\pm</math>0,67</b>	<b>55,25<math>\pm</math>0,56</b>	<b>91,40<math>\pm</math>0,30</b>



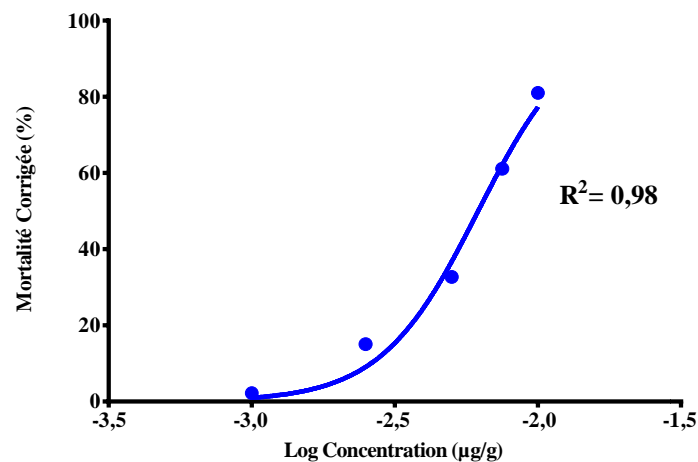


**Tableau 11 :** Effet du spiromésifène ( $\mu\text{g/g}$ ) administré par ingestion/contact au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster*, sur le taux de mortalité corrigée des adultes ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n= 3$  répétitions comportant chacune 500 œufs).

Répétitions	1	2,5	5	7,5	10
R1	3,18	08,75	25,84	51,77	90,71
R2	3,18	10,67	25,35	52,78	90,50
R3	3,10	10,35	23,84	54,03	91,59
<b>m <math>\pm</math> SEM</b>	<b>3,15<math>\pm</math>0,02</b>	<b>9,92<math>\pm</math>0,59</b>	<b>25,01<math>\pm</math>0,60</b>	<b>52,86<math>\pm</math>0,65</b>	<b>90,93<math>\pm</math>0,33</b>



**Figure 11.** Mortalité corrigée (%) des adultes après administration du spiromésifène et classement des doses testées par le test HSD de Tukey. Les lettres différentes indiquent la présence d'une différence significative entre concentrations.



**Figure 12.** Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme de la concentration de spiromésifène ( $\mu\text{g/g}$ ).



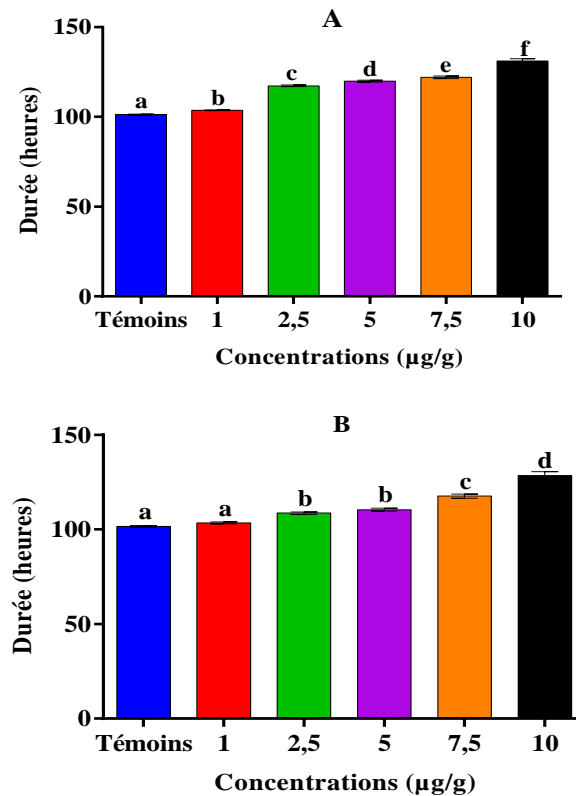
**Tableau 12 :** Toxicité du spiromésifène administré par ingestion au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* : détermination des concentrations létales (CL  $\mu\text{g/g}$ ) avec leur intervalle de confiance (IC).

CL ( $\mu\text{g/g}$ )	Valeur	Intervalle de confiance
CL <sub>10</sub>	2,61	1,67 – 4,08
CL <sub>25</sub>	4,02	3,06 – 5,27
CL <sub>50</sub>	6,18	5,28 – 7,24
CL <sub>90</sub>	14,64	9,78 – 21,91

## 3.2. Effets du spiromésifène sur le développement

### 3.2.1. Effets sur la durée de développement larvaire et pupal

Le spiromésifène administré à différentes concentrations par ingestion/contact au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* augmente significativement la durée de développement des stades larvaire et pupal (Fig. 13). En effet, la durée de développement des larves varie suivant une relation dose-réponse ( $p < 0,001$ ) : les valeurs moyennes enregistrées sont de  $101,3 \pm 0,27$  heures pour les témoins,  $103,7 \pm 0,26$  h pour la plus faible concentration ( $1\mu\text{g/g}$ ) et  $131,1 \pm 1,32$  h pour la plus forte concentration ( $10\mu\text{g/g}$ ). Le spiromésifène induit donc un allongement de la durée de développement larvaire variant entre environ 2,5 h pour la plus faible concentration et 30 h pour la plus forte concentration (Fig. 13 A). Une augmentation de la durée du stade pupal est également enregistrée pour toutes les concentrations testées ( $p < 0,001$ ). Les valeurs moyennes sont de  $197,7 \pm 0,46$  h pour les témoins,  $199,5 \pm 0,51$  h pour la plus faible concentration ( $1\mu\text{g/g}$ ) et  $224,6 \pm 2,02$  h pour la plus forte concentration ( $10\mu\text{g/g}$ ) (Fig. 13 B).



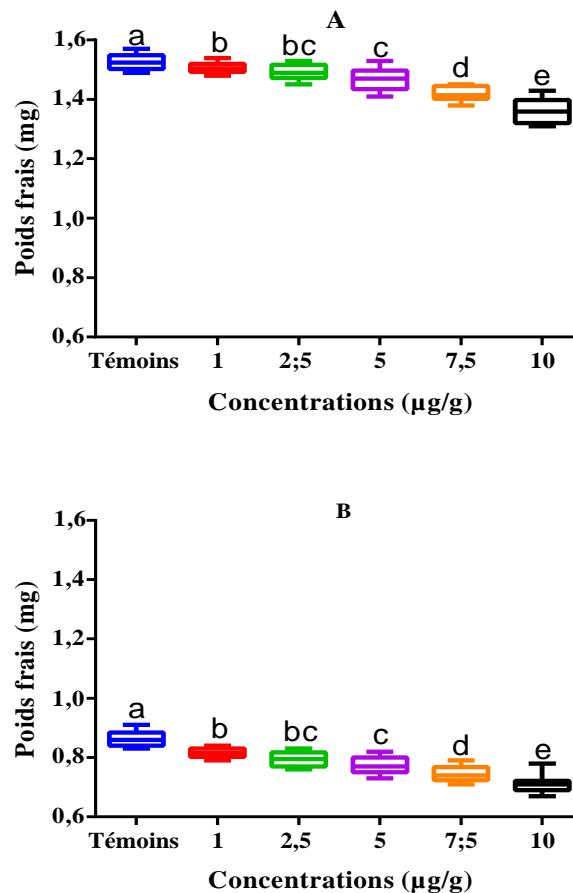
**Figure 13.** Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* sur la durée de développement (exprimé en heures) des stades larvaire (A) et pupal (B) ( $m \pm SEM$  ;  $n= 94 - 485$ ). Les barres suivies d'une même lettre indiquent des valeurs qui ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2. Effets sur le poids corporel et la teneur en eau des adultes

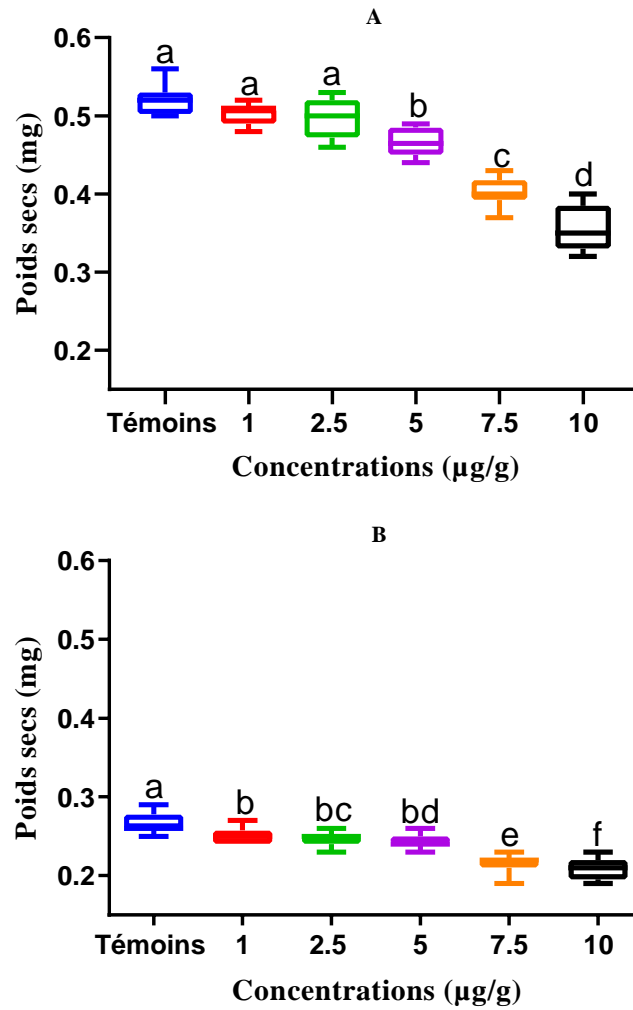
Les effets des différentes concentrations de spiromésifène sur le poids corporel frais de la femelle et du mâle sont illustrés sur la figure 14. Les femelles témoins pèsent  $1,52 \pm 0,007$  mg, le traitement au spiromésifène au cours du stade pré-imaginal entraîne une réduction significative ( $F_{5, 66} = 54,68$  ;  $p < 0,001$ ) du poids frais des femelles. Les valeurs moyennes enregistrées chez les séries traitées sont de  $1,50 \pm 0,004$  mg pour la concentration la plus faible (1 µg/g) et de  $1,36 \pm 0,01$  mg pour la concentration la plus élevée (10 µg/g) (Fig. 14A). Le spiromésifène diminue aussi de manière significative le poids frais des mâles par rapport aux séries témoins ( $F_{5, 66} = 56,27$  ;  $p < 0,001$ ). Les valeurs moyennes enregistrées sont de  $0,86 \pm 0,007$  mg pour les témoins,  $0,81 \pm 0,004$  mg pour la concentration la plus faible (1 µg/g) et  $0,71 \pm 0,007$  mg pour la concentration la plus élevée (10µg/g) (Fig. 14B). Concernant le poids corporel secs de la femelle et du mâle sont illustrés sur la figure 15. Les femelles témoins



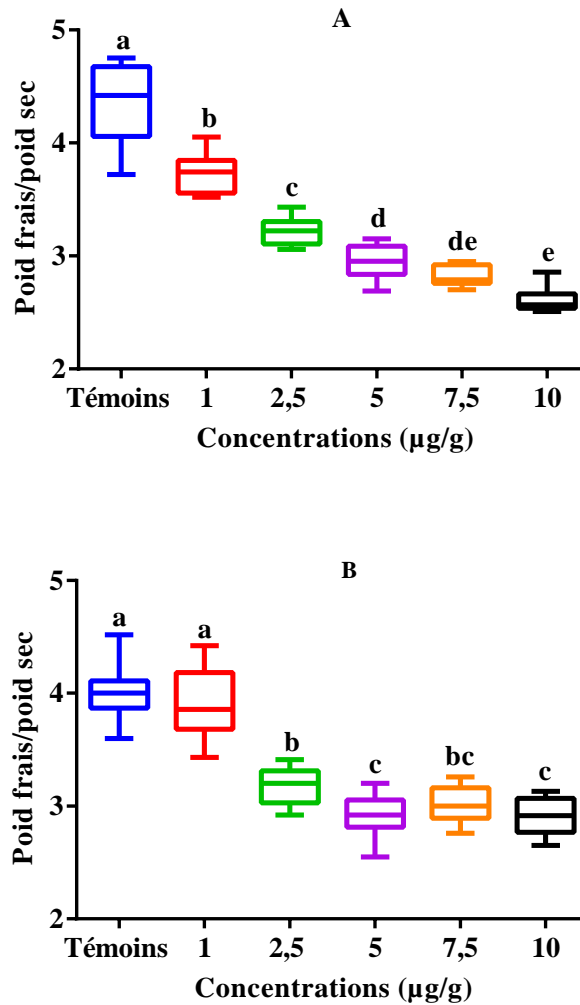
pèsent  $0,35 \pm 0,008$  mg, le traitement au spiromésifène au cours du stade pré-imaginal entraîne une augmentation significative ( $F_{5,66} = 122,4$  ;  $p < 0,001$ ) du poids frais des femelles. Les valeurs moyennes enregistrées chez les séries traitées sont de  $0,40 \pm 0,004$  mg pour la concentration la plus faible (1  $\mu\text{g/g}$ ) et de  $0,51 \pm 0,004$  mg pour la concentration la plus élevée (10  $\mu\text{g/g}$ ) (fig. 15A). Le spiromésifène augmente aussi de manière significative le poids secs des mâles par rapport aux séries témoins ( $F_{5,66} = 43,97$  ;  $p < 0,001$ ). Les valeurs moyennes enregistrées sont de  $0,21 \pm 0,003$  mg pour les témoins,  $0,21 \pm 0,003$  pour la concentration la plus faible (1  $\mu\text{g/g}$ ) et  $0,24 \pm 0,002$  mg pour la concentration la plus élevée (10  $\mu\text{g/g}$ ) (Fig. 15B). Le spiromésifène a également eu un effet sur la teneur en eau corporelle des femelles (Fig. 16A) et des mâles (Fig. 16B) par rapport aux témoins ( $F_{5,66} = 141,9$  ;  $p < 0,001$ ) pour les femelles et ( $F_{5,66} = 67,77$  ;  $p < 0,0001$ ) pour les mâles.



**Figure 14.** Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* sur le poids frais des adultes femelle (A) et mâle (B) (5 jours après l'émergence) ( $n = 10$  répétitions de 10 adultes). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes  $p > 0,05$ .



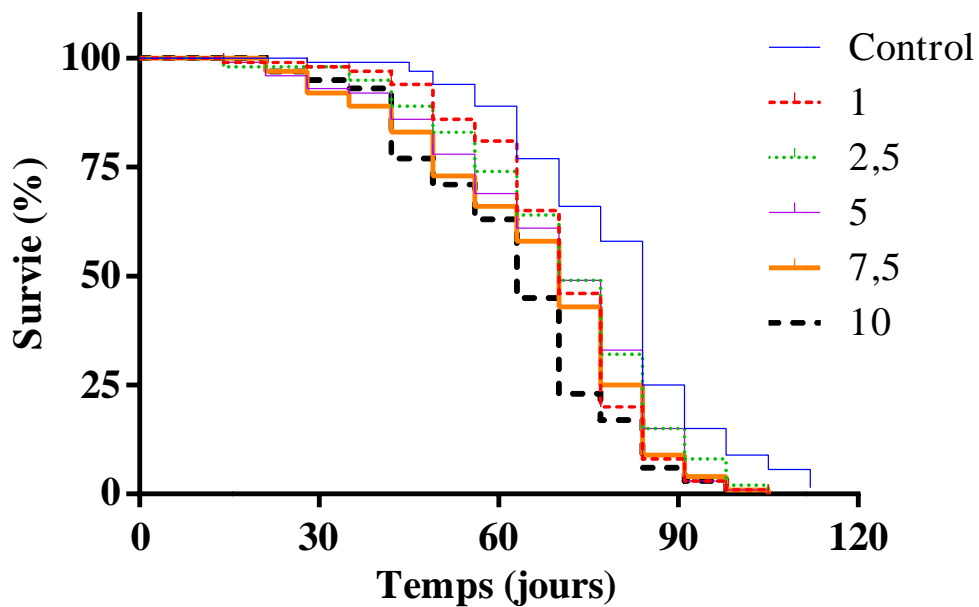
**Figure 15.** Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* sur le poids secs des adultes femelle (**A**) et mâle (**B**) (5 jours après l'émergence) (n= 10 répétitions de 10 adultes). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ .



**Figure 16.** Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* sur la teneur en eau des adultes femelle (A) et mâle (B) (5 jours après l'émergence) (n= 10 répétitions de 10 adultes). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes  $p > 0,05$ .

### 3.2.3 Effets sur la survie des mâles

D'après la figure 17, le traitement au spiromésifène au cours du stade pré-imaginal de *D. melanogaster* entraîne une réduction de la survie des adultes mâles (test du log-rank,  $\chi^2 = 52,93$ , dl = 5,  $p < 0,001$ ). La mortalité enregistrée est dépendante de la dose administrée. Chez les adultes témoins, le temps léthal 50 (TL50) est de 84 h contre 70 h pour la concentration la plus faible (1 µg/g) et 63 h pour la concentration la plus élevée (10 µg/g) (Fig. 17).



**Figure 17.** Effets du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* sur la survie des mâles adultes (n = 100).

### 3.3. Effets du spiromésifène sur les lipides corporels

#### 3.3.1. Effets sur le taux de lipides totaux corporels

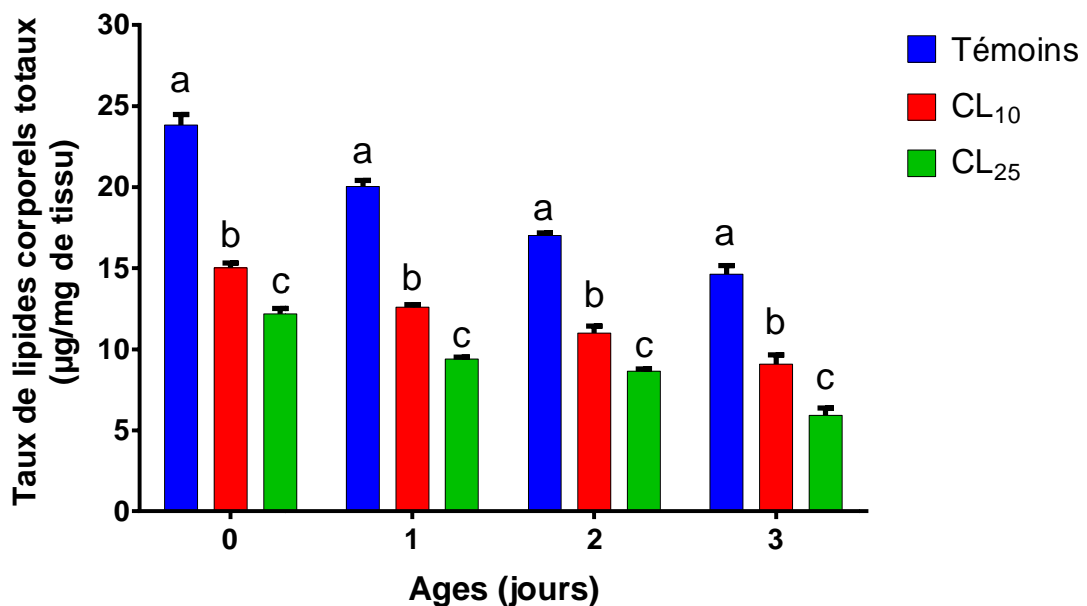
Les larves L3 ont été traitées par application topique. La teneur en lipides totaux corporels a été déterminée chez les séries témoins et traitées (CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub>) à différents jours au cours du développement nymphal (Fig. 18). Les résultats enregistrés chez les pupes témoins indiquent une diminution significative du taux de lipides corporels au cours du développement nymphal (0 vs 2 jours  $p < 0,01$  ; 0 vs 3 jours  $p < 0,001$  ; 1 vs 3 jours  $p < 0,01$ ). Pour les séries traitées, le spiromésifène réduit de manière significative la teneur en lipides totaux des pupes à tous les âges au cours du développement nymphal et ceci de façon dose-dépendante. L'analyse de la variance révèle des effets âge ( $F_{3, 48} = 170,7$  ;  $p < 0,001$ ) et traitement ( $F_{2, 48} = 644,1$  ;  $p < 0,001$ ) significatifs. Les taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu frais) enregistrés à 3 jours chez les pupes traitées sont de  $14,61 \pm 1,21$  pour la série témoin ;  $9,08 \pm 1,27$  pour la série traitée avec la CL<sub>10</sub> et  $5,92 \pm 0,98$  pour la série traitée avec la CL<sub>25</sub> (Tableau 13). Ainsi, une réduction significative est obtenue avec la concentration la plus élevée à tous les âges (CL<sub>25</sub>) (témoin vs CL<sub>25</sub>  $p < 0,01$  ; CL<sub>10</sub> vs CL<sub>25</sub>  $p < 0,05$ ).



**Tableau 13 :** Taux de lipides totaux corporels ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) au cours du développement nymphal de *D. melanogaster* après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n = 5$  répétitions chacune correspondant à un groupe de 4 pupes).

Traitement	Ages (jours)			
	0	1	2	3
<b>Témoins</b>	23,84 $\pm$ 0,65 <b>a</b> A	20,03 $\pm$ 0,39 <b>b</b> A	17,01 $\pm$ 0,17 <b>c</b> A	14,61 $\pm$ 0,54 <b>d</b> A
<b>CL<sub>10</sub></b>	15,01 $\pm$ 0,32 <b>a</b> B	12,60 $\pm$ 0,16 <b>b</b> B	10,98 $\pm$ 0,44 <b>bc</b> B	9,08 $\pm$ 0,57 <b>c</b> B
<b>CL<sub>25</sub></b>	12,17 $\pm$ 0,35 <b>a</b> C	9,38 $\pm$ 0,13 <b>b</b> C	8,65 $\pm$ 0,12 <b>bc</b> C	5,92 $\pm$ 0,44 <b>c</b> C

Pour un même traitement, les moyennes suivies d’une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même âge, les moyennes suivies d’une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).



**Figure 18.** Evolution du taux de lipides totaux corporels ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) au cours du développement nymphal de *D. melanogaster* après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n = 5$  répétitions de 4 pupes chacune) ; pour un même âge, les moyennes suivies d’une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ .





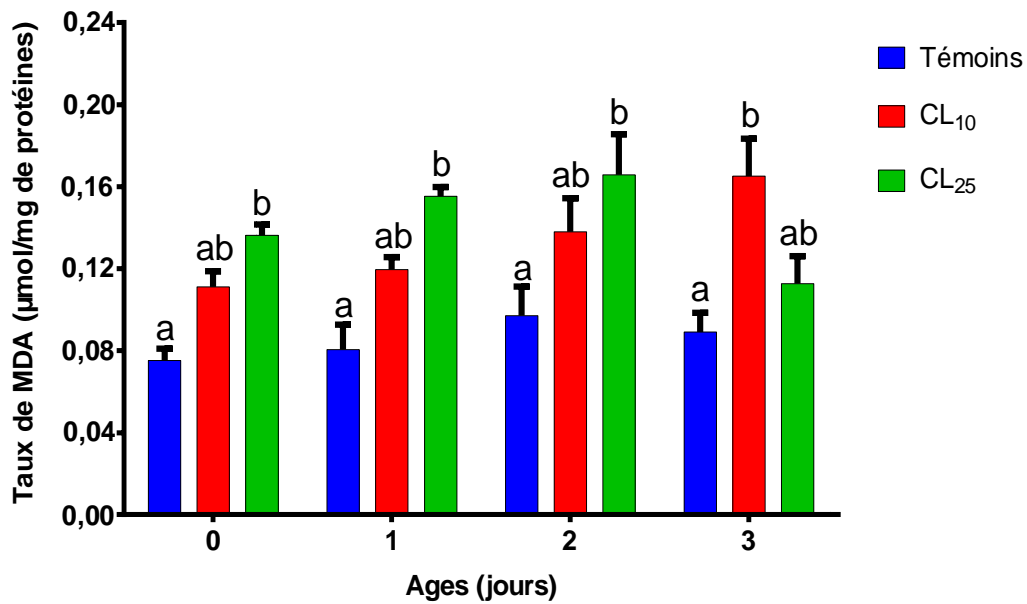
### 3.3.2. Effets sur le taux de malondialdéhyde

Les taux de malondialdéhyde (MDA), un biomarqueur de la peroxydation lipidique, ont été déterminés chez les séries témoins et traitées au cours du développement nymphal selon la méthode de [Draper et Hadley \(1990\)](#). Les résultats sont représentés dans le tableau 14 et la figure 19. Chez les témoins, le taux de MDA ne varie pas significativement ( $p > 0,05$ ) au cours du temps, tandis que les résultats obtenus chez les séries traitées montrent une augmentation significative à 0 jour avec la CL<sub>25</sub> ( $p > 0,05$ ). Au 1er jour les taux continuent à augmenter d'une manière très significative ( $p < 0,01$ ) avec la CL<sub>25</sub>. Puis diminue de manière non significative ( $p > 0,05$ ) au 2ème jour pour finalement se stabiliser aux 3èmes jours. L'analyse de la variance montre un effet traitement très significatif ( $F_{2,48} = 25,05$ ;  $p < 0,01$ ) ; les résultats indiquent également une différence significative chez la série traitée (CL<sub>25</sub>) entre les pupes âgées d'un jour et celles âgées de 3 jours.

**Tableau 14 :** Taux de MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les pupes de *D. melanogaster* après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n = 5$  répétitions, chacune correspondant à un groupe de 4 pupes).

Traitement	Ages (jours)			
	0	1	2	3
Témoin	0,075 $\pm$ 0,005 <b>a</b> <b>A</b>	0,080 $\pm$ 0,012 <b>a</b> <b>A</b>	0,096 $\pm$ 0,014 <b>a</b> <b>A</b>	0,089 $\pm$ 0,011 <b>a</b> <b>A</b>
CL <sub>10</sub>	0,111 $\pm$ 0,007 <b>a</b> <b>AB</b>	0,119 $\pm$ 0,006 <b>a</b> <b>AB</b>	0,138 $\pm$ 0,016 <b>a</b> <b>AB</b>	0,165 $\pm$ 0,018 <b>a</b> <b>B</b>
CL <sub>25</sub>	0,136 $\pm$ 0,008 <b>a</b> <b>B</b>	0,155 $\pm$ 0,004 <b>a</b> <b>B</b>	0,165 $\pm$ 0,019 <b>a</b> <b>B</b>	0,112 $\pm$ 0,022 <b>a</b> <b>AB</b>

Pour un même traitement, les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même âge, les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).



**Figure 19.** Effet du spiromésifène sur le taux de MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) au cours du développement nymphal de *D. melanogaster* après traitement par application topique des larves L3 ( $m \pm \text{SEM}$ ;  $n = 5$  répétitions de 4 pupes chacune) ; pour un même âge, les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ .

### 3.3.3. Effet sur les acides gras corporels

Les teneurs en AGs ont été déterminées chez les mouches survivant à une exposition pré-imaginale au spiromésifène (Fig. 20 et Tableaux 15 et 16). Parmi les neuf AGs détectés chez les adultes mâles et femelles, quatre étaient saturés (AGS ; C12:0, C14:0, C16:0, C18:0), trois étaient monoinsaturés (AGMIS ; C14:1n-5, C16:1n-7, C18:1n-9), et deux étaient polyinsaturés (AGPIS ; 18:2n-6, 18:3n-3). Les résultats spectraux CG/SM ont montré que les femelles contiennent des quantités plus élevées d'AG que les mâles. Quatre AGs majeurs ont été identifiés chez les adultes témoins et traités : C16:1n-7, C14:0, C18:1n-9, C16:0. Chez les femelles, les traitements au spiromésifène ont affecté la quantité totale d'AG avec un effet dose-dépendant significatif ( $F_{5, 48} = 75,79$ ;  $p < 0,001$ ). Chez les femelles traitées avec 1 et 10  $\mu\text{g}/\text{g}$ , la quantité moyenne d'AG détectés par femelle était de 6473 ng et 3211 ng, respectivement. En comparaison, les femelles témoins ont produit 7051 ng d'AG (fig. 19A). Par conséquent, la quantité totale d'AG a diminué jusqu'à  $> 50\%$  de la quantité témoin chez les femelles traitées avec la concentration la plus élevée. Six AGs ont été affectés : C12:0, C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:2n-6 (tableau 15). Des résultats similaires ont été retrouvés chez les mâles : la quantité totale d'AG a également été réduite par tous les traitements au spiromésifène ( $F_{5, 48} = 43,08$  ;  $p < 0,001$ ). Les valeurs moyennes enregistrées

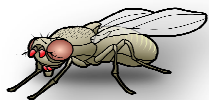


sont de 3488 ng/mâle pour les témoins, 2937 ng/mâle pour la concentration la plus faible (1µg/g) et 1629 ng/mâle pour la concentration la plus élevée (10 µg/g ; fig. 19B). Six AGs ont été affectés chez les mâles : C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 (tab. 16).

**Tableau 15.** Effets du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal sur les acides gras des femelles *D. melanogaster* (m ± SEM ; n = 10 répétitions ; Total AGs = Total des acides gras ; AGS = acide gras saturé ; AGIS = acide gras insaturé).

Acide gras	Témoins	1 µg/g	2.5 µg/g	5 µg/g	7.5 µg/g	10 µg/g
<b>C12:0</b>	423±17.21a	439±16.39a	421±17.29a	404±14.42a	334±18.19a	206±10.45b
<b>C14:0</b>	1471±69.14a	1302±62.35b	1419±41.41a	1361±45.74ab	1056±62.50c	643±43.72d
<b>C14:1n-5</b>	83±5.34a	84±3.15a	81±2.83a	89±5.44a	72±5.85a	36±2.63a
<b>C16:0</b>	1283±46.35a	1101±25.83b	1059±18.29bc	984±20.28c	743±15.55d	604±24.22e
<b>C16:1n-7</b>	1679±60.24a	1608±41.61ab	1512±42.08bc	1472±24.90c	1181±50.13d	736±26.41e
<b>C18:0</b>	129±8.95a	101±2.36a	85±3.57a	79±2.66a	74±4.47a	65±3.74a
<b>C18:1n-9</b>	1336±29.09a	1210±32.41b	960±37.44c	963±29.07c	750±15.82d	593±21.11e
<b>C18:2n-6</b>	607±7.93a	585±12.38a	450±14.63b	453±12.53b	379±17.63bc	311±13.99c
<b>C18:3n-3</b>	39±1.54a	43±1.02a	21±0.99a	22±0.73a	21±1.28a	19±0.90a
<b>Total AGs</b>	7050±229.30a	6473±181.6ab	6008±150b	5827±131.60b	4610±140.40c	3213±107.50d
<b>AGS</b>	3306±138.00a	2943±98.89b	2984±67.62ab	2828±77.84b	2207±88.39c	1518±60.25d
<b>AGIS</b>	3744±99.81a	3530±86.70a	3024±87.89b	2999±62.18b	2403±55.61c	1695±52.32d

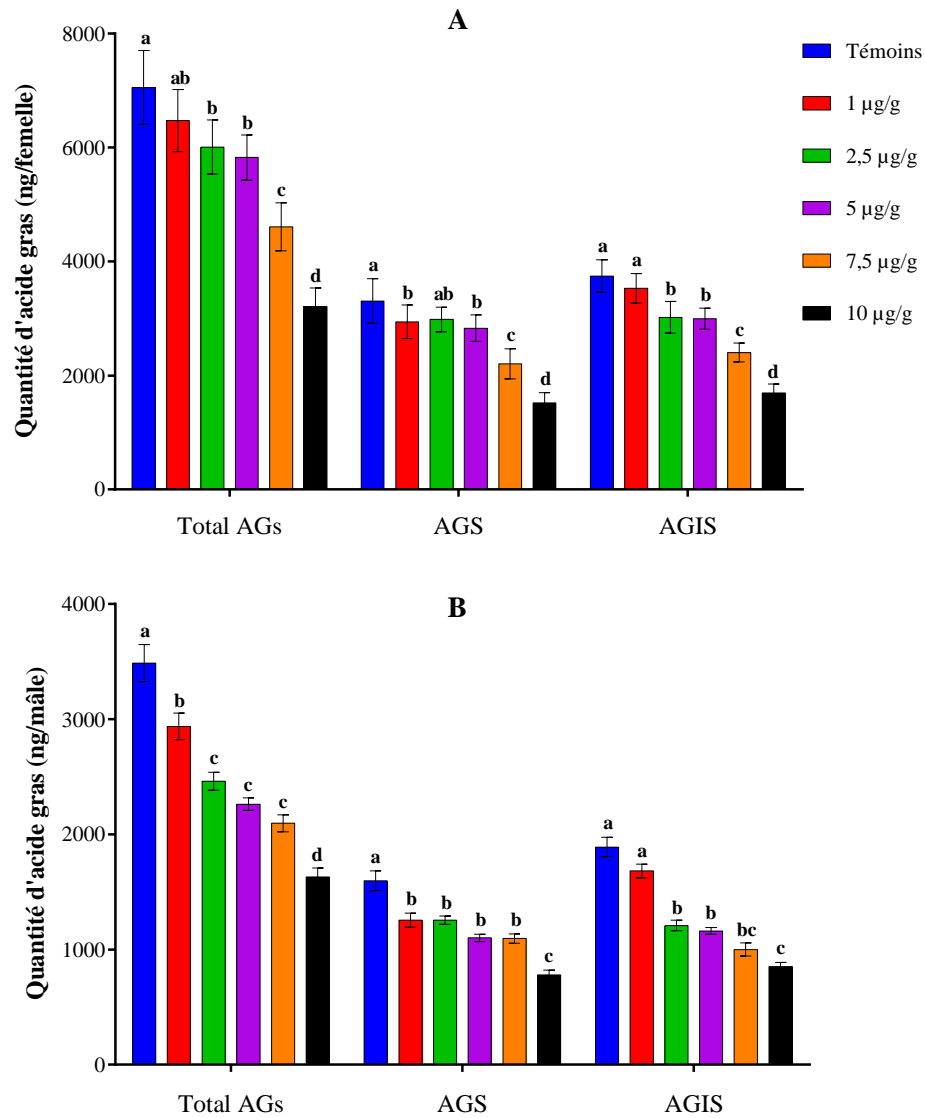
Pour le même acide gras, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p < 0,05.



**Tableau 16.** Effets du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au cours du développement pré-imaginal sur les acides gras des mâles *D. melanogaster* ( $m \pm SEM$  ;  $n = 10$  répétitions ; Total AGs = Total des acides gras ; AGS = acides gras saturés ; AGIS = acides gras insaturés).

	Témoins	1 $\mu\text{g/g}$	2.5 $\mu\text{g/g}$	5 $\mu\text{g/g}$	7.5 $\mu\text{g/g}$	10 $\mu\text{g/g}$
<b>C12:0</b>	159 $\pm$ 7.89a	139 $\pm$ 8.62a	145 $\pm$ 8.48a	145 $\pm$ 9.50a	145 $\pm$ 7.26a	118 $\pm$ 11.52a
<b>C14:0</b>	696 $\pm$ 34.80a	592 $\pm$ 35.14bc	654 $\pm$ 20.91ab	573 $\pm$ 18.96c	544 $\pm$ 21.25c	376 $\pm$ 32.56d
<b>C14:1n-5</b>	41 $\pm$ 2.34a	37 $\pm$ 3.18a	38 $\pm$ 2.61a	33 $\pm$ 4.70a	30 $\pm$ 4.59a	23 $\pm$ 2.62a
<b>C16:0</b>	608 $\pm$ 38.30a	469 $\pm$ 20.12b	427 $\pm$ 12.24bc	353 $\pm$ 9.70c	369 $\pm$ 12.50c	253 $\pm$ 9.37c
<b>C16:1n-7</b>	842 $\pm$ 38.08a	722 $\pm$ 33.39b	655 $\pm$ 18.66bc	596 $\pm$ 14.12c	494 $\pm$ 51.72d	388 $\pm$ 24.07e
<b>C18:0</b>	135 $\pm$ 42.48a	55 $\pm$ 2.50b	27 $\pm$ 2.21b	30 $\pm$ 2.66b	38 $\pm$ 3.82b	32 $\pm$ 2.91b
<b>C18:1n-9</b>	617 $\pm$ 26.39a	536 $\pm$ 20.84b	300 $\pm$ 15.89c	292 $\pm$ 11.96c	287 $\pm$ 10.99c	245 $\pm$ 10.82c
<b>C18:2n-6</b>	366 $\pm$ 22.35a	361 $\pm$ 13.64a	207 $\pm$ 12.09b	231 $\pm$ 9.02b	181 $\pm$ 10.77b	179 $\pm$ 13.35b
<b>C18:3n-3</b>	25 $\pm$ 1.88 a	26 $\pm$ 1.23a	10 $\pm$ 1.11a	11 $\pm$ 1.61a	8 $\pm$ 1.10a	16 $\pm$ 0.65a
<b>Total AGs</b>	3489 $\pm$ 161.10a	2937 $\pm$ 114.50b	2463 $\pm$ 77.21c	2264 $\pm$ 55.10c	2096 $\pm$ 74.57c	1630 $\pm$ 80.07d
<b>AGS</b>	1597 $\pm$ 85.77a	1255 $\pm$ 61.35b	1254 $\pm$ 35.84b	1102 $\pm$ 31.75b	1095 $\pm$ 39.91b	779 $\pm$ 44.61c
<b>AGIS</b>	1892 $\pm$ 83.50a	1682 $\pm$ 59.59a	1209 $\pm$ 46.04b	1162 $\pm$ 28.37b	1001 $\pm$ 58bc	851 $\pm$ 37.51c

Pour le même acide gras, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$ .



**Figure 20.** Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact, à différentes concentrations au stade pré-imaginal de *D. melanogaster*, sur la quantité d'acides gras chez les adultes femelles (A) et mâles (B) ( $m \pm SEM$  ;  $n = 10$  répétitions ; Total AGs = Total des acides gras ; AGS = acide gras saturé ; AGIS = acide gras insaturé). Pour un même acide gras, les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$ .



### 3.3.4. Effets sur les hydrocarbures cuticulaires

L'analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG) des extraits hexaniques d'adultes femelles et mâles a révélé la présence de 30 et 20 composés, respectivement (Tableaux 17 et 18). Le profil des hydrocarbures cuticulaires (HCs) des mouches témoins présente un dimorphisme sexuel car les femelles synthétisent abondamment des composés bi-insaturés (diènes) alors que les mâles produisent beaucoup plus d'HCs mono-insaturés (monoènes) que les femelles. Chez les mâles *D. melanogaster*, les principaux composés sont le (Z) -7-tricosène (7-T) tandis que leurs femelles produisent majoritairement du (Z, Z) -7, 11-heptacosadiène (7,11-HD).

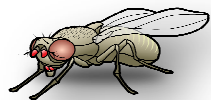
Nos données montrent que le traitement au spiromésifène affecte les quantités totales de HCs chez les deux sexes. Les femelles traitées ont montré une diminution des quantités totales d'HC avec un effet dose-dépendant ( $F_{5, 84} = 88,23$  ;  $p < 0,001$ ) (2016 ng/femelle et 1151 ng/femelle pour les séries traitées à 1 et 10  $\mu\text{g/g}$ , respectivement), par rapport aux femelles témoins (2128 ng/femelle) (Fig. 21A). Les comparaisons entre les femelles témoins et traitées ont également révélé des différences significatives pour douze HCs: 7,11TD, C23, 9,13PD, 7,11PD, 5,9PD, 25Br, 9P, 7,11HD, 27Br, 7H, 7,11ND et 29Br ( $F_{5, 54} = 78,55$ ;  $p < 0,001$ ) (Tableau 17). D'autres différences significatives ont également été observées entre les mâles témoins et traités au niveau des quantités totales d'HC diminuant entre 2066 ng/mâle (pour les témoins) et 1841 ng/mâle et 1013 ng/mâle pour la concentration la plus faible (1  $\mu\text{g/g}$ ) et la concentration la plus élevée (10  $\mu\text{g/g}$ ) (Fig. 21B), respectivement. Sept HCs ont été clairement affectés : 9T, 7T, 5T, C23, 25Br, 7P, 27Br (Tableau 18).



**Tableau 17.** Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations, au stade pré-imaginal chez *D.melanogaster* sur les hydrocarbures cuticulaires des femelles (moyenne  $\pm$  SEM ; n = 15 répétitions ; ng/femelles).

Composés	Témoins	1 $\mu$ g/g	2.5 $\mu$ g/g	5 $\mu$ g/g	7.5 $\mu$ g/g	10 $\mu$ g/g
C21	12 $\pm$ 0.48a	10 $\pm$ 0.28a	9 $\pm$ 0.58a	10 $\pm$ 0.64a	7 $\pm$ 0.38a	5 $\pm$ 0.48a
C22	5 $\pm$ 0.18a	5 $\pm$ 0.08a	4 $\pm$ 0.34a	5 $\pm$ 0.28a	4 $\pm$ 0.24a	4 $\pm$ 0.20a
7,11 TD	32 $\pm$ 1.78a	28 $\pm$ 1.22ab	25 $\pm$ 2.00ab	17 $\pm$ 2.31ac	12 $\pm$ 1.69bc	7 $\pm$ 0.88c
23Br	14 $\pm$ 0.41a	12 $\pm$ 0.68a	10 $\pm$ 0.87a	8 $\pm$ 0.84a	4 $\pm$ 0.89a	1 $\pm$ 0.19a
9T	8 $\pm$ 0.67a	7 $\pm$ 0.46a	6 $\pm$ 0.53a	5 $\pm$ 0.38a	4 $\pm$ 0.28a	3 $\pm$ 0.20a
7T	28 $\pm$ 1.80a	24 $\pm$ 0.99a	20 $\pm$ 1.07a	20 $\pm$ 0.53a	15 $\pm$ 0.84a	18 $\pm$ 4.25a
5T	18 $\pm$ 9.54a	9 $\pm$ 3.09a	5 $\pm$ 0.20a	5 $\pm$ 0.30a	5 $\pm$ 0.17a	4 $\pm$ 0.14a
C23	114 $\pm$ 8.92a	114 $\pm$ 3.37a	111 $\pm$ 4.49a	115 $\pm$ 4.54a	97 $\pm$ 4.30ab	82 $\pm$ 4.78b
C24	6 $\pm$ 1.15a	5 $\pm$ 0.38a	4 $\pm$ 0.22a	8 $\pm$ 1.39a	5 $\pm$ 0.32a	5 $\pm$ 0.46a
9,13 PD	40 $\pm$ 14.07ac	24 $\pm$ 4.63ab	17 $\pm$ 0.75b	45 $\pm$ 13.00c	11 $\pm$ 0.57b	13 $\pm$ 4.46b
7,11 PD	95 $\pm$ 4.00a	76 $\pm$ 4.37b	64 $\pm$ 5.21b	64 $\pm$ 3.38b	45 $\pm$ 3.02c	36 $\pm$ 3.23c
5,9 PD	49 $\pm$ 2.04a	39 $\pm$ 2.22ab	33 $\pm$ 2.65abc	33 $\pm$ 1.72abc	23 $\pm$ 1.54bc	18 $\pm$ 1.64c
25Br	36 $\pm$ 1.51a	29 $\pm$ 1.65ab	24 $\pm$ 1.96ab	24 $\pm$ 1.27ab	17 $\pm$ 1.14b	14 $\pm$ 1.21b
9p	86 $\pm$ 4.79a	80 $\pm$ 3.09a	68 $\pm$ 2.87ab	57 $\pm$ 2.59bc	46 $\pm$ 2.01c	42 $\pm$ 3.34c
7P	23 $\pm$ 2.02a	19 $\pm$ 0.96a	16 $\pm$ 0.95a	12 $\pm$ 0.82a	12 $\pm$ 1.12a	12 $\pm$ 2.31a
5P	4 $\pm$ 0.17a	4 $\pm$ 0.20a	3 $\pm$ 0.09a	3 $\pm$ 0.22a	3 $\pm$ 0.22a	3 $\pm$ 0.33a
C25	61 $\pm$ 1.77a	64 $\pm$ 2.19a	67 $\pm$ 3.04a	59 $\pm$ 3.79a	57 $\pm$ 3.61a	55 $\pm$ 3.58a
9,13HD	16 $\pm$ 0.92a	16 $\pm$ 0.77a	15 $\pm$ 0.85a	11 $\pm$ 1.01a	9 $\pm$ 0.50a	7 $\pm$ 0.61a
7,11HD	762 $\pm$ 18.28a	726 $\pm$ 14.29b	678 $\pm$ 17.22c	571 $\pm$ 21.86d	466 $\pm$ 12.86e	393 $\pm$ 13.70f
27Br	261 $\pm$ 6.26a	249 $\pm$ 4.89ab	232 $\pm$ 5.90b	195 $\pm$ 7.48c	160 $\pm$ 4.40d	135 $\pm$ 4.69e
5,9HD	21 $\pm$ 0.50a	20 $\pm$ 0.39a	19 $\pm$ 0.47a	16 $\pm$ 0.59a	13 $\pm$ 0.35a	11 $\pm$ 0.37a
7H	51 $\pm$ 1.57a	55 $\pm$ 3.11a	58 $\pm$ 3.32a	48 $\pm$ 3.82ab	42 $\pm$ 2.95ab	33 $\pm$ 3.48b
C27	19 $\pm$ 0.89a	19 $\pm$ 0.90a	21 $\pm$ 1.42a	19 $\pm$ 1.32a	21 $\pm$ 1.79a	20 $\pm$ 2.06a
C28	10 $\pm$ 0.53a	10 $\pm$ 0.32a	11 $\pm$ 1.76a	8 $\pm$ 0.32a	7 $\pm$ 0.41a	8 $\pm$ 0.96a
9,13ND	10 $\pm$ 0.43a	8 $\pm$ 0.41a	9 $\pm$ 0.44a	4 $\pm$ 0.54a	5 $\pm$ 0.27a	4 $\pm$ 0.34a
7,11ND	207 $\pm$ 9.47a	220 $\pm$ 8.27a	221 $\pm$ 9.59a	158 $\pm$ 8.10b	154 $\pm$ 7.80b	133 $\pm$ 10.95c
29Br	112 $\pm$ 5.10a	118 $\pm$ 4.45a	119 $\pm$ 5.16a	85 $\pm$ 4.36b	83 $\pm$ 4.20b	71 $\pm$ 5.89b
7N	2 $\pm$ 0.21a	2 $\pm$ 0.13a	2 $\pm$ 0.14a	1 $\pm$ 0.12a	1 $\pm$ 0.23a	1 $\pm$ 0.14a
C29	5 $\pm$ 0.17a	5 $\pm$ 0.10a	4 $\pm$ 0.15a	4 $\pm$ 0.17a	4 $\pm$ 0.25a	3 $\pm$ 0.24a
31Br	21 $\pm$ 1.87a	19 $\pm$ 1.07a	17 $\pm$ 2.03a	18 $\pm$ 1.80a	10 $\pm$ 1.06a	10 $\pm$ 0.70a
Total HC	2128 $\pm$ 56.32a	2016 $\pm$ 36.83ab	1892 $\pm$ 40.20b	1628 $\pm$ 41.21c	1342 $\pm$ 33.74d	1151 $\pm$ 35.15e
Désaturés	1455 $\pm$ 47.86a	1359 $\pm$ 27.76b	1257 $\pm$ 28.24c	1071 $\pm$ 27.33d	867 $\pm$ 21.80e	738 $\pm$ 23.11f
Linaires	230 $\pm$ 8.86a	231 $\pm$ 5.35a	232 $\pm$ 7.65a	227 $\pm$ 8.42a	201 $\pm$ 9.02a	182 $\pm$ 8.23a
Ramifiés	443 $\pm$ 10.43a	426 $\pm$ 7.63a	403 $\pm$ 8.68ab	330 $\pm$ 9.75bc	274 $\pm$ 6.92cd	231 $\pm$ 8.43d

Pour un même hydrocarbure cuticulaire, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à p<0,05

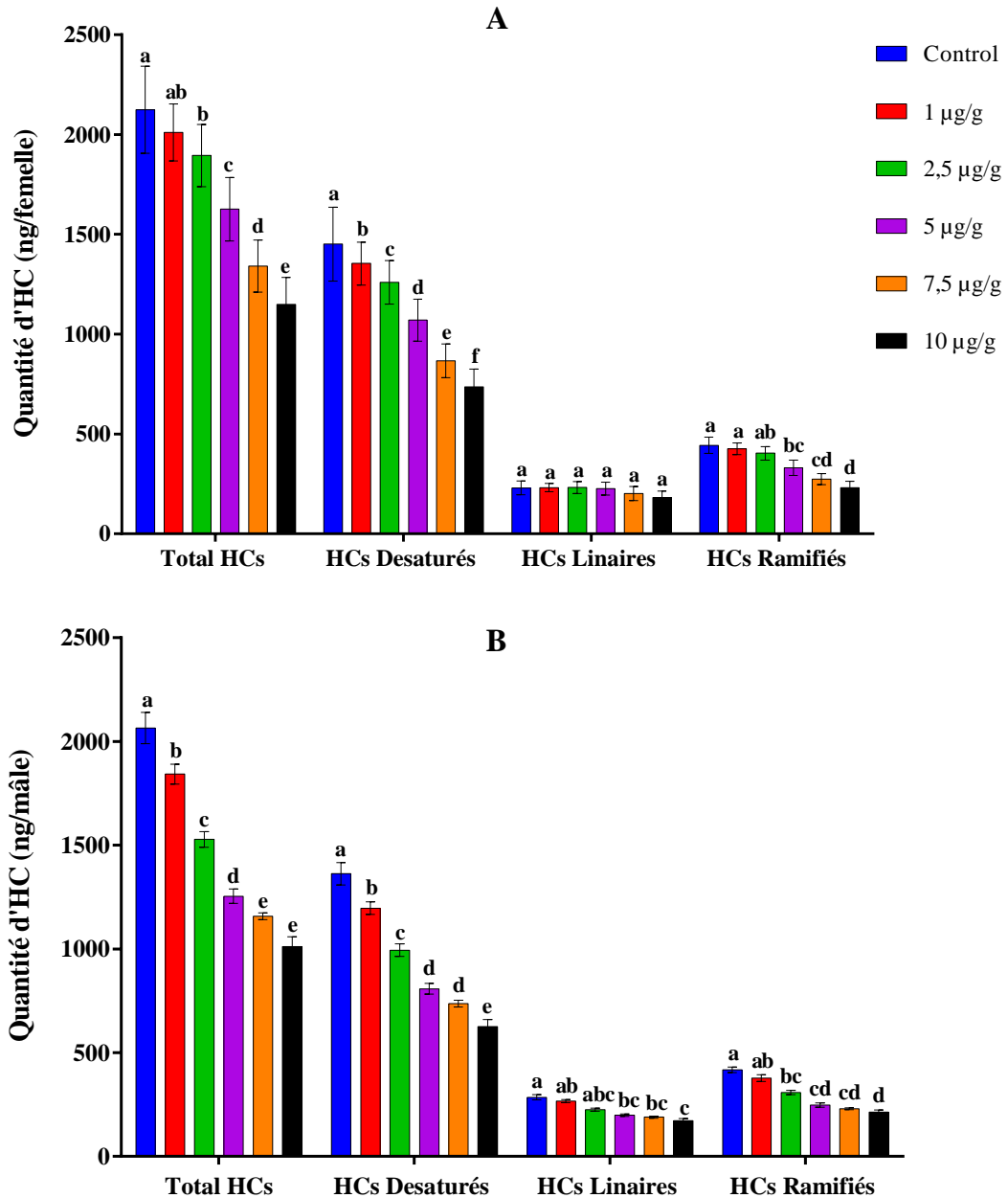


**Tableau 18.** Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations, au stade pré-imaginal chez *D.melanogaster* sur les hydrocarbures cuticulaires des mâles ( $m \pm SEM$  ;  $n = 15$  répétitions ; ng/mâles).

Composés	Témoins	1µg/g	2.5µg/g	5µg/g	7.5µg/g	10µg/g
<b>C21</b>	36±3.38	37±4.13a	23±2.24a	20±1.70a	21±1.97a	15±1.37a
<b>7D</b>	12±0.86a	11±0.75a	9±0.50a	8±0.36a	7±0.40a	6±0.33a
<b>Cva</b>	183±45.28a	94±19.04b	57±18.17bc	27±9.54c	45±14.14c	44±13.04c
<b>C22</b>	11±0.46a	12±1.34a	9±0.38a	8±0.32a	7±0.31a	7±0.37a
<b>23Br</b>	13±0.75a	14±1.63a	8±0.72a	5±0.61a	5±0.25a	5±0.40a
<b>9T</b>	84±5.59a	66±4.10ab	51±3.57ab	39±2.41b	34±1.30b	29±1.48b
<b>7T</b>	901±47.52a	794±41.63b	688±24.45c	562±21.16d	523±24.37d	418±25.46 <sup>e</sup>
<b>5T</b>	76±4.26a	74±2.62ab	56±2.63ab	45±2.13ab	42±1.35ab	33±2.60b
<b>C23</b>	206±10.94a	182±6.22ab	165±6.19abc	143±5.62bc	138±4.84c	125±6.55c
<b>25Br</b>	156±12.21a	135±12.23ab	113±9.72b	61±8.02c	57±3.43c	56±5.49c
<b>9p</b>	38±3.91a	29±3.00a	27±3.32a	19±1.44a	14±1.06a	17±1.44a
<b>7P</b>	240±32.61a	208±22.50a	157±15.31b	129±14.28bc	112±12.68c	116±12.87bc
<b>5P</b>	8±1.96a	8±1.10a	5±0.42a	4±0.36a	4±0.34a	4±0.35a
<b>C25</b>	24±1.48a	25±1.81a	22±1.07a	20±1.19a	18±1.01a	18±1.07a
<b>27Br</b>	178±7.31a	159±9.18ab	126±4.33bc	117±2.94c	114±3.94c	102±4.31c
<b>7H</b>	3±0.50a	6±0.81a	3±0.26a	2±0.17a	2±0.17a	2±0.21a
<b>C27</b>	7±0.88a	9±1.36a	6±0.75a	6±0.68a	5±0.25a	6±0.61a
<b>29Br</b>	62±5.11a	62±1.81a	52±4.49a	56±5.25a	47±1.99a	45±4.03a
<b>C29</b>	2±0.26a	2±0.14a	2±0.06a	2±0.15a	2±0.06a	2±0.12a
<b>31Br</b>	9±0.77a	8±0.62a	9±1.23a	9±1.26a	7±0.42a	7±0.48a
<b>Total HC</b>	2066±74.97a	1841±48.17b	1531±37.22c	1255±34.08d	1159±16.30de	1013±47.02e
<b>Désaturés</b>	1364±53.57a	1196±29.52b	995±30.09c	808±25.71d	739±16.59d	626±35.43e
<b>Linaires</b>	285±12.77a	267±7.05ab	227±7.36abc	199±6.35bc	190±5.27bc	173±8.70c
<b>Ramifiés</b>	417±13.71a	378±16.63ab	309±10.43bc	248±10.18cd	230±4.18cd	214±10.08d

Pour un même hydrocarbure cuticulaire, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$ .





**Figure 21.** Effet du spiromésifène administré par ingestion, à différentes concentrations, au stade pré-imaginal de *D. melanogaster*, sur la quantité d'hydrocarbures cuticulaires chez les femelles (A) et les mâles (B) ( $m \pm SEM$  ;  $n = 15$  répétitions). Pour un même groupe d'hydrocarbures cuticulaires, les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$ .



### 3.4. Effet sur le poids et la composition biochimique des ovaires

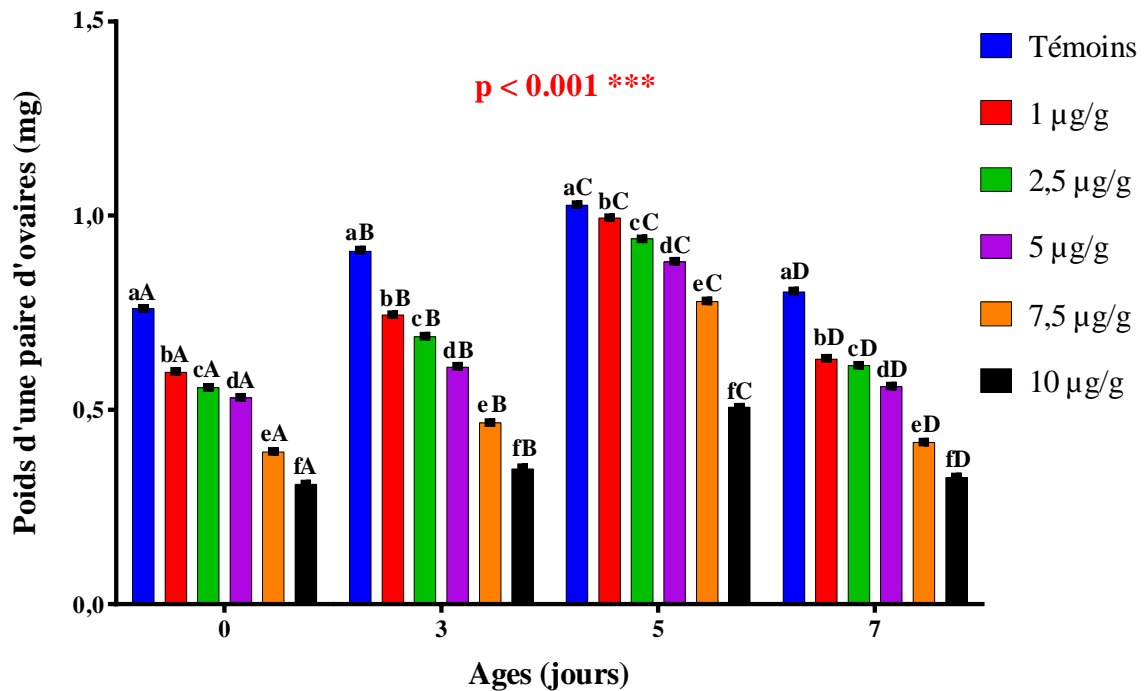
#### 3.4.1. Effets sur le poids des ovaires

Les variations du poids des ovaires chez les séries témoins et traitées sont représentées dans le tableau 19 et la figure 22. Chez les séries témoins, le poids frais des ovaires augmente progressivement durant la maturité sexuelle d'une manière hautement significative jusqu'à 5 jours ( $p < 0,001$ ) puis diminue par la suite (7<sup>ème</sup> jour). Cette évolution est parallèle chez les séries traitées (1, 2,5, 5, 7,5 et 10  $\mu\text{g/g}$ ) avec une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du poids des ovaires jusqu'à 5 jours puis une diminution significative dès le 7<sup>ème</sup> jour de la vie adulte. Le traitement provoque une réduction significative ( $p < 0,001$ ) du poids des ovaires à tous les âges comparativement aux témoins durant la maturation sexuelle. L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle des effets de l'âge ( $F_{3, 96} = 32606,64$ ;  $p < 0,001$ ) et du traitement au spiromésifène ( $F_{5, 96} = 28115,22$ ;  $p < 0,001$ ) hautement significatifs avec une interaction âge/traitement très significative ( $F_{15, 96} = 554,44$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tableau 19 :** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal de *D. melanogaster*, sur le poids des ovaires ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n = 5$  répétitions chacune comportant 4 paires d'ovaires).

Traitement	Âges durant la vie adulte (jours)			
	0	3	5	7
Témoin	0,76 $\pm$ 0,003 <b>a</b> <b>A</b>	0,90 $\pm$ 0,006 <b>b</b> <b>A</b>	1,02 $\pm$ 0,004 <b>c</b> <b>A</b>	0,80 $\pm$ 0,005 <b>d</b> <b>A</b>
1 $\mu\text{g/g}$	0,59 $\pm$ 0,005 <b>a</b> <b>B</b>	0,74 $\pm$ 0,002 <b>b</b> <b>B</b>	0,99 $\pm$ 0,002 <b>c</b> <b>B</b>	0,63 $\pm$ 0,004 <b>d</b> <b>B</b>
2,5 $\mu\text{g/g}$	0,55 $\pm$ 0,003 <b>a</b> <b>C</b>	0,68 $\pm$ 0,003 <b>b</b> <b>C</b>	0,94 $\pm$ 0,002 <b>c</b> <b>C</b>	0,61 $\pm$ 0,003 <b>d</b> <b>C</b>
5 $\mu\text{g/g}$	0,53 $\pm$ 0,002 <b>a</b> <b>D</b>	0,61 $\pm$ 0,007 <b>b</b> <b>D</b>	0,88 $\pm$ 0,005 <b>c</b> <b>D</b>	0,55 $\pm$ 0,005 <b>d</b> <b>D</b>
7,5 $\mu\text{g/g}$	0,46 $\pm$ 0,002 <b>a</b> <b>E</b>	0,55 $\pm$ 0,005 <b>b</b> <b>E</b>	0,77 $\pm$ 0,003 <b>c</b> <b>E</b>	0,39 $\pm$ 0,003 <b>d</b> <b>E</b>
10 $\mu\text{g/g}$	0,34 $\pm$ 0,008 <b>a</b> <b>F</b>	0,41 $\pm$ 0,002 <b>b</b> <b>F</b>	0,50 $\pm$ 0,01 <b>c</b> <b>F</b>	0,32 $\pm$ 0,003 <b>d</b> <b>F</b>

Pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).



**Figure 22.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster* sur le poids des ovaires ( $m \pm SEM$ ;  $n = 5$  répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).

### 3.4.2. Effets sur le taux des lipides ovariens

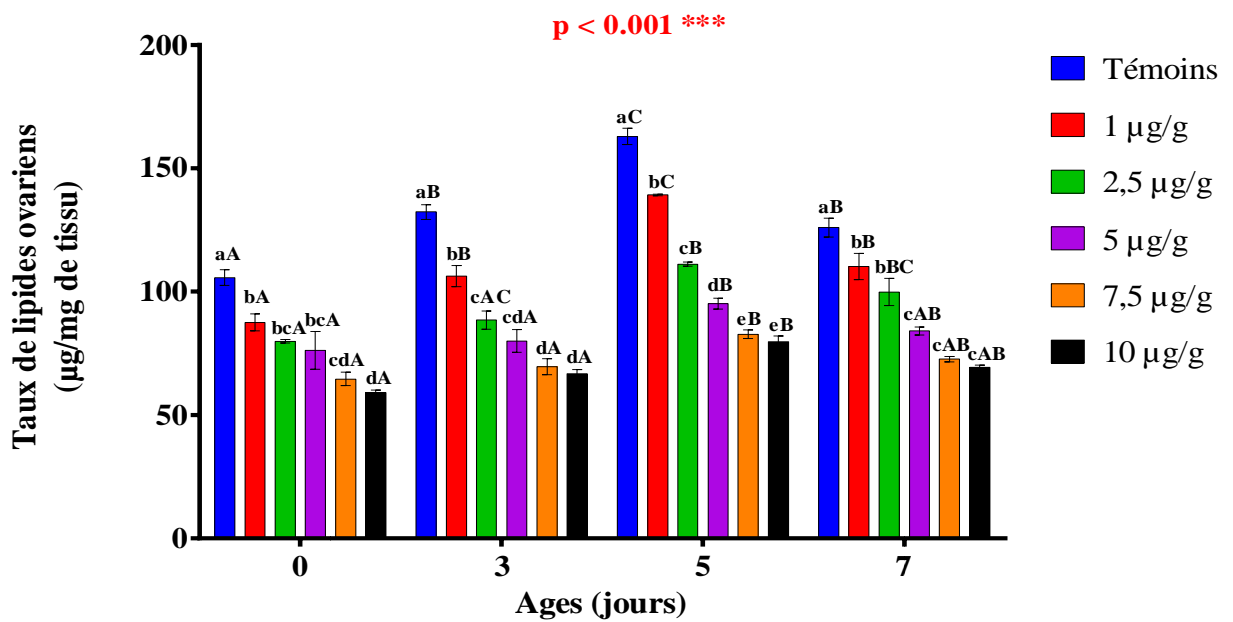
L'effet du spiromésifène a été évalué sur le taux des lipides ovariens à différents âges (0, 3, 5 et 7 jours) après administration par ingestion à différentes concentrations (1 à 10 µg/g) au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*. Au cours de la maturité sexuelle, le taux des lipides ovariens des séries témoins augmente d'une manière hautement significative entre 0 jour et 5 jours ( $p < 0,001$ ) puis décroît dès le 7<sup>ème</sup> jour. Cette évolution est parallèle chez les séries traitées. Le traitement provoque une réduction significative ( $p < 0,001$ ) du taux de lipides à tous les âges comparativement aux témoins (Tableau 20, Fig. 23). L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle des effets de l'âge ( $F_{3, 96} = 99,96$ ;  $p < 0,001$ ) et du traitement ( $F_{5, 96} = 208,27$ ;  $p < 0,001$ ) hautement significatifs avec une interaction âge/traitement très significative ( $F_{15, 96} = 5,02$ ;  $p < 0,001$ ).



**Tableau 20 :** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*, sur le taux des lipides ovariens ( $m \pm SEM$  ;  $n = 5$  répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires).

Traitement	Ages durant la vie adulte (jours)			
	0	3	5	7
<b>Témoin</b>	105,73 $\pm$ 3,21 <b>a</b> <b>A</b>	132,28 $\pm$ 2,94 <b>b</b> <b>A</b>	162,86 $\pm$ 3,32 <b>c</b> <b>A</b>	125,96 $\pm$ 3,83 <b>b</b> <b>A</b>
<b>1 <math>\mu\text{g/g}</math></b>	87,53 $\pm$ 3,42 <b>a</b> <b>B</b>	106,29 $\pm$ 4,32 <b>b</b> <b>B</b>	139,17 $\pm$ 3,38 <b>c</b> <b>B</b>	110,17 $\pm$ 5,27 <b>b</b> <b>B</b>
<b>2,5 <math>\mu\text{g/g}</math></b>	79,86 $\pm$ 3,69 <b>a</b> <b>BC</b>	88,48 $\pm$ 3,72 <b>ac</b> <b>C</b>	111,19 $\pm$ 3,84 <b>b</b> <b>C</b>	99,83 $\pm$ 5,55 <b>bc</b> <b>B</b>
<b>5 <math>\mu\text{g/g}</math></b>	76,24 $\pm$ 3,64 <b>a</b> <b>BC</b>	83,00 $\pm$ 4,64 <b>a</b> <b>CD</b>	95,19 $\pm$ 2,22 <b>b</b> <b>D</b>	85,07 $\pm$ 1,66 <b>ab</b> <b>C</b>
<b>7,5 <math>\mu\text{g/g}</math></b>	64,58 $\pm$ 2,73 <b>a</b> <b>CD</b>	69,52 $\pm$ 3,29 <b>a</b> <b>D</b>	82,74 $\pm$ 1,72 <b>b</b> <b>E</b>	72,64 $\pm$ 1,06 <b>ab</b> <b>C</b>
<b>10 <math>\mu\text{g/g}</math></b>	58,97 $\pm$ 1,09 <b>a</b> <b>D</b>	66,77 $\pm$ 1,63 <b>a</b> <b>D</b>	79,77 $\pm$ 2,28 <b>b</b> <b>E</b>	69,20 $\pm$ 1,96 <b>ab</b> <b>C</b>

Pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).



**Figure 23.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster* sur les lipides ovariens ( $m \pm SEM$ ;  $n = 5$  répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires ; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).

### 3.4.3. Effets sur le taux des glucides ovariens

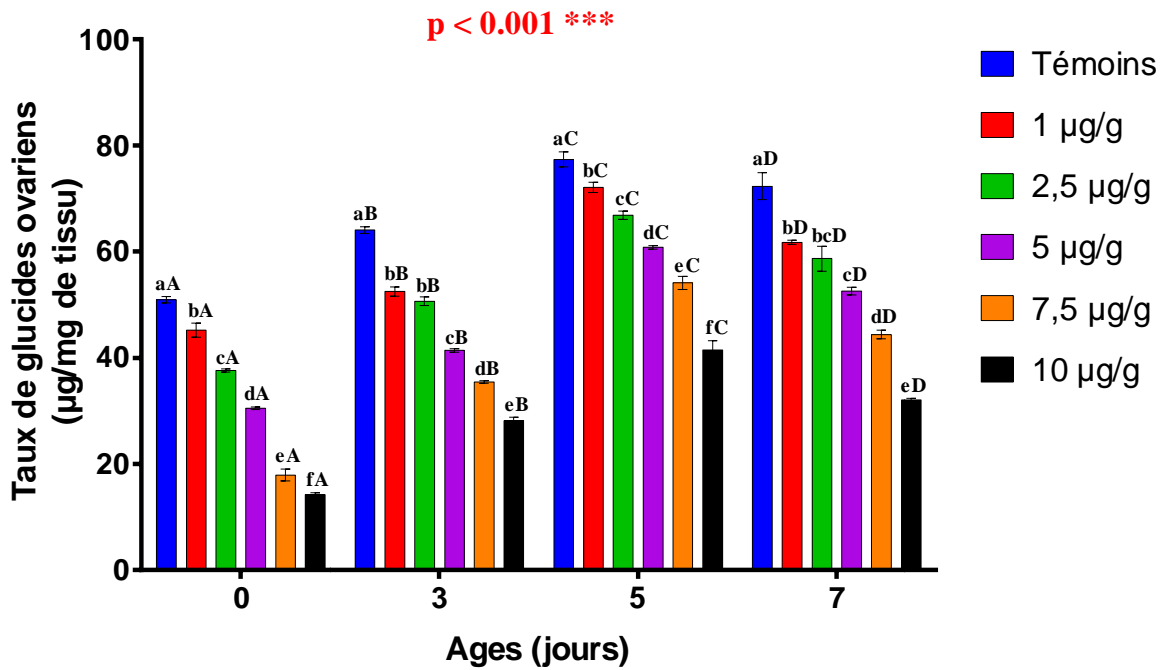
La teneur en glucides ovariens a été estimée chez les séries témoins et traitées (1, 2,5, 5, 7,5 et 10 µg/g) à différents jours au cours de la maturation sexuelle (Tableaux 21, Fig. 24). Les résultats enregistrés chez les ovaires des séries témoins indiquent une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du taux des glucides ovariens au cours de la maturité sexuelle (0 à 5 jours), par contre, ce taux diminue significativement au 7ème jour. Cette évolution est similaire chez les séries traitées. Le spiromésifène réduit de manière hautement significative ( $p < 0,001$ ) la teneur en glucides ovariens à tous les âges au cours de la maturité sexuelle et ceci de façon dose-dépendante (Tableau 21). L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle des effets de l'âge ( $F_{3, 96} = 820,19$  ;  $p < 0,001$ ) et du traitement ( $F_{5, 96} = 643,34$  ;  $p < 0,001$ ) hautement significatifs avec une interaction âge/traitement très significative ( $F_{15, 96} = 4,00$  ;  $p < 0,001$ ).



**Tableau 21** : Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster* sur le taux des glucides ovariens ( $m \pm SEM$  ;  $n = 5$  répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires).

Traitement	Âges durant la vie adulte (jours)			
	0	3	5	7
Témoïn	50,91 $\pm$ 1,36 <b>a</b> <b>A</b>	64,05 $\pm$ 1,40 <b>b</b> <b>A</b>	77,34 $\pm$ 3,16 <b>c</b> <b>A</b>	72,33 $\pm$ 5,65 <b>d</b> <b>A</b>
1 $\mu$ g/g	45,21 $\pm$ 2,98 <b>a</b> <b>B</b>	52,51 $\pm$ 1,95 <b>b</b> <b>B</b>	72,12 $\pm$ 2,15 <b>c</b> <b>B</b>	61,72 $\pm$ 3,91 <b>d</b> <b>B</b>
2,5 $\mu$ g/g	37,61 $\pm$ 3,66 <b>a</b> <b>C</b>	50,65 $\pm$ 1,86 <b>b</b> <b>B</b>	66,84 $\pm$ 1,77 <b>c</b> <b>C</b>	58,67 $\pm$ 5,19 <b>d</b> <b>BC</b>
5 $\mu$ g/g	30,47 $\pm$ 3,49 <b>a</b> <b>D</b>	41,39 $\pm$ 3,69 <b>b</b> <b>C</b>	60,79 $\pm$ 2,69 <b>c</b> <b>D</b>	52,56 $\pm$ 1,62 <b>d</b> <b>C</b>
7,5 $\mu$ g/g	17,90 $\pm$ 2,47 <b>a</b> <b>E</b>	35,44 $\pm$ 3,59 <b>b</b> <b>D</b>	54,11 $\pm$ 2,76 <b>c</b> <b>E</b>	44,39 $\pm$ 1,80 <b>d</b> <b>D</b>
10 $\mu$ g/g	14,22 $\pm$ 2,85 <b>a</b> <b>F</b>	28,09 $\pm$ 1,48 <b>b</b> <b>E</b>	41,44 $\pm$ 3,86 <b>c</b> <b>F</b>	32,07 $\pm$ 3,62 <b>d</b> <b>E</b>

Pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ .



**Figure 24.** Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster* sur les glucides ovariens ( $m \pm SEM$  ;  $n = 5$  répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires ; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).

#### 3.4.4. Effets sur le taux des protéines ovariennes

L'effet du spiromésifène a été évalué sur le taux des protéines ovariennes à différents âges (0, 3, 5 et 7 jours) après administration par ingestion à différentes concentrations (1 à 10  $\mu\text{g/g}$ ) au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*. Au cours de la maturité sexuelle, l'évolution du taux en protéines ovariennes présente une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) chez la série témoin de 0 à 5 jours, puis une baisse significative au 7ème jour. Chez les séries traitées, on remarque une même évolution des taux de protéines au cours du temps que chez les témoins on note des valeurs significativement inférieures (effet du traitement) (Tableau 22, Fig. 25). L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle des effets de l'âge ( $F_{3, 96} = 383,53$  ;  $p < 0,001$ ) et du traitement ( $F_{5, 96} = 559,77$  ;  $p < 0,001$ ) hautement significatifs avec une interaction âge/traitement très significative ( $F_{15, 96} = 11,62$  ;  $p < 0,001$ ).

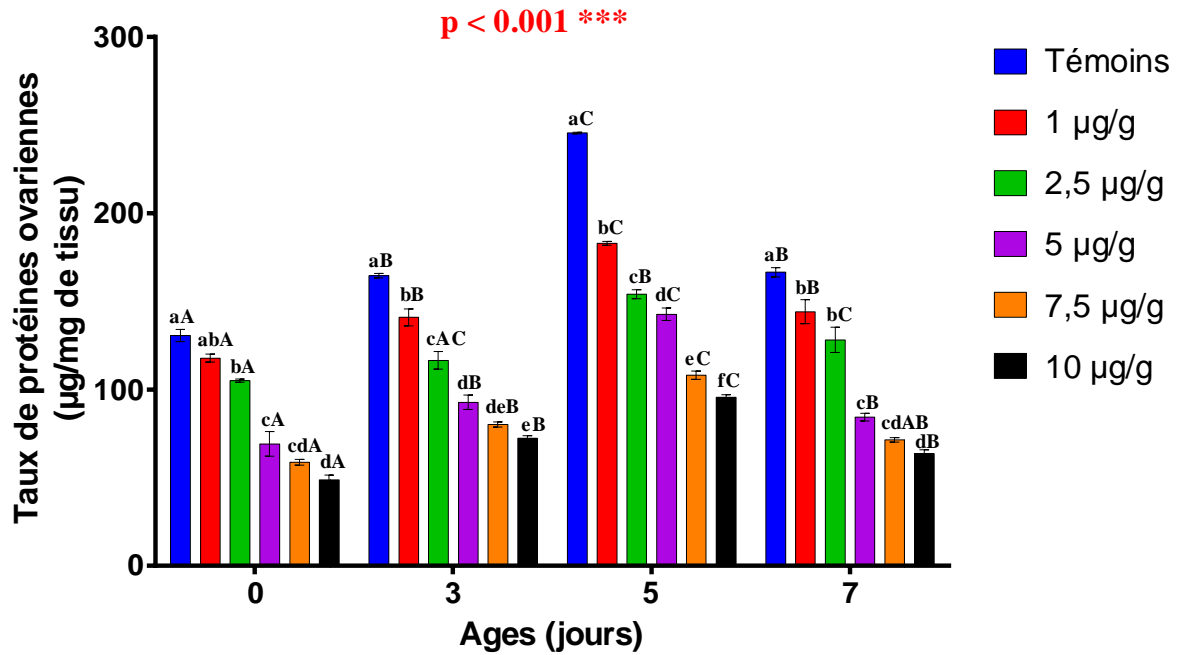


**Tableau 22** : Effet du spiromésifène administré par ingestion/contact à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster* sur le taux des protéines ovariennes ( $m \pm SEM$  ;  $n = 5$  répétitions chacune comportant 4 paires d'ovaires).

Traitement	Ages durant la vie adulte (jours)			
	0	3	5	7
<b>Témoin</b>	130,72 ± 7,60 <b>a</b> <b>A</b>	164,65 ± 2,75 <b>b</b> <b>A</b>	245,59 ± 1,17 <b>c</b> <b>A</b>	166,58 ± 5,88 <b>b</b> <b>A</b>
<b>1 µg/g</b>	117,83 ± 5,07 <b>a</b> <b>AB</b>	140,99 ± 3,63 <b>b</b> <b>B</b>	183,04 ± 2,60 <b>c</b> <b>B</b>	144,16 ± 3,17 <b>b</b> <b>B</b>
<b>2,5 µg/g</b>	105,08 ± 2,06 <b>a</b> <b>B</b>	116,61 ± 3,14 <b>c</b> <b>C</b>	154,08 ± 5,73 <b>b</b> <b>C</b>	128,22 ± 4,09 <b>c</b> <b>B</b>
<b>5 µg/g</b>	69,12 ± 5,76 <b>a</b> <b>C</b>	92,81 ± 4,31 <b>b</b> <b>D</b>	142,69 ± 3,89 <b>c</b> <b>D</b>	84,43 ± 4,86 <b>b</b> <b>C</b>
<b>7,5 µg/g</b>	58,74 ± 3,69 <b>a</b> <b>CD</b>	80,22 ± 3,12 <b>b</b> <b>DE</b>	108,18 ± 5,16 <b>c</b> <b>E</b>	71,44 ± 2,83 <b>ab</b> <b>CD</b>
<b>10 µg/g</b>	48,89 ± 5,94 <b>a</b> <b>D</b>	72,26 ± 3,71 <b>b</b> <b>E</b>	95,60 ± 3,37 <b>c</b> <b>F</b>	63,71 ± 4,74 <b>b</b> <b>D</b>

Pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).



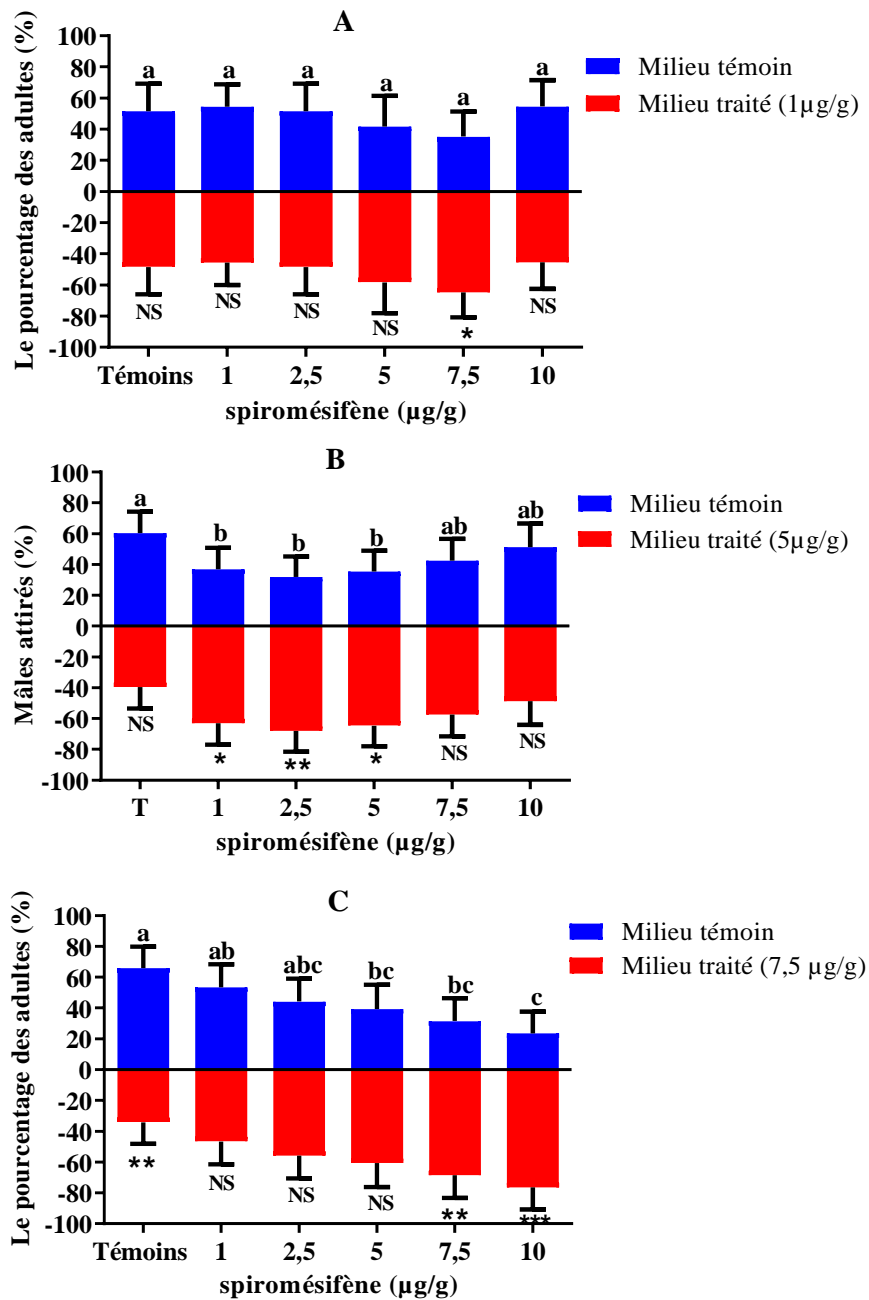


**Figure 25.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*, sur les protéines ovariennes ( $m \pm SEM$ ;  $n = 5$  répétitions, chacune comportant 4 paires d'ovaires; pour un même âge les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).

### 3.5. Effets du spiromésifène sur le comportement

#### 3.5.1. Effets sur la préférence olfactive

L'exposition pré-imaginale au spiromésifène affecte le choix olfactif des mâles *D. melanogaster* en augmentant de manière très significative leur attirance envers les milieux traités, et ce comparativement aux mâles témoins ( $p = 0,0053$ ). Les résultats obtenus montrent qu'il y a une attirance des mâles traités envers les milieux contenant 5 et 7 µg/g comparativement au milieu témoin (Khi carré;  $\chi^2 = 11,24$ ; dl = 5;  $p = 0,046$ ; Fig. 26 B, et Khi carré;  $\chi^2 = 18,60$ ; dl = 5;  $p = 0,0023$ ; Fig. 26 C, respectivement). Par contre, il n'y a pas d'effet envers le milieu avec 1 µg/g (Khi carré;  $\chi^2 = 4,17$ ; dl = 5;  $p = 0,52$ ; Fig. 26 A).

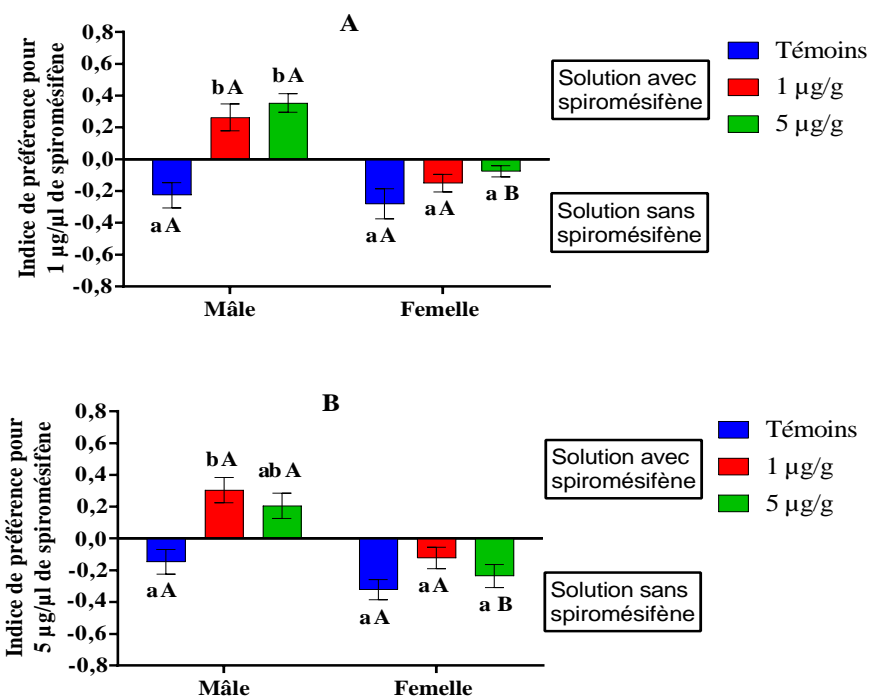


**Figure 26.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal sur la préférence olfactive des mâles de *D. melanogaster*. **A** : Milieu témoin vs Milieu avec 1 µg/g de spiromésifène ; **B** : Milieu témoin vs milieu avec 5 µg/g de spiromésifène ; **C** : Milieu témoin vs milieu avec 7,5 µg/g de spiromésifène ( $m \pm SEM$  ;  $n = 50$  mâles ; pour un même milieu les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ; tandis que pour un même traitement, les différences significatives sont les suivantes : \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



### 3.5.2. Effets sur la préférence alimentaire

Les résultats concernant l'indice de préférence alimentaire des femelles et mâles *D. melanogaster* témoins ou traités au spiromésifène sont représentés sur la figure 27. Les valeurs obtenues sont : -0.226, 0.262, 0.354 pour les mâles traités avec la solution 1  $\mu\text{g/g}$  et -0.280, -0.150, -0.075 pour les femelles traitées avec la même solution. Pour le traitement avec la solution 5  $\mu\text{g/g}$  les valeurs obtenues pour les mâles sont -0,146, 0,304, 0,205 et -0,323, -0,122, -0,236 pour les femelles. L'analyse statistique des données révèle des différences significatives entre l'indice de préférence alimentaire entre les mâles traités et les mâles témoins. En effet, avec le traitement à 1  $\mu\text{g/g}$ , le test de Kruskal-Wallis révèle un effet hautement significatif (KW= 35,41 ;  $p < 0,001$  ; Fig. 27 A). Des résultats similaires sont observés pour le traitement à 5  $\mu\text{g/g}$  avec des différences hautement significatives (KW= 32,16 ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 27 B). Dans ces deux cas, l'exposition pré-imaginale au spiromésifène augmente donc la propension des mâles à être attirés vers un milieu mélangé à l'insecticide.



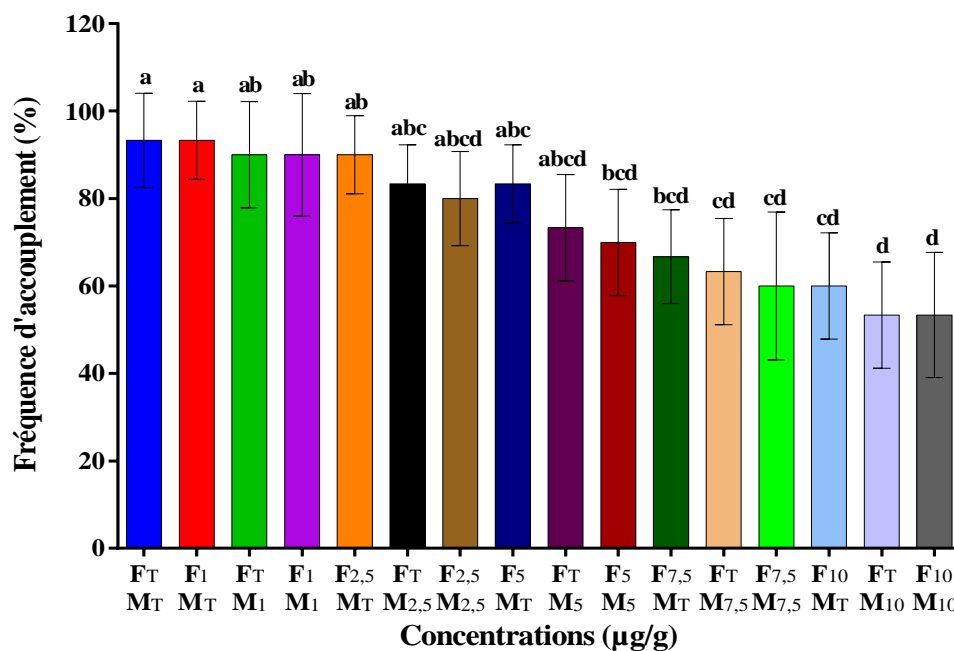
**Figure 27.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*, sur la préférence alimentaire **A** : Solution 1  $\mu\text{g/g}$ , **B** : 5  $\mu\text{g/g}$  (m  $\pm$  SEM ; n = 15 adultes ; pour un même milieu les moyennes suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).



### 3.5.3. Effets sur le comportement sexuel et progéniture

#### 3.5.3.1 Effet sur le potentiel reproducteur

Le spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations, au stade pré imaginal chez *D. melanogaster* affecte le comportement sexuel des adultes mâles et femelles avec un effet dose dépendant par rapport aux couples témoins (Fig. 28). Chez les individus exposés au spiromésifène, les fréquences d'accouplements sont réduites : le test du Chi-carré ( $\chi^2$ ) indique un effet significatif global des concentrations utilisées ( $\chi^2=50,40$  ; dl =15 ;  $p < 0,001$ ).



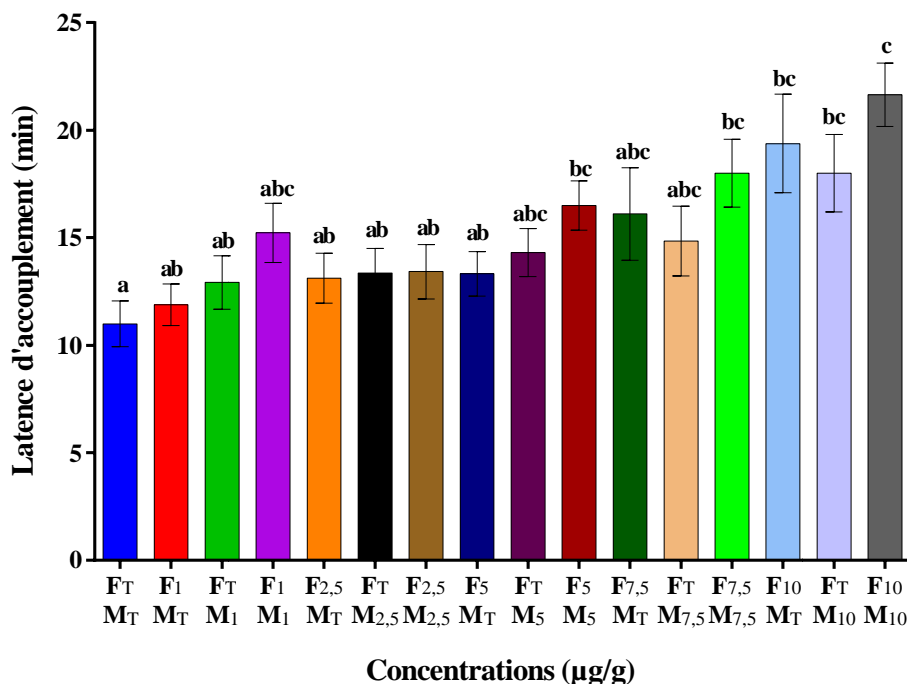
**Figure 28.** Effet du spiromésifène , administré par ingestion/contact à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*, sur la fréquence d'accouplement (moyennes et intervalles de confiance à 95% ; n = 30 répétitions ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à des expositions à 1 µg/g, 2,5 µg/g, 5 µg/g, 7,5 µg/g, 10 µg/g), les barres ornées de lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$ .



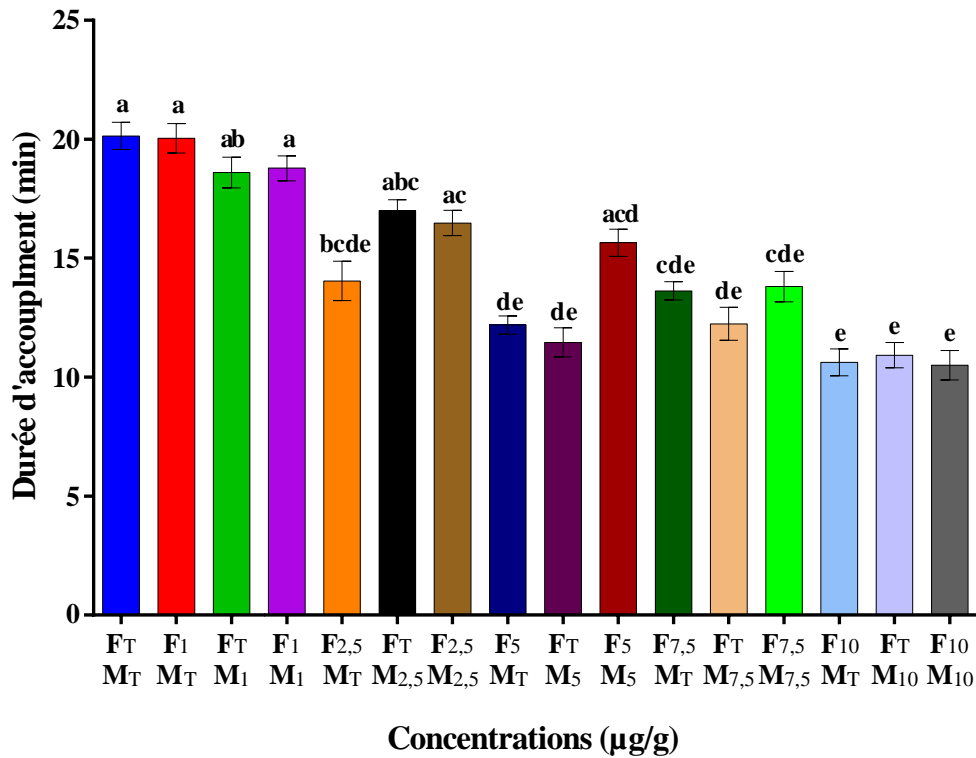
### 3.5.3.2 Effet sur la latence et la durée d'accouplement

L'effet du spiromésifène a aussi été évalué sur le temps de latence, c'est à dire la rapidité à s'accoupler (Fig. 29) et la durée d'accouplement, c'est à dire l'intervalle entre le début et la fin de l'accouplement (Fig. 30) après administration par ingestion de l'insecticide à différentes concentrations (1 à 10  $\mu\text{g/g}$ ) au cours du développement pré-imaginal chez *D. melanogaster*. Les latences d'accouplement augmentent significativement chez les individus exposés aux plus fortes concentrations par comparaisons aux couples témoins ( $F_T \times M_T = 11 \pm 1,06$  min). Ainsi avec les doses les plus élevées :  $F_5 \times M_5 = 16,50 \pm 1,14$  min ;  $F_{7,5} \times M_{7,5} = 18 \pm 1,57$  min ;  $F_{10} \times M_{10} = 21,65 \pm 1,47$  min. L'analyse statistique indique des différences très significatives entre ces latences (KW = 48,33 ;  $p < 0,001$ ).

La durée d'accouplement diminue significativement entre les couples témoins ( $F_T \times M_T = 20,14 \pm 0,57$  min) et les couples traités selon la concentration appliquée ;  $F_5 \times M_5 = 15,65 \pm 0,57$  min ;  $F_{7,5} \times M_{7,5} = 13,80 \pm 0,64$  min ;  $F_{10} \times M_{10} = 10,50 \pm 0,62$  min. L'analyse statistique indique un effet hautement significatif (KW = 227,4 ;  $p < 0,001$ ).



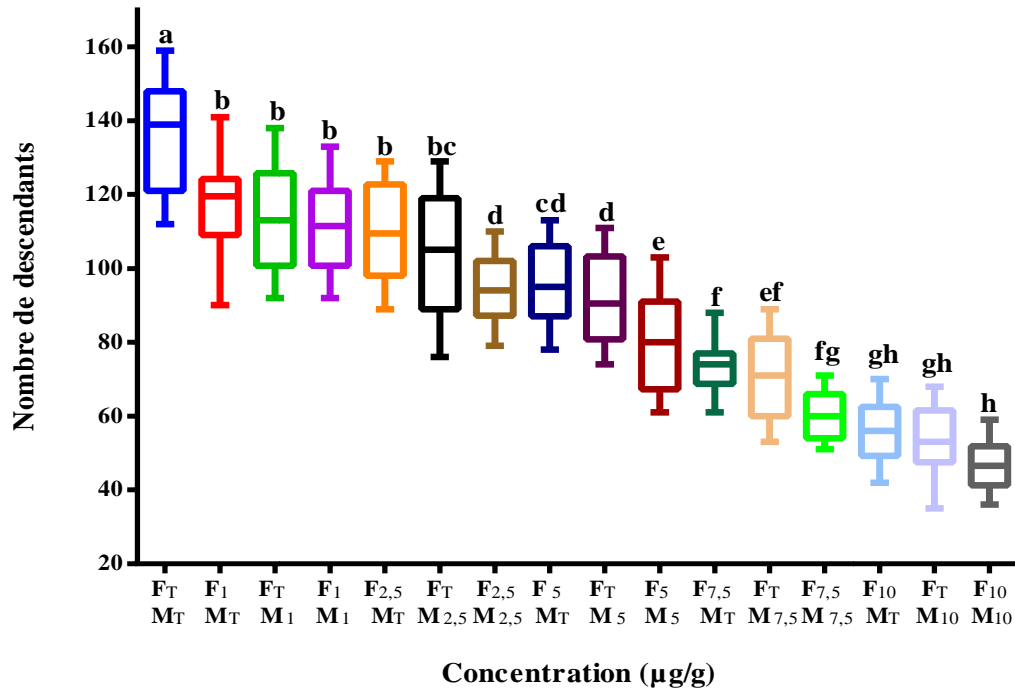
**Figure 29.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster* sur la latence d'accouplement (moyennes  $\pm$  SEM ;  $n = 30$  répétitions ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à des expositions à 1  $\mu\text{g/g}$ , 2,5  $\mu\text{g/g}$ , 5  $\mu\text{g/g}$ , 7,5  $\mu\text{g/g}$ , 10  $\mu\text{g/g}$  d'insecticide), les barres ornées de lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$ .



**Figure 30.** Effet du spiromésifène , administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*, sur la durée d'accouplement (moyennes  $\pm$  SEM ; n = 30 répétitions ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à des expositions à 1  $\mu\text{g} / \text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g} / \text{g}$ , 5  $\mu\text{g} / \text{g}$ , 7,5  $\mu\text{g} / \text{g}$ , 10  $\mu\text{g} / \text{g}$  d'insecticide), les barres ornées de lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$ .

### 3.5.3.3 Effet sur la fécondité

Les descendants adultes produits par les couples témoins et traités ont été comptés et comparés (Fig. 31). L'analyse statistique des données a montré une diminution dose-dépendante d'individus dans la descendance F1 pour toutes les couples traités par rapport aux couples témoins ( $F_{15, 392} = 139,4$  ;  $p < 0,001$ ). Dans l'ensemble, l'effet le plus important a été noté lorsque les deux partenaires ont été traités avec les concentrations de spiromésifène les plus élevées.



**Figure 31.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal de *D. melanogaster* sur le nombre de descendants (n = 30 couples ; F: femelle, M: mâle, T: témoin et 1, 2,5, 5, 7,5, 10 correspondent respectivement à 1 µg / g, 2,5 µg / g, 5 µg / g, 7,5 µg / g, 10 µg / g), Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes  $p > 0,05$ .

#### 3.5.4. Effets sur la fécondité et la préférence du site d'oviposition

Le spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations, au cours du développement pré-imaginal de *D. melanogaster* affecte la fécondité des femelles en réduisant de manière hautement significative le nombre d'œufs pondus et ce comparativement aux témoins ( $p < 0,001$ ). Les résultats obtenus en condition de non choix montrent une préférence claire de l'oviposition plutôt sur un milieu témoin que sur un milieu traité et ce pour les deux concentrations testées (1 et 5 µg/g). Les femelles pondent moins d'œufs sur un milieu traité comparativement au milieu non traité (Fig. 32). Le test de Kruskal-Wallis révèle des différences significatives entre les différents insectes testés (témoins, 1 et 5 µg/g) et ce pour le milieu témoin (KW= 36,59 ;  $p < 0,001$ ), le milieu 1 µg/g (KW= 33,41;  $p < 0,001$ ) et pour le milieu 5 µg/g (KW= 20,77;  $p < 0,001$ ) (Fig. 33).

Les résultats concernant l'indice de préférence d'oviposition (IPO) des femelles *D. melanogaster* témoins ou traitées au spiromésifène sont représentés sur la figure 33. Les valeurs de l'IPO obtenues sont toujours négatives et sont - 0,354, - 0,479, - 0,466 pour le



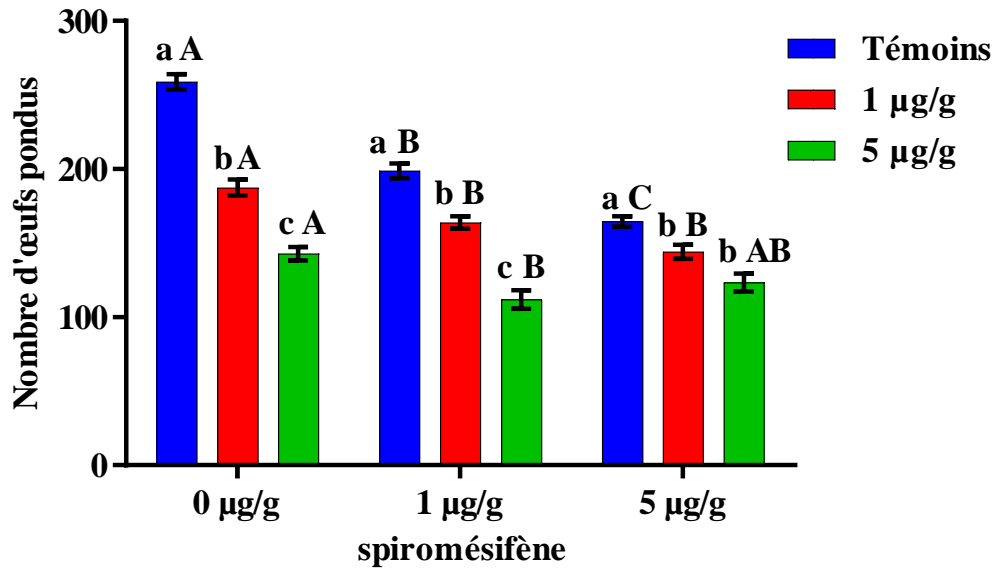
milieu 1  $\mu\text{g/g}$  ; - 0,449, - 0,493, - 0,584 pour le milieu 5  $\mu\text{g/g}$  et - 0,163, - 0,139, - 0,488 pour le milieu 1 et 5  $\mu\text{g/g}$  et ce respectivement pour les femelles témoins, traitées à 1  $\mu\text{g/g}$  et traitées à 5  $\mu\text{g/g}$ .

Les femelles traitées et témoins choisissent donc de pondre sur un milieu témoin et évitent le milieu traité avec l'insecticide. Cet évitement est plus fort chez les femelles qui étaient préalablement exposées au spiromésifène.

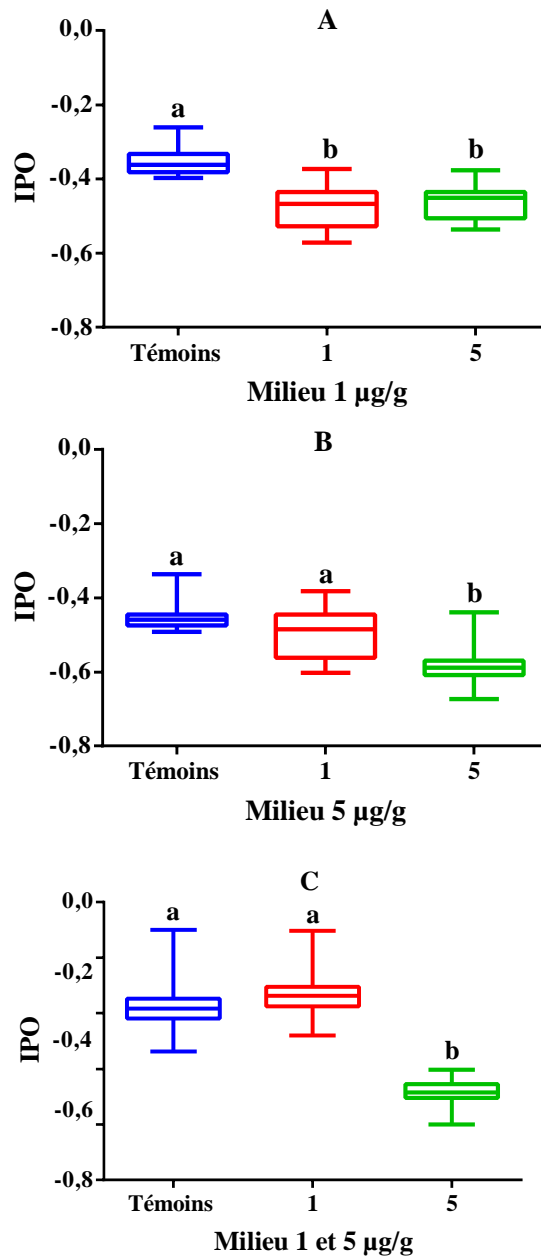
L'analyse statistique indique des différences significatives entre l'IPO des femelles traitées et des femelles témoins. En effet, envers le milieu 1  $\mu\text{g/g}$ , le test de Mann-Whitney révèle un effet significatif entre les femelles témoins et celles traitées avec 1  $\mu\text{g/g}$  ( $U = 4,00$  ;  $p < 0,001$ ) et à 5  $\mu\text{g/g}$  ( $U = 4,00$  ;  $p < 0,001$ ). Cependant, aucune différence significative n'est enregistrée entre les deux doses testées ( $U = 97,00$  ;  $p = 0,053$ ) (Fig. 33 A). Concernant le milieu contenant 5  $\mu\text{g/g}$ , le test de Mann-Whitney révèle un effet significatif entre les femelles témoins et celles traitées avec 5  $\mu\text{g/g}$  ( $U = 13,00$  ;  $p < 0,001$ ) et entre les deux concentrations testées ( $U = 31,00$  ;  $p = 0,0004$ ). Cependant, aucune différence significative n'est enregistrée entre les femelles témoins et celles traitées à 1  $\mu\text{g/g}$  ( $U = 69,00$  ;  $p = 0,073$ ) (Fig. 33 B).

Des résultats similaires sont observés pour les réponses envers les milieux contenant 1 et 5  $\mu\text{g/g}$  avec des différences significatives entre les femelles témoins et celles traitées avec 5  $\mu\text{g/g}$  ( $U = 2,00$ ;  $p < 0,001$ ) ainsi qu'entre les deux concentrations testées ( $U = 4,00$ ;  $p < 0,001$ ). Aucun effet dose n'est enregistré entre les femelles témoins et traitées par 1  $\mu\text{g/g}$  ( $U = 72,00$ ;  $p = 0,096$ ) (Fig. 33 C).





**Figure 32.** Effet du spiromésifène administré par ingestion à différentes concentrations au stade pré-imaginal chez *D. melanogaster*, sur le nombre d'œufs pondus en condition de non choix du milieu de ponte ( $m \pm SEM$  ;  $n = 15-20$  femelles ; pour un même milieu les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que pour un même traitement les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$ ).



**Figure 33.** Indice de préférence d'oviposition (IPO) des femelles *D. melanogaster* en condition de choix du milieu de ponte. **A** : Milieu témoin vs milieu avec 1  $\mu\text{g/g}$  de spiromésifène, **B** : Milieu témoin vs milieu avec 5  $\mu\text{g/g}$  de spiromésifène, **C** : Milieu avec 1  $\mu\text{g/g}$  vs milieu avec 5  $\mu\text{g/g}$  de spiromésifène. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ). Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les individus témoins et ceux traités pour un même milieu.

# **DISCUSSION**

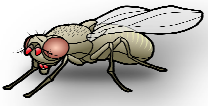


## 4. DISCUSSION

L'utilisation des pesticides n'a cessé d'augmenter au cours des 60 dernières années, de sorte que les molécules de pesticides ou leurs résidus se retrouvent aujourd'hui dans le monde entier et dans tous les écosystèmes (Vörösmarty *et al.*, 2010 ; Roser et Ritchie, 2015 ; Cruzeiro *et al.*, 2017). Actuellement, des résidus de ces pesticides sont détectés dans les sols, dans l'eau des lacs et des rivières, dans les eaux de pluie, dans l'air et toute la chaîne alimentaire.

Les organismes vivants sont donc continuellement exposés à des doses variables de ces pesticides. Ceux-ci peuvent avoir des effets indésirables plus ou moins importants, comme la perturbation de plusieurs systèmes physiologiques (impliqués dans la croissance, la reproduction et le métabolisme) d'organismes non ciblés (Gagné *et al.*, 1999). Ces produits ont également conduit à l'invasion de nouvelles espèces nuisibles et à l'apparition de souches résistantes (Kristensen *et al.*, 2005 ; Swanton *et al.*, 2011).

Parmi ces molécules se trouve le spiromésifène qui est un dérivé des acides tétroniques. Il agit comme inhibiteur de l'acetyl-CoA carboxylase et comme inhibiteur de la lipogénèse, ce qui induit une baisse de lipides dans le corps des insectes traités, empêchant la formation des régulateurs de croissance et diminuant le pouvoir reproducteur des adultes (U.S. EPA, 2008 Agence de la Protection de l'Environnement des Etats Unis). Du fait de son importance dans les programmes de gestion de la résistance (Horowitz et Ishaaya, 2004 ; Ishaaya et Horowitz, 2007) et de son mode d'action spécifique (Nauen et Konanz, 2005), il a été classé avec le spirotétramate et le spirodiclofène dans le groupe 23 par le comité insecticide d'action de résistance (Nauen *et al.*, 2008). Plusieurs études récentes ont montré l'efficacité du spiromésifène contre divers insectes vecteurs et ravageurs comme *Culex quinquefasciatus* (Shah *et al.*, 2016), *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata* (Bouabida *et al.*, 2017a et b), *Neoseiulus californicus* (Sarbaz *et al.*, 2017) et *Spodoptera littoralis* (Abdel-Fatah *et al.*, 2019).



#### 4.1. Toxicité du spiromésifène à l'égard de *Drosophila melanogaster*

Le but de la première partie de ma thèse était d'évaluer la toxicité d'une formulation commerciale du spiromésifène (Oberon), chez l'insecte modèle *D. melanogaster* afin de préciser les conditions expérimentales de traitement. Pour cela, deux modes de traitement ont été mis en œuvre : (1) traitement par application topique sur les larves L3, et (2) traitement par ingestion (et contact) avec l'insecticide additionné au milieu d'élevage et administrée au cours du développement pré-imaginal.

Nos résultats indiquent que le spiromésifène est toxique et induit un effet insecticide à l'égard de *D. melanogaster* avec une relation dose-réponse significative, et ceci pour les 2 modes d'application. Nos résultats sont en accord avec des travaux antérieurs portant sur la toxicité du spiromésifène chez les pupes de la même espèce avec un traitement topique (Kissoum *et al.*, 2020). Ainsi, les larves semblent plus sensibles que les pupes lorsque le produit est administré par application topique. De même, des travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire indiquent que les larves et les adultes *D. melanogaster* semblent être plus sensibles au Neem Azal (application topique) que les nymphes (Boulahbel *et al.*, 2015 ; Oulhaci *et al.*, 2018). Les effets du spiromésifène, additionné à l'eau d'élevage ont été évalués chez d'autres espèces de Diptères, notamment les larves du 4<sup>ème</sup> stade de *Culiseta longiareolata* et *Culex pipiens* (Bouabida *et al.*, 2017a et b). Les résultats obtenus sont similaires à ceux trouvés chez *Bemisia tabacien* consistant à appliquer le produit sur les feuilles de coton en laboratoire (DL<sub>50</sub>=500 et DL<sub>90</sub>=1400 µg/L) (Kontsedalov *et al.*, 2009).

Dans la littérature, la sensibilité des insectes aux insecticides varie selon 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). Ainsi, la toxicité des pesticides dépend de la chimie des pesticides, du mode d'application, de leur taux d'utilisation, des conditions microclimatiques et des stades de développement de l'insecte étudié (Kontsedalov *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2016). Kaplan *et al.* (2012) ont noté que le spiromésifène est moins toxique sur les stades adultes de *Neoseiulus californicus* (Acari : Phytoseiidae) par rapport aux stades immatures. La toxicité de trois concentrations (0,25, 0,5, 1 ml/ l d'eau) de spiromésifène sur les stades immatures de *N. californicus* varie en fonction de la durée d'exposition pendant le développement (Hassan, 1992). Le spiromésifène s'est révélé particulièrement toxique quand il était appliqué aux stades juvéniles des aleurodes et des tétranyques (Kontsedalov *et al.*, 2009).



Par ailleurs, le spiromésifène est efficace contre *Bemisia tabaci* biotype Q résistantes au pyriproxyfen et aux insecticides néonicotinoïdes (Horowitz et Ishaaya, 2004 ; Nauen et Konanz, 2005 ; Roditakis *et al.*, 2009 ; Luo *et al.*, 2010), mais aussi chez *B. tabaci* biotype B (Schuster *et al.*, 2010). Chez la même espèce, le spiromésifène présente un effet plus marqué sur les œufs et les stades larvaires, tandis que son effet est modéré chez les stades nymphaux et les adultes (Nauen *et al.*, 2003 ; Nauen et Konanz, 2005).

#### 4.2. Effet du spiromésifène sur le développement

L'espèce *D. melanogaster* a été largement utilisée comme organisme modèle pour étudier l'impact des insecticides. Chez les insectes, le développement et la reproduction sont contrôlés par des facteurs externes (température, nutrition, photopériode) mais aussi internes comme les hormones et les neurohormones (Gilbert *et al.*, 2002 ; Lafont *et al.*, 2005 ; Gruntenko et Rauschenbach, 2009 ; Hiruma et Kaneko, 2013). Le développement post-embryonnaire des insectes est caractérisé par des mues successives et des métamorphoses permettant la croissance et le changement de forme de l'animal par des mues larvaires ou celles nécessaires au programme adulte (Gade *et al.*, 1997 ; Kozlova et Thummel, 2000).

Le développement des insectes peut être perturbé par différents insecticides, se traduisant généralement par un allongement de la durée de développement, l'apparition de malformations morphologiques et/ou par une réduction de la longévité (Louat, 2013). Nos résultats indiquent que l'exposition pré-imaginale au spiromésifène a affecté à la fois la durée des stades larvaire et nymphal ainsi que le poids corporel frais et secs des adultes et par conséquent leur rétention d'eau. L'augmentation de la durée des stades de développement peut être expliquée par la réduction constatée des réserves indispensable à la croissance et au développement (Reim *et al.*, 2006). L'application chez *D. melanogaster* d'un analogue de l'hormone juvénile, le pyriproxyfène à la fin du dernier stade larvaire (L3), a provoqué un allongement de la durée du stade nymphal comparativement aux témoins (Bensebaa *et al.*, 2015). Alizadeh *et al.* (2012) ont rapporté un allongement de la durée de développement chez les larves et les pupes de *Plutella xylostella* traitées au pyriproxyfène. Des effets similaires ont été également enregistrés sous l'effet d'analogues de l'hormone juvénile : du méthoprène chez *Bombyx mori* (Miranda *et al.*, 2002), du kinoprène chez *C. pipiens* (Hamaidia et Soltani, 2014) et du fénoxycarbe chez *Corcyra cephalonica* (Singh et Tiwari, 2014). L'application du spiromésifène (CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub>) a induit une diminution significative du poids corporel et du volume des larves de quatrième stade de *C. longiareolata* par rapport aux témoins (Bouabida



*et al.*, 2017b). Müller *et al.* (2019) ont constaté que l'exposition des larves au pyréthrianoïde lambda-cyhalothrine pour quelques jours a prolongé la durée du développement larvaire de *Phaedon cochleariae*. De plus, les mâles adultes exposés aux insecticides étaient plus légers que les mâles non exposés. De même, les larves de *Pieris brassicae* exposées à des concentrations sublétales de l'imidaclopride (néonicotinoïde) ont également montré une durée de développement accrue et une réduction de la masse corporelle adulte suggérant que des effets de trans-métamorphose pourraient être conservés de la larve à l'adulte (Whitehorn *et al.*, 2018).

La durée de développement, la mortalité et le poids des larves sont les indices de performance les plus importants et les plus étudiés dans le cadre des études liées à la dynamique des populations d'insectes. La durée de développement affecte directement la durée d'exposition de l'insecte aux ennemis naturels. Plus la durée est longue, plus l'insecte sera exposé aux attaques des ennemis naturels ce qui diminuera ainsi les niveaux de population de l'insecte (Weseloh et Andreadis, 1982).

Chez les insectes, la croissance et la taille finale du corps sont définies principalement par l'alimentation durant les stades larvaires et sont également soumises à des facteurs environnementaux, physiologiques, génétiques et de coordination de développement des différents organes (Mirth et Shingleton, 2012 ; Nijhout *et al.*, 2014). En effet, les larves qui se développent lentement rencontrent des conditions d'alimentation plus difficiles, ce qui affecte leur viabilité ainsi que leur capacité à accumuler les nutriments nécessaires pour leur développement (Anxolabehere, 1978). Nunney. (1996) a démontré l'existence d'un compromis entre le développement rapide des larves et le poids et la fécondité des adultes en laboratoire. Zwaan *et al.* (1995) ont également constaté que la durée de développement rapide et le poids des adultes étaient négativement corrélés.

Plusieurs études ont également souligné que la durée de développement et la longévité des adultes sont toutes deux liées à des facteurs de stress environnemental tels que l'exposition aux insecticides (Mayer et Baker, 1984 ; Zwaan *et al.*, 1995). Le novaluron (inhibiteur de la synthèse de la chitine) à la CL<sub>90</sub> chez des larves L<sub>3</sub> et L<sub>4</sub> de *C. pipiens* provoque une augmentation significative de la durée de développement larvaire suivie par une diminution significative de la longévité des adultes ainsi que celle de la taille selon les concentrations utilisées, et même l'apparition de certaines aberrations morphologiques (Djghader *et al.*, 2014). Nos résultats indiquent que les mâles non exposés au spiromésifène au cours de leur



développement pré-imaginal ont vécu plus longtemps que les mâles traités. De même, la longévité adulte a été réduite chez *N. californicus* exposé au spiromésifène (Cloyd *et al.*, 2006) ou au spirodiclofène (Maroufpoor *et al.*, 2016). De nombreuses études ont rapporté la réduction de la longévité chez la Drosophile suite au traitement avec d'autres produits comme le pyriproxifène (Bensebaa *et al.*, 2015) ou l'azadirachtine (Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016). Le raccourcissement de la longévité après traitement observé dans notre étude pourrait être dû à une réduction de l'absorption de la nourriture suite à l'effet de l'insecticide sur la préférence alimentaire et/ou sur la capacité sensorielle (Maroufpoor *et al.*, 2016).

La régulation de la teneur en eau est essentielle pour la survie de tous les organismes. Chez les insectes, l'eau peut être obtenue par la consommation, l'absorption de la vapeur d'eau atmosphérique et la production d'eau au cours du métabolisme. Simultanément, l'eau est perdue par les processus d'excrétion, de transpiration cuticulaire et respiratoire et dans les sécrétions corporelles (Hadley, 1994). Les lipides épicuticulaires jouent de nombreux rôles chez les insectes, mais le premier à être reconnu est celui de barrière à la transpiration à travers la surface de l'animal. Le rapport surface/volume augmente avec la taille, de sorte que les petits animaux sont de plus en plus sensibles à la déshydratation. Leur importance pour la conservation de l'eau est mise en évidence par le fait que même un bref traitement avec des solvants organiques pour éliminer les lipides de surface peut entraîner une augmentation de 10 à 100 fois des taux de perte d'eau (Hadley, 1994 ; Gibbs et Rajpurohit, 2010). Selon Ferveur *et al.* (2018), les mouches ayant une teneur en eau plus élevée et une proportion plus faible d'HC désaturés dans le corps adipeux (corps gras) due à une expression défectueuse de la désaturase ont montré une résistance réduite à la dessiccation.

Dans cette étude, la teneur en eau des mouches adultes mâles et femelles a été réduite par le spiromésifène, ce qui suggère une altération des lipides (et donc des Hcs couvrant) l'épicuticule *via* une inhibition de la synthèse des lipides. En effet, il a été rapporté que le produit testé inhibe l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) et interfère avec la biosynthèse des lipides chez les insectes et les acariens (Bretschneider *et al.*, 2012). Plus spécifiquement, Lümmen *et al.* (2014) ont montré que le métabolite « énoïl » de l'insecticide cyclique cétoénoïl apparenté, le spirotétramate, inhibe l'ACCase de *Tetranychus urticae* en interagissant avec le domaine de la carboxyltransférase (CT).





### 4.3. Effet du spiromésifène sur la reproduction

Le potentiel reproducteur des insectes reste le facteur le plus important de leur indéniable pullulation. L'étude de la reproduction est donc capitale dans toute approche raisonnée pour diminuer sensiblement les dégâts causés par ces insectes. Le contrôle de la capacité reproductrice des insectes est un élément fondamental auquel le physiologiste peut apporter une contribution significative. Le succès reproducteur d'un individu représente sa capacité à produire une descendance viable et capable de se reproduire à son tour (Barnes *et al.*, 2008). La fécondité des femelles, estimée par le nombre d'œufs pondus, est un indicateur de la condition physique largement utilisé (Swevers *et al.*, 2005).

Nos résultats montrent que le traitement au stade pré-imaginal induit une diminution du pourcentage d'accouplement et de la fertilité réduisant le nombre de descendants de parents ayant survécu au traitement pré-imaginal. Cette diminution de la fécondité est dépendante de la concentration utilisée et du sexe. Les effets du spiromésifène seraient dû à une perturbation de la vitellogenèse et de la spermatogenèse conduisant à une diminution de la fécondité et de la fertilité (Velazquez *et al.*, 1990 ; Swevers *et al.*, 2005). Nos résultats concordent avec les données obtenues par Bensafi-Gheraïbia *et al.* (2020) et Kissoum *et al.* (2020) après application topique du spiromésifène sur les pupes nouvellement éxuvées de *D. melanogaster*; ce composé agit sur le potentiel reproducteur de la Drosophile et inhibe la fertilité et la fécondité des adultes qui survivent au traitement.

Le spiromésifène entraîne également une diminution de la fécondité et la fertilité chez d'autres espèces telles que l'acarien *T. urticae* (Nauen et Konanz, 2005 ; Marčić *et al.*, 2010), *B. tabaci* (Van Pottelberge *et al.*, 2009 ; Kontsedalov *et al.*, 2009) avec une relation dose-réponse dépendante. Le spirotétramate a provoqué chez *C. pipiens* une réduction du nombre d'œufs pondus avec un très faible taux de survie des stades larvaires (Matoug, 2018).

Des effets similaires ont été observés chez *D. melanogaster* après traitement avec cybil (pyréthriinoïde) (Razdan *et al.*, 2003), bêta-cyfluthrine (Nadda *et al.*, 2005) et le Neem Azal (Boulahbel *et al.*, 2015). De même, des effets similaires ont été rapportés chez *Ephestia kuehniella* exposé à des agonistes d'ecdystéroïdes (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012 ; Nation, 2016). La réduction de la fertilité observée chez *E. kuehniella* suggère un effet des agonistes des ecdystéroïdes sur le processus de vitellogenèse *via* la production d'hormone de mue et également sur le comportement sexuel (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012 ; Nation, 2016).



Des variations quantitatives et qualitatives dans 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); il a été 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).

L'ovogenèse est un processus qui nécessite une énergie considérable et qui doit s'adapter en permanence à des paramètres nutritionnels fluctuants (Jouandin *et al.*, 2014). Nos tests révèlent que le spiromésifène diminue le poids frais des ovaires des femelles adultes *D. melanogaster* après traitement pré-imaginal, comparativement aux femelles témoins.

Les effets dépressifs observés sur le poids de l'ovaire peuvent s'expliquer par la perturbation de l'ovogénèse et la vitellogénèse (Seth *et al.*, 2002), *via* la diminution de la synthèse des précurseurs vitellogéniques au niveau du corps gras et/ou de leur incorporation dans les ovocytes. Ces matériaux (lipides, protéines, glucides) sont tous requis pour le développement de l'appareil génital (Kunkel et Nordin, 1985). Ceci suggère une action du spiromésifène sur le métabolisme lipidique perturbant ainsi la vitellogénèse de la *Drosophila*. Nos résultats concordent avec les données obtenues après application topique du spiromésifène sur les pupes nouvellement éxuvées de *D. melanogaster*, concernant une diminution du poids ovarien (Kissoum *et al.*, 2016). Le caractère inhibiteur de la lipogenèse du spiromésifène est signalé également chez *C. pipiens* et *C. longiareolata* après traitement par le même insecticide (Bouabida *et al.*, 2017a et b).

Des effets similaires ont été enregistrés avec de nombreux insecticides appliqués sur différentes espèces. Des insecticides neurotoxiques comme le Benfuracarb, l'Indoxacarbe (groupe des oxadiazines) ou l'Azadirachtin induisent des effets similaires chez *Blattella germanica* (Tine *et al.*, 2011 ; Maiza *et al.*, 2004, 2013).

Les réserves énergétiques ont été considérées comme des biomarqueurs prédictifs d'effets sur la dynamique et la structure des populations (Le Gal *et al.*, 1997 ; Scott-Fordsmand *et al.*, 2000). De plus, de nombreux auteurs ont montré une corrélation positive



entre les réserves énergétiques et le succès reproducteur ou encore la croissance des organismes (De Coen et Janssen, 2003).

Les lipides jouent un rôle primordial dans les processus de reproduction et de développement des insectes où ils représentent 30 à 40% du poids sec des ovocytes (Allais *et al.*, 1964 ; Troy *et al.*, 1975 ; Kawooya et Law, 1988 ; Briegel, 1990). Ils sont transportés du corps gras, site de leurs synthèse et stockage (Keeley, 1985 ; Van Heusden et Law, 1989), vers les organes utilisateurs, notamment les ovaires (Kilby, 1963 ; Chino *et al.*, 1981) via l'hémolymphe pour être utilisés lors de la vitellogénèse (Wigglesworth, 1972).

Chez *D. melanogaster*, le spiromésifène administré par ingestion/contact au cours des stades pré-imaginal réduit la teneur en lipides totaux ovariens au cours de la maturité sexuelle, et ceci suivant une relation dose-réponse, confirmant ainsi son mécanisme d'action primaire sur la synthèse des lipides via l'inhibition de l'acetyl-CoA carboxylase. Cette enzyme catalyse la carboxylation de l'acetyl-CoA en malonyl-CoA, l'une des première étapes de la biosynthèse des acides gras (Bretschneider *et al.*, 2003 ; Nauen et Konanz, 2005).

Cette réduction peut avoir des causes différentes soit une diminution de leur synthèse et/ou de leur libération dans l'hémolymphe par le corps gras, soit une perturbation de leur incorporation dans l'ovocyte. Chez *B. germanica*, une diminution des taux de lipides ovariens a été induite par un traitement avec l'acide borique, un insecticide inorganique (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009) et avec l'halofenozide (agoniste des ecdystéroïdes) ou le méthoprène (mimétique de l'hormone de mue) (Maiza *et al.*, 2004), ainsi qu'avec l'indoxacarbe (Maiza *et al.*, 2010). Le méthoxyfenozide provoque également une diminution des taux de lipides ovariens après traitement des pupes d'*E. kuehniella* (Soltani-Mazouni *et al.*, 2012).

Les glucides sont mobilisés principalement à partir des réserves de glycogène dans le corps gras, sous l'induction des neuropeptides, ce qui entraîne une augmentation du taux d'hydrates de carbone solubles dans l'hémolymphe (Louat, 2013). Les sucres représentent une source d'énergie indispensable pour les organismes vivants et sont mobilisés sous forme de glucose ; les taux de glucides tissulaires sont strictement liés aux événements physiologiques tels que la mue et la reproduction (Kaufmann et Brown, 2008). Le contenu des ovaires en glucides montre une réduction chez les individus traités ; cette diminution serait due à une perturbation du métabolisme de base des ovocytes ce qui implique une réduction de l'accumulation du vitellus indispensable à l'accroissement et à la maturation des ovocytes.



Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés chez *D. melanogaster* après application topique du spiromésifène sur les pupes nouvellement éxuvées (Kissoum et Soltani, 2016 ; Kissoum *et al.*, 2020), ainsi que chez *B. germanica* traitée par l'indoxacarbe (Djemaoun *et al.*, 2015). En outre, l'inhibition de la vitellogénèse chez *B. germanica* a également été observée après traitement avec d'autres types d'insecticides tels que l'acide borique (Habes *et al.*, 2013), le benfuracarb, l'azadirachtin et l'imidaclopride (Maiza *et al.*, 2004 ; Tine *et al.*, 2011 ; Messiad et Habes, 2015).

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues. Ces dernières entrent dans diverses réactions et peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s'intégrer dans la cellule comme éléments structuraux en même temps que les glucides et les lipides (Jacob et Monod, 1961). La reproduction chez les insectes dépend des protéines notamment la vitellogénine (protéine constituant 80-90% des substances de réserve de l'œuf) qui est synthétisée dans le corps gras, cette protéine étant par la suite acheminée et incorporée dans les ovocytes (Swevers *et al.*, 2005).

Le spiromésifène diminue significativement les taux de protéines ovariennes en fonction de la concentration administrée par ingestion au cours des stades pré-imaginaux chez *D. melanogaster*. Une perturbation du profil électrophorétique des protéines ovariennes a été notée chez *D. melanogaster* après traitement par application topique des pupes (Bensafi-Ghrerabia *et al.*, 2020). Chez *B. germanica*, une diminution des taux de protéines ovariennes a été obtenue après traitement avec l'acide borique, un insecticide inorganique (Kilani-Morakchi *et al.*, 2009) et avec l'halofenozide ou le méthoprène (Maiza *et al.*, 2004) ainsi qu'avec l'indoxacarbe (Maiza *et al.*, 2010). Le RH-0345, un agoniste des ecdystéroïdes, réduit les concentrations des protéines ovariennes (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001) chez *T. molitor*. Une réduction du taux des métabolites ovariens chez la même espèce a lieu après traitement avec le diflubenzuron, un insecticide inhibiteur de la synthèse de la chitine, (Soltani-Mazouni et Soltani, 1992) et le KK42, un dérivé de l'imidazole, utilisé chez *T. molitor* in vivo (Soltani-Mazouni *et al.*, 2001).



#### 4.4. Effet sur les lipides corporels

##### 4.4.1. Effet du spiromisifen administré par application topique sur les lipides totaux corporels et le malondialdéhyde

Les lipides jouent un rôle crucial dans le métabolisme général et la reproduction car ils ont de nombreuses fonctions dans les cellules en plus de leur rôle évident dans le stockage de l'énergie. En particulier, ils constituent les membranes cellulaires et leurs produits servent de messagers intra- et extracellulaires contrôlant et régulant de nombreuses fonctions vitales du corps (Shen *et al.*, 2010 ; Arrese et soulages, 2010). Le métabolisme des lipides est essentiel pour la croissance et la reproduction et fournit l'énergie nécessaire pendant les périodes prolongées sans alimentation (Gibbs et Crockett, 1998). La quantité de lipides chez les insectes varie considérablement et peut être influencée par de nombreux facteurs, notamment le stade de développement, l'état nutritionnel, le sexe, la température, la diapause et le vol. Chez la plupart des insectes, les femelles contiennent plus de lipides que les mâles, probablement parce qu'une grande partie de la réserve lipidique est utilisée pour la production d'œufs (Gibbs et Crockett, 1998).

Chez *D. melanogaster*, le spiromésifène réduit rapidement la teneur en lipides corporels totaux au cours du développement nymphal et ceci suivant une relation dose-réponse. Les diminutions quantitatives de lipides observées chez les pupes témoins et traitées pourraient être causées par l'utilisation d'énergie nécessaire pour la métamorphose (avec la destruction des organes de la larve) ainsi que l'élaboration des structures de l'adulte. Récemment, il a été signalé que le spirotétramate, un autre dérivé de l'acide tétronique, inhibait l'acétyl CoA carboxylase, ce qui entraîne des perturbations de la croissance et des teneurs en lipides chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Gutbrod *et al.*, 2020).

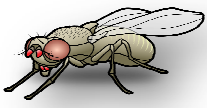
Harper *et al.* (1977) ont expliqué que la diminution des lipides totaux sous le stress des pesticides reflète leur utilisation immédiate pour répondre aux besoins énergétiques. Lohar et Wright. (1993) ont observé une réduction de la quantité de lipides dans l'hémolymph, le corps gras et les ovocytes chez les femelles *T. molitor* exposées au malathion. Ils ont montré également que la réduction de la teneur en lipides pouvait être due à l'effet de l'insecticide sur l'hormone adipocinétique qui contrôle le métabolisme des lipides. En ce qui concerne la teneur totale en lipides, un certain nombre d'agents toxiques induisent des perturbations des graisses dans différents organes corporels des animaux vertébrés et invertébrés (Rawi *et al.*,



1995). Abdel-A *et al.* (2006) ont montré que le chlorfluazuron provoquait une diminution significative des protéines totales, des lipides et des glucides chez la larve de *S. littoralis*. Les niveaux de glycogène, de protéines et de lipides avaient tendance à baisser par rapport aux témoins à tous les stades et sexes de la guêpe de l'endoparasitoïde *Pimpla turionellae* L. élevée sur *Galleria mellonella* L. et exposée à diverses doses sublétales de cyperméthrine (Sak *et al.*, 2006). Alimohammadi *et al.* (2014) ont signalé une réduction significative de la quantité de lipides chez les larves d'*Hippodamia variegata* traitées au spiroadiclofène. La teneur totale en lipides a montré une augmentation de la résistance et un déclin chez les coléoptères sensibles *Rhyzopertha dominica*, traités par la deltaméthrine à des concentrations supérieures à la sublétalité (Ali *et al.*, 2014). L'insectifuge alléthrine a entraîné une diminution du taux de lipides chez les blattes mâles et femelles de *Periplaneta americana* (Amrutsagar et Joshi, 2017). Des études antérieures avaient déjà signalé que le spiromésifène affecte les quantités de lipides et le taux de malondialdéhyde chez les pupes de *D. melanogaster* (Bensafi-Gheraibia *et al.*, 2013) et les larves de *C. longiareolata* (Bouabida *et al.*, 2017b)

Les conséquences de l'exposition à certains pesticides se manifestent en premier lieu par une peroxydation des lipides membranaires avec le malondialdéhyde (MDA) comme produit final (Zielinski et Portner, 2000). le MDA constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et, par conséquent, il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif lié aux dommages oxydatifs des lipides (Funes *et al.*, 2006 ; Box *et al.*, 2007 ; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2009 ; Lavarías *et al.*, 2011 ; Parrilla-Taylor *et al.*, 2013). Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules. Ainsi, la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Marnett, 2002).

La présente thèse montre que le spiromésifène appliqué sur les larves *D. melanogaster* du dernier stade (L3) augmente rapidement le taux de MDA (24 h après le traitement) par rapport aux témoins. Ceci révèle que le spiromésifène induit un stress oxydatif qui conduit à la peroxydation des lipides. Le statut normal est restauré 3 jours après traitement, ce qui suggère l'activation d'un système de détoxification des peroxydes lipidiques. En accord avec nos résultats, Bensafi-Gheraibia *et al.* (2013) ont trouvé que le spiromésifène provoque une augmentation très significative du MDA uniquement après 1 jour avec la CL<sub>25</sub>, chez les pupes *D. melanogaster*. Bouabida *et al.* (2017a) notent également une augmentation significative du taux de MDA enregistré suite à une déficience du système de défense antioxydant chez *C. pipiens* exposé au spiromésifène (CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub>). De plus, une augmentation du taux du MDA a été signalée chez les crevettes *Palaemon adspersus* nouvellement éluviées traitées avec le



même produit (Lechekhab-Ahmed-Chaouch, 2018). Enfin, Bairi (2020) a signalé une augmentation significative avec une relation dose-réponse du taux de MDA chez l'escargot *Helix aspersa* exposé pendant 96h à deux concentrations létales (5 et 10  $\mu\text{g/ml}$ ) de spiromésifène.

#### 4.4.2. Effet du spiromésifène administré par ingestion sur le taux d'acides gras et le profil des hydrocarbures cuticulaires

Les acides gras (AGs), principaux composants des lipides, sont utilisés comme carburant dans tous les systèmes métaboliques, et jouent un rôle important dans la réponse biochimique et physiologique (Neves *et al.*, 2015). Chez les insectes, une modification de la teneur en AGs peut affecter la fécondité des femelles (Bauerfeind *et al.*, 2007) et le ré-accouplement (Baer *et al.*, 2001) ainsi que la production de phéromones sexuelles (Ueyama *et al.*, 2005). La présence et la composition des AGs dans les membranes cellulaires peuvent également affecter l'adaptation au froid chez la drosophile (Overgaard *et al.*, 2008). Les analyses par CPG ont révélé une réduction de la quantité totale d'AGs chez les adultes mâles et femelles de *D. melanogaster*.

Le spiromésifène et le spirotétramate testés par ingestion sur les larves du second stade de *S.littoralis* réduisent les taux des acides gras de 10,33 et 8,67 %, respectivement ainsi que le nombre d'acides gras (Abdel-Fatah *et al.*, 2019).

Les lipides jouent également un rôle crucial dans la communication chimique, étant donné qu'ils participent à la synthèse des hydrocarbures cuticulaires, dont certains agissent comme phéromones (Howard et Blomquist, 2005). Au cours des dernières décennies, les aspects biochimiques, écologiques et comportementaux des HCs ont fait l'objet de nombreuses études chez les insectes (Ferveur, 2005 ; Howard et Blomquist, 2005 ; Smith *et al.*, 2009 ; Blomquist et Bagnères, 2010 ; Berson et Simmons, 2019). Les HCs couvrant la cuticule des insectes offrent une protection contre la dessiccation et d'autres problèmes environnementaux en agissant comme une barrière physique (Ferveur *et al.*, 2018) en réduisant la pénétration des insecticides, des produits chimiques et des toxines (Wang *et al.*, 2020). Les HCs offrent également une protection contre les attaques de micro-organismes, d'insectes parasites et de prédateurs (Gołębiowski *et al.*, 2013).

Chez la Drosophile, la composition des HCs peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'âge, le sexe, la maturation sexuelle, l'interaction avec le sexe opposé, la température,



la nourriture et les hormones (Blomquist *et al.*, 1987 ; ferveur, 2005 ; Everaerts *et al.*, 2010 ; Fedina *et al.*, 2012 ; Chiang *et al.*, 2016 ; Snellings *et al.*, 2018). Les modifications de profils des HCs peuvent affecter le comportement d'accouplement (Ferveur et Sureau, 1996). Conformément à nos attentes, le profil d'HC chez les adultes *D. melanogaster* a été modifié suite au traitement insecticide. Des effets similaires ont été enregistrés après application topique du spiromésifène chez les pupes nouvellement éxuvées de *D. melanogaster* (Bensafi-Gheraibia *et al.*, 2020). L'halofénozide, un agoniste des ecdystéroïdes, réduisait les quantités des principales HCs dans les larves de *C. pipiens* (Amira, 2013). Müller *et al.* (2017) ont également montré un impact négatif suite à une exposition sublétales aux pyréthroïdes sur le profil des HCs au cours des deux générations successives de *P. cochleariae*.

#### 4.5. Effet sur le comportement

Le développement, la reproduction et la survie des insectes dépendent de la perception de différents signaux sensoriels les informant sur la qualité de leur environnement (Thibert *et al.*, 2016). La chimio-perception est essentielle pour que les animaux détectent les aliments nutritifs, évitent les composés toxiques et trouvent un partenaire sexuel et une niche écologique adéquate comme c'est le cas chez la Drosophile (Desneux *et al.*, 2007 ; Badi, 2015). La détection chimio sensorielle est principalement contrôlée par des systèmes olfactif et gustatif. Le système olfactif sert à détecter à distance les molécules volatiles présentes dans l'environnement, alors que le système gustatif permet de détecter les molécules non-volatiles par contact (Roland et Rémi, 2013).

Des études récentes ont montré que les pesticides peuvent également interférer avec la communication chimique (systèmes olfactif et gustatif) des espèces exposées et donc provoquer des réponses comportementales inadéquates (Bayley, 2002 ; Guedes *et al.*, 2016). Le changement de comportement constitue un signal d'alerte précoce utile, car le comportement est 10 à 1000 fois plus sensible à la qualité de l'environnement que les estimations classiques de la CL<sub>50</sub> (Hellou *et al.*, 2008 ; Isman et Grieneisen, 2014). Les changements de comportement dus à l'exposition aux pesticides se produisent soit en raison du mode d'action du composé, soit en raison de la réponse génétiquement déterminée de l'organisme au pesticide lui-même ou aux modifications de l'environnement dans lequel le pesticide est utilisé, ce qui peut minimiser ou même renforcer les effets de l'exposition (Gould, 1984 ; Haynes, 1988).





#### 4.5.1. Effet sur la préférence olfactive et alimentaire

De nombreux travaux ont rapporté que l'exposition aux insecticides pouvait conduire à des défauts dans le comportement des insectes. Différents comportements peuvent être altérés comme la mobilité, la recherche de nourriture ou d'hôtes mais aussi le comportement alimentaire (Tomé *et al.*, 2013 ; Louat, 2013). En effet, dans la nature, les insectes consacrent une grande partie de leur vie à la recherche de nourriture, en grande partie pour pouvoir y déposer leur progéniture. Ce processus implique différents mécanismes comme la reconnaissance de multiples signaux chimiques ou sensoriels, mais aussi la mémoire et l'apprentissage (Dukas, 2008).

Cependant, les organes olfactifs et gustatifs sont particulièrement importants pour permettre aux insectes de bien évaluer et distinguer entre différentes sources alimentaires contenant des composés nutritifs ou des substances toxiques. Une mouche qui se déplace sur un substrat, est capable de percevoir des odeurs par des récepteurs olfactifs localisés sur ses antennes et palpes labiaux, et des stimuli sapides ou peu volatils par l'intermédiaire de sensilles gustatives localisées sur ses pattes, ses pièces buccales et éventuellement ses ailes et son ovipositeur. Ces organes peuvent la renseigner sur la présence de substances toxiques ou irritantes par contact (qui poussent la mouche à quitter l'environnement toxique) ou d'odeurs induisant une répulsion à distance (qui permet à la mouche d'éviter le contact avec un pesticide par exemple) (Agha, 2016). Il est largement admis que l'expérience alimentaire peut influencer la sélection de la plante-hôte chez les insectes phytophages. La théorie de la mémoire larvaire suggère que les insectes adultes montrent une préférence pour la plante-hôte sur laquelle ils se sont développés à l'état de larve et une mémoire du substrat alimentaire est stockée dans leur système nerveux central et transférée au cours de la métamorphose au stade adulte. Cependant, il existe encore peu de preuves du conditionnement pré-imaginal sur le choix des adultes car la métamorphose implique une restructuration majeure du système nerveux central, qui devrait effacer la plus grande partie de la mémoire chimique stockée par les larves (Barron, 2001). Alternativement, le concept d'héritage chimique de Corbet. (1985) suppose que l'empreinte chimique de la plante hôte peut être stockée dans l'hémolymphe de la larve puis à la surface de la nymphe. Ainsi, lorsque les jeunes adultes émergent, ils détectent les signaux chimiques émis par la plante-hôte à la surface des nymphes, ce qui entraîne des changements dans le comportement ultérieur de l'adulte. L'expérience acquise au cours du stade imago peut également induire une préférence. Il a été démontré que l'expérience de l'imago peut induire des préférences de sites de ponte chez certaines espèces de lépidoptères



(Traynier, 1984 ; Cunningham *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2007). Il est aussi possible que des modifications épigénétiques puissent traduire ces modifications intra- et intergénérationnelles (Remy et Hobert, 2005 ; Flaven-Pouchon *et al.*, 2014).

Dans notre étude, nous avons testé ces concepts en étudiant les effets de l'expérience alimentaire pré-imaginale avec des milieux traités avec différentes concentrations du spiromésifène sur la préférence ultérieure des adultes à cet insecticide. Les expériences menées en olfactomètre et en multiCafe ont montré que les mâles issus de larves qui se développent préalablement sur des milieux traités étaient attirés par les odeurs émises par ce dernier (milieu nutritif mélangé au spiromésifène) et choisissent de consommer la solution qui contient du spiromésifène contrairement aux témoins et aux femelles traitées qui choisissent le milieu témoin et évitent le spiromésifène.

Les travaux pionniers de Thorpe. (1939) puis de Hershberger and Smith. (1967) ont montré que des individus naïfs présentaient une aversion envers la menthe poivrée, contrairement aux individus exposés durant la vie larvaire qui montraient une attraction. Celle-ci était maintenue lorsque les pupes ou les larves de stade L3 étaient lavées à l'eau distillée, et lorsque les individus étaient isolés durant les premiers jours de leur vie imaginale (Thorpe, 1939). Manning. (1967) a montré des résultats similaires. Il a conditionné des larves à associer l'odeur aversive du géranioïl à une récompense alimentaire. Au stade adulte, les individus issus de ces larves conditionnées présentaient une diminution de l'aversion envers le géranioïl suggérant une mémoire associative persistante à travers la métamorphose.

L'identification globale du « message odeur » par l'insecte implique une succession d'événements qui se situent en trois niveaux complémentaires, le niveau moléculaire où s'établit l'interaction spécifique entre le stimulus et le système récepteur, le niveau cellulaire où s'effectue le codage olfactif, le niveau central où se fait la reconnaissance global du message qui finalement débouchera sur l'acte comportemental (Hadjeb, 2017; Habbachi, 2009). Cependant, cette préférence qu'on retrouve chez les mâles envers les milieux traités peut être induite suite à l'exposition précoce à cet insecticide, suggérant une mémoire attractive envers cette molécule. Une altération de la perception et/ou la transduction du signal peut également être à l'origine de cet impact. En revanche, de tels effets peuvent être dus également à des adjuvants de formulation plutôt qu'à la molécule elle-même (Walter, 1999 ; Liang *et al.*, 2003 ; Isman, 2006).



Certains insecticides peuvent avoir un effet répulsif sur les insectes. [Bezzar-Bendjazia et al. \(2016\)](#) ont montrés que l'application de l'azadirachtine chez les larves L3 de *D. melanogaster* induit une aversion des adultes envers cet insecticide ainsi qu'un effet anti-appétant et une perturbation de l'activité des enzymes digestives chez les larves et les adultes ont été noté ([Bezzar-Bendjazia et al., 2017](#)). Le spinosad présente un effet répulsif pour trois prédateurs du thrips des petits fruits (*Frankliniella occidentalis*). Cet effet répulsif est présent durant les deux premiers jours de la vie des prédateurs qui évitent les zones traitées au spinosad ([Rahman et al., 2011](#)). D'autres insecticides comme les carbamates et les organophosphorés provoquent une incapacité des abeilles à communiquer le lieu de la nourriture par une danse très spécifique ([Thompson, 2003](#)). L'exposition des abeilles à des doses sublétales d'imidaclopride (0,04 ng/larve) pendant leur développement n'affecte pas le développement des larves, mais les adultes présentent des défauts dans le comportement associé à l'olfaction. Ce défaut de comportement suggère une diminution de la mémorisation et de l'apprentissage des adultes qui ne seraient plus capables de localiser la nourriture et la direction de la ruche, ceci entraînant une réduction importante du nombre d'individus de la colonie ([Yang et al., 2012](#)).

#### 4.5.2. Effet sur le comportement sexuel et l'oviposition

La communication entre partenaires sexuels tient une place importante dans la parade nuptiale ; sans une communication efficace, les individus ne peuvent pas s'accoupler. Chez *D. melanogaster*, comme chez tous les animaux, la parade sexuelle a lieu avant l'accouplement : elle est composée de comportements stéréotypés propres à chaque sexe et requiert de nombreux signaux sensoriels ([Greenspan et Ferveur, 2000](#)). Le comportement des Drosophiles est basé sur la reconnaissance de substances chimiques et notamment de phéromones qui jouent un rôle important dans l'attraction et la discrimination des partenaires sexuels ([Markow et O'Grady, 2005](#) ; [Lasbleiz et al., 2006](#)).

Notre étude indique que l'exposition pré-imaginale au spiromésifène affecte la parade sexuelle des adultes. Outre son effet sur la diminution de la fertilité et de la fécondité, elle a également un impact sur la parade nuptiale et les comportements copulatoires. Par rapport aux couples témoins, les couples traités initient une copulation plus tardive et de plus courte durée. Ces effets peuvent être dû à l'altération de la réceptivité des femelles induite par le changement du profil des HCs des mâles et aussi des femelles ([Marcillac et al., 2005](#)). En général, la copulation des mouches *D. melanogaster* dure environ 20 minutes pendant



lesquelles le mâle transfère le sperme, diverses protéines et la phéromone d'acétate de cis-vaccenyle dans le tractus reproducteur de la femelle (Laturney et Billeter, 2016 ; Misra et Wolfner, 2020).

Nos résultats concordent avec les données obtenues par Kissoum *et al.* (2020) après application topique du spiromésifène sur les pupes nouvellement écloses de *D. melanogaster*. El-bah *et al.* (2016) ont noté que l'exposition à des concentrations sublétales d'extraits végétaux de *P. harmala*, affecte les différentes séquences du comportement sexuel chez la même espèce. Des perturbations du comportement sexuel et de la fécondité ont également été décrites dans des expériences utilisant d'autres insecticides. Chez *D. melanogaster*, l'azadirachtine modifie le comportement reproducteur des deux sexes *via* les processus d'accouplement et de post-accouplement (Aribi *et al.*, 2017).

Après l'accouplement, la seconde phase essentielle pour la reproduction de l'insecte est l'oviposition. Chez les espèces qui se nourrissent sur le site d'oviposition, le comportement de ponte des femelles répond à deux objectifs : pondre un maximum d'œufs le plus rapidement possible et placer ses œufs dans un environnement idéal afin d'augmenter la probabilité de survie des descendants (Cohen *et al.*, 2002 ; Joseph *et al.*, 2009 ; Notter-Hausmann et Dorn, 2010). Par conséquent, la première nourriture à laquelle la progéniture aura accès, sera généralement l'hôte sur lequel la femelle a pondu ses œufs. Dans ces conditions, une corrélation étroite devrait exister entre la préférence des femelles pour certains sites de ponte et la performance larvaire sur les plantes choisies par les femelles (hypothèse préférence/performance).

La capacité de la femelles *D. melanogaster* à évaluer la meilleure source de nourriture disponible où pondre dépend à la fois de sa capacité neurale à déterminer la qualité de la nourriture, mais aussi de son expérience. La préférence d'oviposition des femelles peut être influencée par différents facteurs tels que la température, la texture ou encore la couleur du substrat alimentaire (Fogleman, 1979 ; Takamura et Fuyama, 1980 ; Battesti *et al.*, 2014) ainsi que des facteurs internes (génétiques et non génétiques), reflétant l'état physiologique de la femelle (Jallow *et al.*, 2004).

L'environnement peut avoir également un effet sur le comportement de ponte chez les insectes. Certains pesticides peuvent être répulsifs pour les insectes provoquant une diminution du nombre d'œufs pondus. L'effet répulsif des insecticides peut également induire



une diète ou une baisse de l'alimentation chez l'insecte pouvant conduire à une réduction de la fécondité (Li *et al.*, 2007).

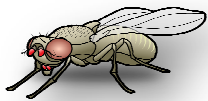
Les résultats obtenus en condition de choix montrent une préférence d'oviposition sur un milieu témoin que sur un milieu traité. Une diminution importante du nombre d'œufs pondus a été enregistrée chez les femelles traitées par rapport aux témoins. Des résultats similaires ont été notés avec les extraits de *P. harmala* sur la fertilité et le choix de ponte chez *D. melanogaster* (El-Bah *et al.*, 2016), *Callosobruchus chinensis* (Meera et Mann, 2002), la mouche de pêche, *Bactrocera zonata* (Khattak *et al.*, 2006 ; Rehman *et al.*, 2009a) et la mouche de fruit d'olive, *Bactrocera oleae* (Rehman *et al.*, 2009b). Le spirotétramate a un effet répulsif sur *C. pipiens* avec seulement trois pontes dans le milieu traité contre 26 dans le milieu témoin (Matoug, 2018). L'impact négatif de l'azadirachtine sur l'oviposition a été aussi noté chez plusieurs espèces d'insectes (Riba *et al.*, 2003 ; Tomé *et al.*, 2013 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2017)

Nos résultats révèlent également que l'aversion au spiromésifène semble être plus importante chez les individus ayant été préalablement exposés à l'insecticide en comparaison aux femelles naïves, suggérant une mémoire de l'aversion à cette molécule. Des études récentes appuient nos résultats et rapportent l'impact de l'expérience pré-imaginale sur le comportement et la prise de décision chez les adultes ; elles traduisent cette capacité de conservation de la mémoire de l'apprentissage à travers les stades de développement (Dukas, 2008 ; Abed-Vieillard *et al.* 2014 ; Flaven-Pouchon *et al.*, 2014 ; Abed-Vieillard et Cortot, 2016 ; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2017). De plus, selon Krause Pham et Ray. (2015) l'aversion olfactive semble être conservée chez les différentes espèces de *Drosophile*.

**CONCLUSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**



## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a été envisagée compte tenu de l'intérêt du spiromésifène (sélectivité, molécule alternative dans la gestion de la résistance aux insecticides), du mécanisme d'action (encore mal connu) sur les lipides et du rôle majeur des lipides dans la communication chimique et la reproduction. Les expérimentations menées, en continuité avec les travaux antérieurs, visaient à évaluer l'effet d'une formulation commerciale du spiromésifène (Oberon<sup>R</sup>) sur plusieurs paramètres en vue d'approfondir son mode d'action.

Dans une première partie, nous avons évalué la toxicité du spiromésifène administré par application topique sur les larves du dernier stade (L3). Les paramètres de létalité ont été déterminés. Le spiromésifène a été administré par application topique à deux concentrations sublétales (CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub>) et ses effets évalués sur le taux de lipides totaux corporels et du MDA, un biomarqueur de la peroxydation lipidique. Les analyses biochimiques révèlent que le spiromésifène réduit de manière significative la teneur en lipides corporels chez les pupes traitées à tous les âges du développement nymphal et ceci suivant une relation dose-réponse significative. On enregistre également une induction du taux de MDA chez les séries traitées, comparativement aux témoins. Ceci révèle que le spiromésifène induit un stress oxydatif qui conduit à la peroxydation des lipides. Le statut normal est restauré 3 jours après traitement, ce qui suggère l'activation d'un système de détoxication des peroxydes lipidiques.

Dans la seconde partie de notre étude, les effets du spiromésifène administré par ingestion/contact au cours du développement pré-imaginal, ont été mesurés sur la toxicité, le développement, la reproduction, les acides gras (AGs), les hydrocarbures cuticulaires (HCs), et le comportement d'individus *D. melanogaster*. Les données acquises montrent que l'insecticide prolonge la durée de développement des stades larvaire et pupal, et qu'il diminue le poids frais et la teneur en eau des adultes ainsi que la survie des mâles ayant survécu au traitement. De plus, le spiromésifène affecte le potentiel reproducteur en réduisant la fécondité des adultes *D. melanogaster* qui survivent au traitement. Le spiromésifène réduit également la quantité des AGs et modifie le profil des HCs chez les adultes (mâles et femelles) confirmant ainsi les diverses conséquences de son mécanisme d'action primaire sur la biosynthèse des lipides.



De plus, le traitement provoque une diminution du poids frais des ovaires et ceci suivant une relation dose-réponse significative. Les analyses biochimiques révèlent que ce produit affecte la composition biochimique des ovaires en réduisant de manière significative leurs teneurs en glucides, protéines et lipides totaux au cours de la maturation sexuelle selon la dose appliquée, et comparativement aux témoins. L'ensemble des résultats suggère que le spiromésifène, administré par ingestion (et contact), interfère avec le processus de vitellogénèse *via* la synthèse dans le corps gras et/ou l'incorporation des précurseurs dans les ovocytes.

Enfin, l'exposition au spiromésifène provoque des réponses comportementales inadéquates en interférant probablement avec des mécanismes de communication chimique (systèmes olfactif et gustatif). Les résultats des tests réalisés en olfactomètre et dans le dispositif de multiCafe montrent une attraction claire des mâles traités envers cette molécule comparativement aux témoins. Ce traitement provoque aussi des troubles importants du comportement sexuel et révèle l'existence d'une différence significative entre les séries témoins et traitées ; ceci peut être expliqué par les perturbations induites sur les HCs dont certains sont impliqués dans la reconnaissance des partenaires sexuels (mâles et femelles) lors de la parade. De plus, nos résultats indiquent que les femelles préfèrent pondre sur le milieu témoin plutôt que sur les milieux traités. Ceci confirme notre hypothèse quant à l'impact de l'expérience précoce sur le comportement et la prise de décision chez les adultes. Ceci pourrait traduire la capacité de conservation de la mémoire de l'apprentissage à travers les stades de développement chez cet insecte holométabole à métamorphose complète.

L'ensemble des résultats acquis lors de cette thèse confirme le mécanisme d'action primaire du spiromésifène sur la synthèse des lipides et des acides gras chez la drosophile et révèle son action différée sur le développement, la reproduction et le comportement des mouches. A l'avenir, il serait intéressant d'envisager des expériences complémentaires pour obtenir des informations plus précises sur l'impact du traitement chez *D. melanogaster* :

- Mesurer par PCR le niveau de transcription des différents gènes du métabolisme pour déterminer l'action du spiromésifène sur ces gènes.
- Vérifier par RT-qPCR, si le niveau d'ARNm de la désaturase est affecté chez les mouches traitées au spiromésifène.





- L'importance des changements métaboliques dus au spiromésifène sur les 3 familles d'enzymes de détoxification parmi les plus connues pour leurs rôles dans la résistance aux insecticides, notamment les mono-oxygénases, les estérases et les réductases, mérité d'être abordé.
- Mesurer la réponse électrophysiologique extracellulaire individuelle de quelques sensilles gustatives des palpes labiaux. La réponse pourrait être examinée suivant la stimulation à deux molécules sapides (soit le saccharose, soit la caféine) dont les réponses ont été bien caractérisées chez la drosophile.
- Mesurer l'activité locomotrice ainsi que l'activité de l'acétylcholinestérase pour tester l'éventuel effet neurotoxique de l'insecticide.
  - Effectuer des tests comportementaux dans un tunnel de vol : la réalisation de tels tests pourrait permettre de mesurer le comportement en trois dimensions. Cette technique nous renseignerait sur les mécanismes d'orientation en vol des individus traités et témoins soumis à des stimuli chimiques dans un environnement proche de celui rencontré dans la nature.

Ces expériences seraient mises en œuvre afin d'approfondir le mécanisme d'action du produit et d'affiner la compréhension de ses effets aux niveaux moléculaire et comportemental.

# **RESUMES**



## Résumé

Cette étude vise à examiner les effets d'un produit phytosanitaire largement utilisé contre les ravageurs phytophages, le spiromésifène un inhibiteur de la synthèse des lipides, sur diverses réponses (toxicologique, physiologique et comportementale) chez *Drosophila melanogaster*, Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), un modèle de référence.

Dans un premier temps, une formulation commerciale du spiromésifène (Oberon<sup>R</sup>) a été testée par application topique sur les larves du dernier stade (L3), et les paramètres de létalité (droite de régression, doses sublétales et létales avec leurs intervalles de confiance et Slope) ont été déterminés selon les procédures conventionnelles de toxicologie (Analyse des probit). Les concentrations sublétales déterminées précédemment (CL10 : et CL25 : µg/larve) entraînent une réduction significative du taux de lipides chez les pupes à tous les âges et ceci selon une relation dose-réponse. Le traitement induit une augmentation rapide du taux de malondialdéhyde par rapport aux témoins.

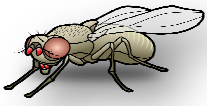
Dans un second temps, cette formulation a été administré par ingestion (et contact) uniquement au cours du développement pré-imaginal chez *D. melanogaster*. Cinq concentrations variant entre 1 et 10 µg/g ont été testées. La molécule manifeste une activité insecticide avec une relation dose-réponse significative. Aux plus fortes concentrations, elle allonge la durée du développement larvaire et pupal, et diminue le poids frais et sec des adultes avec un effet dose-dépendant, ainsi qu'une réduction de la survie des mâles, et ce, comparativement aux témoins. Le traitement provoque une diminution du poids frais des ovaires, ainsi qu'une réduction de la teneur en glucides, protéines et lipides totaux au cours de la maturation sexuelle. Le spiromésifène affecte aussi la fécondité des femelles en réduisant de manière significative le nombre d'œufs pondus. En outre, il réduit quantitativement le taux des acides gras et des hydrocarbures cuticulaires, à rôle potentiellement phéromonal chez les mâles et les femelles selon la concentration appliquée. Le spiromésifène affecte aussi le comportement d'accouplement de *D. melanogaster* en retardant sa latence et en réduisant sa durée.



En outre, il influence le choix du site d'oviposition des femelles survivantes au traitement. Une préférence claire d'oviposition sur un milieu non traité par rapport à un milieu traité est notée reflétant une aversion à cette molécule. L'exposition pré-imaginale à cet insecticide renforce cette aversion suggérant une mémorabilité de l'aversion à cette molécule.

Enfin, le spiromésifène affecte les choix olfactif et alimentaire des mâles adultes, ceci traduit une modification de l'attraction envers cette molécule. Nos résultats confirment le mécanisme d'action primaire du spiromésifène sur les lipides. Il est probable que les perturbations du métabolisme lipidique soient responsables des altérations du potentiel reproducteur (comportement, phéromones cuticulaires) *via* la vitellogénèse.

**Mots clés :** *Drosophila melanogaster*, Pesticides, Mode d'action, Spiromésifène, Lipides, Acides gras, Hydrocarbures cuticulaires, Reproduction, Comportement.



## Abstract

This study aims to examine the effects of spiromesifen, a widely used crop protection product, an inhibitor of lipid synthesis, against phytophagous pests. In our study, we measured, various responses (toxicological, physiological and behavioural) in *Drosophila melanogaster*, Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), a reference model.

First, a commercial formulation of spiromesifen (OberonR) was tested by topical application on late third instar larvae (L3), and lethality parameters (regression line, sublethal and lethal doses with their confidence intervals and Slope) were determined according to conventional toxicology procedures (Probit Analysis). The previously determined sublethal concentrations (LC10: and LC25:  $\mu\text{g}/\text{larve}$ ) resulted in a significant reduction of lipid levels in pupae, at all ages with a dose-response relationship. Treatment induced a rapid increase in MDA levels as compared to controls.

Second, this formulation was administered by ingestion (and contact) only during pre-imaginal development in *D. melanogaster*. Five concentrations ranging from 1 to 10  $\mu\text{g}/\text{g}$  were tested. The molecule showed insecticidal activity with a significant dose-response relationship. At the highest concentrations, it increased the duration of nymphal and pupal development, and decreased the fresh and dry weight of adults with a dose-dependent effect. It also reduced survival of adult males as compared to controls. The treatment caused a decrease in fresh weight of the ovaries, as well as a reduction in carbohydrate, protein and total lipid content during sexual maturation. Spiromesifen also affects fecundity by significantly reducing the number of eggs laid. In addition, it reduced the levels of fatty acids and cuticular hydrocarbons, some of which having a pheromonal role, in males and females depending on the concentration used.

Spiromesifen also affects the copulatory behavior of *D. melanogaster* by delaying its latency and reducing its duration. In addition, it influences the choice of oviposition site of females surviving to treatment. A clear preference for oviposition on an untreated medium over a treated medium reflecting an aversion to this molecule. Pre-imaginal exposure to this insecticide reinforces this aversion suggesting a memorability of aversion to this molecule.



Finally, spiromesifen affects the olfactory and food choices of adult males, suggesting a modification of the attraction to this molecule. Our results confirm the primary mechanism of action of spiromesifen on lipids. It is likely that disturbances in lipid metabolism are responsible for alterations in reproductive potential (behavior, cuticular pheromones) *via* the vitellogenesis process.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*, Pesticides, Mode of action, Spiromesifen, Lipids, Fatty acids, Cuticular hydrocarbons, Reproduction, Behavior.



## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير أحد منتجات وقاية النبات المستخدمة على نطاق واسع ضد العث والحشرات، Spiromésifène، مثبط لتركيب الدم، حيث تم اختبار آثاره الشبه مميتة على العديد من الجوانب (السمية، الفسيولوجية والسلوكية) لذبابة الخل (*Drosophila melanogaster*، Meigen، 1830 (Diptera، Drosophilidae).

في سلسلة أولى من التجارب تم اختبار تركيبة تجارية من Spiromésifène (OberonR) بالتطبيق الموضوعي على يرقات الطور الأخير (L3) مع تحديد الجوانب المميتة (خط الانحدار والجرعات شبه المميتة والمميتة مع فترات الثقة والميل) وفقاً لإجراءات السموم التقليدية (تحليل بروت). الجرعات شبه مميتة المحددة سابقاً (CL10 و CL25): ميكروغرام / يرقة) تؤدي إلى انخفاض كبير في مستوى الدهون في الشرائق في جميع الأعمار وهذا وفقاً لعلاقة الجرعة والاستجابة. يؤدي العلاج إلى زيادة سريعة في مستوى MDA مقارنة بالشهود.

ثانياً، تم تجريب هذه التركيبة عن طريق الابتلاع (والاتصال) فقط أثناء التطور قبل الشرنقة لـ *D. melanogaster*. تم اختبار خمسة تركيزات تتراوح بين 1 و 10 ميكروغرام / غرام. يُظهر المحلول نشاطاً مبيداً للحشرات مع وجود علاقة كبيرة بين الجرعة والاستجابة. في أعلى التركيزات، يطيل فترة نمو اليرقات والشرانق، ويقلل من وزن البالغين مع تأثير يعتمد على الجرعة، بالإضافة إلى انخفاض في مدة حياة الذكور، مقارنة بالشهود. يتسبب المبيد في انخفاض الوزن الطازج للمبايض، وكذلك انخفاض في محتوى الكربوهيدرات والبروتينات والدهون الكلية أثناء النضج الجنسي. يؤثر Spiromésifène أيضاً على خصوبة الإناث عن طريق تقليل عدد البيض الذي يتم وضعه بشكل كبير. بالإضافة إلى ذلك، فإنه يقلل بشكل كمي من مستوى الأحماض الدهنية والهيديروكربونات الجلدية، ويحتمل أن يكون له دور فورموني عند الذكور والإناث اعتماداً على التركيز المطبق. يؤثر Spiromésifène أيضاً على سلوك التزاوج لـ *D. melanogaster* عن طريق تأخير زمن انتقاله وتقليل مدته. بالإضافة إلى ذلك، فإنه يؤثر على اختيار موقع وضع البيض للناجيات من العلاج حيث نلاحظ تفضيل واضح لوضع البيض على وسط غير معالج على وسط معالج يعكس النفور من هذا الجزيء.

أخيراً، يؤثر Spiromésifène على خيارات حاسة الشم والغذاء للذكور البالغين، مما يعكس تغييراً في الانجذاب إلى هذا الجزيء. تؤكد نتائجنا الآلية الأساسية لعمل Spiromésifène على الدهون. من المحتمل أن الاضطرابات في التمثيل الغذائي للدهون هي المسؤولة عن التغييرات في القدرة الإنجابية (السلوك، الفرمونات الجلدية) عن طريق التكوّن.

**الكلمات المفتاحية:** *Drosophila melanogaster*، مبيدات، المبايض، النمو، Spiromésifène، الدهون، الهيديروكربونات الجلدية، التكاثر، السلوك الجنسي.

**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.
- Abdel-Aal, A. E. (2006).** Effect of chlorfluzuron, nuclear polyhydrosis virus (SLNPV) and *Bacillus thuringiensis* on some biological and enzyme activity of cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Bulletin of the Entomological Society of Egypt Economic series*, 32, 171-185.
- Abdel-Fatah, R. M., Mohamed, S. M., Aly, A. A., & Sabry, A. K. H. (2019).** Biochemical characterization of spiromesifen and spirotetramat as lipid synthesis inhibitors on cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-6.
- Abed-Vieillard, D., & Cortot, J. (2016).** When choice makes sense : Menthol influence on mating, oviposition and fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in integrative neuroscience*, 10, 5.
- Abed-Vieillard, D., Cortot, J., Everaerts, C., & Ferveur, J. F. (2014).** Choice alters *Drosophila* oviposition site preference on menthol. *Biology open*, 3(1), 22-28.
- Agha, M. A. (2016).** *Physiologie des récepteurs gustatifs chez la mouche de vinaigre (Drosophila melanogaster)*. Thèse de doctorat. Université Paris-Saclay.
- Ali, N. S., Ali, S. S., & Shakoori, A. R. (2014).** Biochemical response of malathion-resistant and -susceptible adults of *Rhyzopertha dominica* to the sublethal doses of deltamethrin. *Pakistan Journal of Zoology*, 46 (2) :853–861.
- Alimohammadi, N., Samih, M., Izadi, H., & Shahidi Noghabi, S. (2014).** Developmental and biochemical effects of hexaflumuron and spirodiclofen on the ladybird beetle, *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera : Coccinellidae). *Journal of Crop Protection*, 3(3), 335-344.
- Alizadeh, M., Karimzadeh, J., Rassoulia, G. R., Farazmand, H., Hoseini-Naveh, V., & Pourian, H. R. (2012).** Sublethal effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue, on *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae) : life table study. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(14), 1741-1763.
- Allais, J. P., Bergerard, J., Etienne, J., & Polonovski, J. (1964).** Nature et évolution des lipides au cours de l'embryogenèse de *Locusta migratoria migratorioides* L. *Journal of Insect Physiology*, 10(5), 753-772.
- Altieri, M. A. & Nicholls, C. I. (2004).** Biodiversity and pest management in agroecosystems. 2nd edn, Binghamton, New York, *Haworth Press Inc*, 253.
- Amira, K., Boudjelida, H., & Farine, J. P. (2013).** Effect of an insect growth regulator (halofenozide) on the cuticular hydrocarbons of *Culex pipiens* larvae. *African Entomology*, 21(2), 343-348.



- Amrutsagar, M.V., & Joshi, S.S. (2017).** Insect repellent induced lipid diversions of *Periplaneta americana*. *International Journal of Recent Scientific Research*, 8(7), 18370–18372.
- Antony, C., & Jallon, J. M. (1982).** Cuticular aphrodisiacs from *Drosophila* and other Diptera. *Bulletin de la Societe zoologique de France*, 107,639-644.
- Anxolabehere, D. (1978).** Analyse expérimentale et théorique du rôle des valeurs sélectives variables dans le maintien du polymorphisme au locus *Sepia* chez *Drosophila melanogaster*. Thèse de doctorat, Université de Paris 7.
- Aribi, N., Oulhaci, M. C., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J. C., Kaiser, L., Denis, B., & 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.
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010).** Insect fat body : energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, 55, 207-225.
- Ashburner, M., & Thompson Jr, J. N. (1978).** Laboratory culture of *Drosophila*. *Genetics and biology of Drosophila*, 2, 81-109.
- Badi, A. (2015).** Effets sublétaux d'un régulateur de croissance des insectes, le tébufénozide, sur la communication chimique et la reproduction de *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba.
- Badji, C. A., Guedes, R. N. C., Silva, A. A., Corrêa, A. S., Queiroz, M. E. L. R., & Michereff-Filho, M. (2007).** Non-target impact of deltamethrin on soil arthropods of maize fields under conventional and no-tillage cultivation. *Journal of Applied Entomology*, 131(1), 50-58.
- Baer, B., Morgan, E. D., & Schmid-Hempel, P. (2001).** A nonspecific fatty acid within the bumblebee mating plug prevents females from remating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 3926-3928.
- Bairi, Y. (2020)** Biosurveillance de la qualité des sols par utilisation d'une espèce bioindicatrice de la pollution *Helix aspersa* (mollusque, gasteropode) : Impact de l'oberon. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba.
- Band, P. R., Abanto, Z., Bert, J., Lang, B., Fang, R., Gallagher, R. P., & Le, N. D. (2011).** Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *The Prostate*, 71(2), 168-183.
- Barnes, A. I., Wigby, S., Boone, J. M., Partridge, L., & Chapman, T. (2008).** Feeding, fecundity and lifespan in female *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1643), 1675-1683.



- Barron, A. B. (2001).** The life and death of Hopkins' host-selection principle. *Journal of Insect Behavior*, 14(6), 725-737.
- Battesti, M., Moreno, C., Joly, D., & Mery, F. (2015).** Biased social transmission in *Drosophila* oviposition choice. *Behavioral ecology and sociobiology*, 69(1), 83-87.
- Bauerfeind, S. S., Fischer, K., Hartstein, S., Janowitz, S., & Martin-Creuzburg, D. (2007).** Effects of adult nutrition on female reproduction in a fruit-feeding butterfly: the role of fruit decay and dietary lipids. *Journal of Insect Physiology* 53:964-973.
- Bayley, M. (2002).** Basic behaviour : the use of animal locomotion in behavioural ecotoxicology. *Behavioural ecotoxicology*, 211-230.
- Bensafi-Gheraibia, H., Kissoum, N., Hamida, Z. C., Farine, J. P., & Soltani, N. (2020).** Topical bioassay of Oberon® on *Drosophila melanogaster* pupae : delayed effects on ovarian proteins, cuticular hydrocarbons and sexual behaviour. *Invertebrate Reproduction & Development*, 1-13.
- Bensafi-Gheraibia, H., Menail, A. H., & Soltani, N. (2013).** Activité d'un inhibiteur de la synthèse des lipides (spiromesifen) chez *Drosophila melanogaster* : taux et peroxydation lipidiques et effet sur la descendance. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 138(1-4), 189-199.
- Bensebaa, F., Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., & Soltani, N. (2015).** Evaluation of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae): Insecticidal activity, ecdysteroid contents and cuticle formation. *European Journal of Entomology*, 112(4), 625-631.
- Berson, J. D., & Simmons, L. W. (2019).** Female cuticular hydrocarbons can signal indirect fecundity benefits in an insect. *Evolution* 73:982-989.
- Besard, L., Mommaerts, V., Abdu-Alla, G., & Smagghe, G. (2011).** Lethal and sublethal side-effect assessment supports a more benign profile of spinetoram compared with spinosad in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Pest Management Science*, 67(5), 541-547.
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S., & Aribi, N. (2016).** Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 85-90.
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S., Ferdenache, M., & Aribi, N. (2017).** Azadirachtin induced larval avoidance and antifeeding by disruption of food intake and digestive enzymes in *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 143, 135-140.



- Bianchi, F. J., Booij, C. J. H., & Tschardtke, T. (2006).** Sustainable pest regulation in agricultural landscapes : a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 273(1595), 1715-1727.
- Bliss, C. I. (1938).** The determination of the dosage-mortality curve from small numbers. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 192-216.
- Blomquist, G. J., & Bagnères, A. G. (2010).** Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology, Cambridge University Press, New York.
- Blomquist, G. J., Nelson, D. R., & De Renobales, M. (1987).** Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 6(4), 227-265.
- Bolzonella, C., Lucchetta, M., Teo, G., Boatto, V., & Zanella, A. (2019).** Is there a way to rate insecticides that is less detrimental to human and environmental health?. *Global Ecology and Conservation*, 20, e00699.
- Bouabida, H., Tine-Djebbar, F., Tine, S., & Soltani, N. (2017a).** Activity of spiromesifen on growth and development of *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) : toxicological, biometrical and biochemical aspects. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(1), 572-577.
- Bouabida, H., Tine-djebbar, F., Tine, S., & Soltani, N. (2017b).** Activity of a lipid synthesis inhibitor (spiromesifen) in *Culiseta longiareolata* (Diptera : Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1120-1124.
- Boulahbel, B., Aribi, N., Kilani-Morakchi, S., & Soltani, N. (2015).** Activity of neem oil in *Drosophila melanogaster* : toxicity and delayed effect on the progeny. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3, 306-310.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., & Deudero, S. (2007).** Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 531-539.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method of the quantitation microgram quantities of Protein utilising the principale dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248- 254.
- Bretschneider, T., Benet-Buchholz, J., Fischer, R., & Nauen, R. (2003).** Spirodiclofen and spiromesifen–novel acaricidal and insecticidal tetronic acid derivatives with a new mode of action. *Chimia International Journal for Chemistry*, 57(11), 697-701.
- Bretschneider, T., Fischer, R., Nauen, R., Lamberth, C., & Dinges, J. (2012).** Tetronic acid insecticides and acaricides inhibiting acetyl-CoA carboxylase. *Bioactive Heterocyclic Compound Classes : Agrochemicals* (eds C. Lamberth and J. Dinges), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 265-278.



- Briegel, H. (1990).** Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of insect Physiology*, 36(3), 165-172.
- Campbel, N., Reece. J. (2004).** Biologie. Adaptation et revision scientifique de Richard. Mathieu, 2<sup>ème</sup> Edition de Boeck. 1482 p.
- Carson, R. 1962.** Silent spring. Boston, Massachusetts, USA.
- Carvalho, F.P. (2017).** Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60.
- Carvalho, S. M., Belzunces, L. P., Carvalho, G. A., Brunet, J. L., & Badiou-Beneteau, A. (2013).** Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality : a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(9), 2117-2124.
- Ceuppens, B., Eeraerts, M., Vleugels, T., Cnops, G., Roldan-Ruiz, I., & Smagghe, G. (2015).** Effects of dietary lambda-cyhalothrin exposure on bumblebee survival, reproduction, and foraging behavior in laboratory and greenhouse. *Journal of pest science*, 88(4), 777-783.
- Chareonviriyaphap, T., Bangs, M. J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V., & Ngoen-Klan, R. (2013).** Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & vectors*, 6(1), 1-28.
- Cherif, A., Ichaoui, O., Barhoumi-Attia, S., & Lebdi-Grissa, K. (2018).** Life-stage-dependent side effects of selected insecticides on *Trichogramma cacoeciae* (Marchal) (hymenoptera: Trichogrammatidae) under laboratory conditions. *Phytoparasitica*, 46:105-113.
- Chiang, Y. N., Tan, K. J., Chung, H., Lavrynenko, O., Shevchenko, A., & Yew, J. Y. (2016).** Steroid hormone signaling is essential for pheromone production and oenocyte survival. *PLoS Genetics*, 12(6), e1006126.
- Chino, H., Katase, H., Downer, R. G., & Takahashi, K. (1981).** Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the American cockroach : purification, characterization, and function. *Journal of lipid research*, 22(1), 7-15.
- Cloyd, R. A., Galle, C. L., & Keith, S. R. (2006).** Compatibility of three miticides with the predatory mites *Neoseiulus californicus* McGregor and *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari : Phytoseiidae). *HortScience*, 41(3), 707-710.
- Cohen, R. W., Mahoney, D. A., & Can, H. D. (2002).** Possible regulation of feeding behavior in cockroach nymphs by the neurotransmitter octopamine. *Journal of insect behavior*, 15(1), 37-50.
- Corbet, S. A. (1985).** Insect chemosensory responses : a chemical legacy hypothesis. *Ecological Entomology*, 10(2), 143-153.



**Cordeiro, E. M. G., De Moura, I. L. T., Fadini, M. A. M., & Guedes, R. N. C. (2013).** Beyond selectivity : are behavioral avoidance and hormesis likely causes of pyrethroid-induced outbreaks of the southern red mite *Oligonychus ilicis*?. *Chemosphere*, 93(6), 1111-1116.

**Costa, M. A., Moscardini, V. F., da Costa Gontijo, P., Carvalho, G. A., de Oliveira, R. L., & de Oliveira, H. N. (2014).** Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). *Ecotoxicology*, 23(8), 1399-1408.

**Cruzeiro, C., Rocha, E., & Rocha, M. J. (2017).** Pesticides in Worldwide Aquatic Systems : Part I. In *Estuary*. IntechOpen.

**Cunningham, J. P., Jallow, M. F., Wright, D. J., & Zalucki, M. P. (1998).** Learning in host selection in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae). *Animal Behaviour*, 55(1), 227-234.

**De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (2003).** The missing biomarker link : Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry : An International Journal*, 22(7), 1632-1641.

**Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007).** The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology.*, 52, 81-106.

**Desneux, N., Fauvergue, X., Dechaume-Moncharmont, F. X., Kerhoas, L., Ballanger, Y., & Kaiser, L. (2005).** *Diaeretiella rapae* limits *Myzus persicae* populations after applications of deltamethrin in oilseed rape. *Journal of Economic Entomology*, 98(1), 9-17.

**Dethier, V. G. (1980).** Food-aversion learning in two polyphagous caterpillars, *Diacrisia virginica* and *Estigmene congrua*. *Physiological Entomology*, 5(4), 321-325.

**Djeghader, N. E. H., Aïssaoui, L., Amira, K., & Boudjelida, H. (2014).** Impact of a chitin synthesis inhibitor, Novaluron, on the development and the reproductive performance of mosquito *Culex pipiens*. *World Applied Sciences Journal*, 29(7), 954-960.

**Djemaoun, A., Habes, D., & Soltani, N. (2015).** Effects of ingested indoxacarb (Oxadiazine) on biochemical composition of ovaries in *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(3): 362-366.

**Draper, H. H., & Hadley, M. (1990).** [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*, 186, 421-431.

**Dukas, R. 2008.** Evolutionary biology of insect learning. *Annual review of entomology*. 53:145-160.

**Duvhateau, G., & Florkin, M. (1959).** Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 67(2), 306-314.

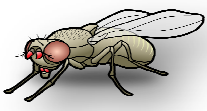


- El-Bah, D., Habbachi, W., Ouakid, M. L., & Tahraoui, A. (2016).** Sublethal effects of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) on sexual behavior and oviposition in fruit fly *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4, 638-642.
- European Food Safety Authority. (2012).** Reasoned opinion on the modification of the existing MRL for spiromesifen in tea. *EFSA Journal*, 10(12), 3050.
- Everaerts, C., Farine, J. P., Cobb, M., & Ferveur, J. F. (2010).** *Drosophila* cuticular hydrocarbons revisited : mating status alters cuticular profiles. *PloS One*, 5(3), e9607.
- FAO. (2001).** *The State of Food and Agriculture 2001* (No. 33). Food & Agriculture Org.
- Fedina, T. Y., Kuo, T. H., Dreisewerd, K., Dierick, H. A., Yew, J. Y., & Pletcher, S. D. (2012).** Dietary effects on cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila*. *PloS One*, 7(12), e49799.
- Flaven-Pouchon, J., Garcia, T., Abed-Vieillard, D., Farine, J. P., Ferveur, J. F., & Everaerts, C. (2014).** Transient and permanent experience with fatty acids changes *Drosophila melanogaster* preference and fitness. *PLoS One*, 9(3), e92352.
- Ferveur, J. F. (2005).** Cuticular hydrocarbons : their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behavior Genetics*, 35(3), 279-295.
- Ferveur, J. F., Cortot, J., Rihani, K., Cobb, M., & Everaerts, C. (2018).** Desiccation resistance : effect of cuticular hydrocarbons and water content in *Drosophila melanogaster* adults. *PeerJ*, 6, e4318.
- Ferveur, J. F., & Sureau, G. (1996).** Simultaneous influence on male courtship of stimulatory and inhibitory pheromones produced by live sex-mosaic *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 263(1373), 967-973.
- Feyereisen, R. (2020).** Origin and evolution of the CYP4G subfamily in insects, cytochrome P450 enzymes involved in cuticular hydrocarbon synthesis. *Molecular phylogenetics and evolution*, 143, 106695.
- Finney, D.J. (1971).** Probit Analysis, *Cambridge University Press, UK*. 333p.
- Fisher, R. A. et Yates, F. (1957).** Statical tables for biological agricultural and medical research. 5<sup>eme</sup> edition, Olivier et Boyd. London. 64-66.
- Fogleman, J. C. (1979).** Oviposition site preference for substrate temperature in *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics*, 9(5), 407-412.



- Fourrier, J., Deschamps, M., Droin, L., Alaux, C., Fortini, D., Beslay, D., Le Conte, Y., Devillers, J., Aupinel, P., & Decourtye, A. (2015).** Larval exposure to the juvenile hormone analog pyriproxyfen disrupts acceptance of and social behavior performance in adult honeybees. *PloS One*, 10(7), e0132985.
- Funes, V., Alhama, J., Navas, J. I., López-Barea, J., & Peinado, J. (2006).** Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*, 139(2), 214-223.
- Gade, G., Hoffmann, K. H., & Spring, J. H. (1997).** Hormonal regulation in insects : facts, gaps, and future directions. *Physiological reviews*, 77(4), 963-1032.
- Gagné, F., Pardos, M., & 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.
- Gerber, B., & Stocker, R. F. (2007).** The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning : a review. *Chemical senses*, 32(1), 65-89.
- Gerber, B., Stocker, R. F., Tanimura, T., & Thum, A. S. (2009).** Smelling, tasting, learning : *Drosophila* as a study case. *Chemosensory systems in mammals, fishes, and insects*, 187-202.
- Gibbs, A. G., & Crockett, E. L. (1998).** The biology of lipids: integrative and comparative perspectives. *American Zoologist*, 38:265-267.
- Gibbs, A. G., & Rajpurohit, S. (2010).** Cuticular lipids and water balance. *Insect hydrocarbons : biology, biochemistry, and chemical ecology*, 100-120.
- Gilbert, E. H., Kwak, S. J., Chen, R., & Mardon, G. (2013).** *Drosophila* signal peptidase complex member Spase12 is required for development and cell differentiation. *PloS One*, 8(4), e60908.
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R., & Warren, J. T. (2002).** Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual review of entomology*, 47(1), 883-916.
- Gilbert, S.F. (1996).** Biologie du développement. 4ème édition, De Boeck, ISBN2-8041-2263-8, p 892.
- Goldsworthy, A. C., Mordue, W., & Guthkelch, J. (1972).** Studies on insect adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinol*, 18: 306-314.
- Gołębiowski, M., Cerkowniak, M., Boguś, M. I., Włóka, E., Dawgul, M., Kamysz, W., & Stepnowski, P. (2013).** Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. *Journal of Insect Physiology*, 59(4), 416-429.
- Gould, F. (1984).** Role of behavior in the evolution of insect adaptation to insecticides and resistant host plants. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 30(4), 34-41.





**Greenspan, R. J., & Ferveur, J. F. (2000).** Courtship in drosophila. *Annual review of genetics*, 34(1), 205-232.

**Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D.T., Lewontin, R. C., & Gelbart W. M. (2002).** Introduction a l'analyse genetique. 3e edition *De Boeck*, chapter 7, p 222.

**Grillet, M., Dartevelle, L., & Ferveur, J. F. (2006).** A Drosophila male pheromone affects female sexual receptivity. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 273(1584), 315-323.

**Gruntenko, N., & Rauschenbach, I. (2009).** 20-hydroxyecdysone, juvenile hormone and biogenic amines : Mechanisms of interaction in control of Drosophila reproduction under normal and stressful conditions. In *Ecdysone : Structures and Functions*, Springer, Dordrecht, p 317-332.

**Guedes, R. N. C., Smagghe, G., Stark, J. D., & Desneux, N. (2016).** Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annual review of entomology*, 61, 43-62.

**Gutbrod, P., Gutbrod, K., Nauen, R., Elashry, A., Siddique, S., Benting, J., Dormann, P., & Grundler, F. M. W. (2020).** Inhibition of acetyl-CoA carboxylase by spirotetramat causes growth arrest and lipid depletion in nematodes. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.

**Habbachi, W. (2009).** Etude de deux espèces de blattellidae *loboptera decipiens* & *blattella germanica* (L.). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba.

**Habes, D., Messiad, R., Gouasmia, S., & Grib, L. (2013).** Effects of an inorganic insecticide (boric acid) against *Blattella germanica*: Morphometric measurements and biochemical composition of ovaries. *African Journal of Biotechnology*, 12(18): 2492-2497.

**Haddi, K., Mendonça, L. P., Dos Santos, M. F., Guedes, R. N. C., & Oliveira, E. E. (2015).** Metabolic and behavioral mechanisms of indoxacarb resistance in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(1), 362-369.

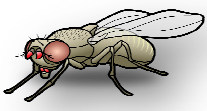
**Hadjeb, A. (2017).** Étude bioécologique et répartition spatio-temporelle de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller., 1839 (Lepidoptera, Pyralidae) dans des oasis de la wilaya de Biskra. Étude du comportement alimentaire et essai de lutte. Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider-Biskra (Algérie).

**Hadley, N. F. (1994).** *Water relations of terrestrial arthropods*. CUP Archive.

**Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörren, T., Goulson, D., & de Kroon, H. (2017).** More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PloS One*, 12(10), e0185809.



- Hamaidia, K., & Soltani, N. (2014).** Laboratory evaluation of a biorational insecticide, kinoprene, against *Culex pipiens* larvae : Effects on growth and development. *Annual Research & Review in Biology*, 2263-2273.
- Harper, H. A., Rodwell, W. V., & Mayes, P. A. (1977).** Review of Physiological Chemistry. 16th edn Lange Medical Publications. *Los Altos, CA*, 625.
- Harrop, T. W., Sztal, T., Lumb, C., Good, R. T., Daborn, P. J., Batterham, P., & Chung, H. (2014).** Evolutionary changes in gene expression, coding sequence and copy-number at the *cyp6g1* locus contribute to resistance to multiple insecticides in *Drosophila*. *PLoS One*, 9(1), e84879.
- Harsimran, G.K., & Garg, H. (2014).** Pesticides : Environmental Impacts and Management Strategies. *Pesticides-Toxic Aspects Rijeka, Croatia*, 08.
- Hassan, S. A. (1992).** Side effect tests for phytoseiids and their rearing methods. *IOBC/WPRS Bulletin* 15:61–74.
- Haynes, K. F. (1988).** Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual review of entomology*, 33(1), 149-168.
- Hellou, J., Cheeseman, K., Desnoyers, E., Johnston, D., Jouvenelle, M. L., Leonard, J., Robertson, S., & Walker, P. (2008).** A non-lethal chemically based approach to investigate the quality of harbour sediments. *Science of the total environment*, 389(1), 178-187.
- Hellou, J., Lebeuf, M., & Rudi, M. (2013).** Review on DDT and metabolites in birds and mammals of aquatic ecosystems. *Environmental Reviews*, 21(1), 53-69.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., & Decourtye, A. (2012).** A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.
- Hershberger, W. A., & Smith, M. P. (1967).** Conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, 15(2-3), 259-262.
- Hiruma, K., & Kaneko, Y. (2013).** Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. *Current topics in developmental biology*, 103, 73-100.
- Hoffmann, A. A., & Parsons, P. A. (1991).** Evolutionary genetics and environmental stress. Oxford University Press.
- Horowitz, A. R., & Ishaaya, I. (2004).** Biorational insecticides—mechanisms, selectivity and importance in pest management. In *Insect pest management* (pp. 1-28). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Howard, R. W., & Blomquist, G. J. (2005).** Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual review of entomology*, 50.



**Huang, Y., Luo, X., Tang, L., & Yu, W. (2020).** The power of habit : does production experience lead to pesticide overuse?. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(20), 25287-25296.

**Ishaaya, I., & Horowitz, A. R. (2007).** In focus : IPM using novel insecticides and other approaches. *Pest management science*, 63(8), 729-729.

**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., & Grieneisen, M. L. (2014).** Botanical insecticide research : many publications, limited useful data. *Trends in plant science*, 19(3), 140-145.

**Jacob, F., & Monod, J. (1961).** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3(3), 318-356.

**Jallon, J. M. (1984).** A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating. *Behavior genetics*, 14(5), 441-478.

**Jallon, J. M., & Wicker-Thomas, C. (2003).** Genetic studies on pheromone production in *Drosophila*. In *Insect pheromone biochemistry and molecular biology* (pp. 253-281).

**Jallow, M. F., Cunningham, J. P., & Zalucki, M. P. (2004).** Intra-specific variation for host plant use in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) : implications for management. *Crop protection*, 23(10), 955-964.

**Joseph, R. M., Devineni, A. V., King, I. F., & Heberlein, U. (2009).** Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11352-11357.

**Jouandin, P., Ghiglione, C., & Noselli, S. (2014).** Starvation induces FoxO-dependent mitotic-to-endocycle switch pausing during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 141(15), 3013-3021.

**Kaplan, P., Yorulmaz, S., & Ay, R. (2012).** Toxicity of insecticides and acaricides to the predatory mite *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari : Phytoseiidae). *International Journal of Acarology*, 38(8),

**Kaufmann, C., & Brown, M. R. (2008).** Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of insect physiology*, 54(2), 367-377.699-705.

**Kawooya, J. K., Osir, E. O., & Law, J. H. (1988).** Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *Journal of Biological Chemistry*, 263(18), 8740-8747.

**Keeley, L. L. (1985).** Physiology and biochemistry of the fat body. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 3, 211-248.



- Khattak, M. K., Shahzad, M. F., & Jilani, G. (2006).** Effect of different extracts of harmal (*Peganum harmala L.*), rhizome of kuth (*Saussure alappa CB Clark*) and balcher (*Valeriana officianalis L.*) on the settling and growth of peach fruit fly (*Bactrocera zonata Saund.*). *Pakistan Entomologist*, 28, 15-18.
- Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J. P., Smaghe, G., & Soltani, N. (2009).** Halofenozide affects sexual behavior, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Belgian Journal of Zoology*, 139(2), 147-155.
- Kilby, B. A. (1963).** The biochemistry of the insect fat body. In *Advances in insect physiology* (Vol. 1, pp. 111-174).
- Kissoum, N., Bensafi-Gheraibia, H., Hamida, Z. C., & Soltani, N. (2020).** Evaluation of the pesticide Oberon on a model organism *Drosophila melanogaster* via topical toxicity test on biochemical and reproductive parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 228, 108666.
- Kissoum, N., & Soltani, N. (2016).** Spiromesifen, an insecticide inhibitor of lipid synthesis, affects the amounts of carbohydrates, glycogen and the activity of lactate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1), 452-456.
- Klowden, M. J. (2007).** Making generalizations about vectors : Is there a physiology of “the mosquito”? *Entomological Research*, 37(1), 1-13.
- Kontsedalov, S., Gottlieb, Y., Ishaaya, I., Nauen, R., Horowitz, R., & Ghanim, M. (2009).** Toxicity of spiromesifen to the developmental stages of Bemisia tabaci biotype B. *Pest Management Science : formerly Pesticide Science*, 65(1), 5-13.
- Kostyukovsky, M., Chen, B., Atsmi, S., & Shaaya, E. (2000).** Biological activity of two juvenoids and two ecdysteroids against three stored product insects. *Insect biochemistry and molecular biology*, 30(8-9), 891-897.
- Kozlova, T., & Thummel, C. S. (2000).** Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(7), 276-280.
- Kraus, S., Monchanin, C., Gomez-Moracho, T., & Lihoreau, M. (2019).** Insect Diet. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*, 1368(6), 1-9.
- Krause Pham C., & Ray, A. (2015).** Conservation of Olfactory Avoidance in *Drosophila* Species and Identification of Repellents for *Drosophila suzukii*. *Scientific reports*, 5, 11527-11527.
- Kristensen, T. N., Sørensen, P., Kruhøffer, M., Pedersen, K. S., & Loeschcke, V. (2005).** Genome-wide analysis on inbreeding effects on gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 171(1), 157-167.



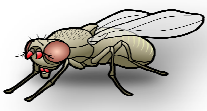
- Kunkel, J. G., & Nordin, J. H. (1985).** Yolk proteins. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 1: 83-11.
- Ladhar-Chaabouni, R., Smaoui-Damak, W., & Hamza-Chaffai, A. (2009).** In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine biology research*, 5(5) : 478-486.
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J.T., & Rees, H. (2005).** Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In : *Comprehensive Insect Molecular Science* (Eds. L. I. Gilbert, K. Kostas, S. S. Gill). Elsevier, 3, 125-195.
- Lämsä, J., Kuusela, E., Tuomi, J., Juntunen, S., & Watts, P. C. (2018).** Low dose of neonicotinoid insecticide reduces foraging motivation of bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 285(1883), 20180506.
- Lasbleiz, C., Ferveur, J. F., & Everaerts, C. (2006).** Courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* revisited. *Animal Behaviour*, 72(5), 1001-1012.
- Laturney, M., & Billeter, J. C. (2016).** *Drosophila melanogaster* females restore their attractiveness after mating by removing male anti-aphrodisiac pheromones. *Nature communications*, 7(1), 1-11.
- Laurinyecz, B., Péter, M., Vedelek, V., Kovács, A. L., Juhász, G., Maróy, P., Vigh, L., Balogh, G., & Sinka, R. (2016).** Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid composition and leads to male sterility in *Drosophila*. *Open Biology*, 6(1), 150169.
- Lavarías, S., Heras, H., Pedrini, N., Tournier, H., & Ansaldo, M. (2011).** Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea : Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 153(4), 415-421.
- Lechekhab-Ahmed-Chaouch, H. (2018),** Evaluation des risques environnementaux de trois insecticides sélectifs sur un organisme non ciblé *Palaemon adspersus* (Crustacea, Decapoda). Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie).
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., & Caquet, T. (1997).** Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres bio marqueurs associés au métabolisme énergétique. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F.(Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, 53–66.
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007).** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology.*, 52, 231-253.
- Liang, G. M., Chen, W., & Liu, T. X. (2003).** Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). *Crop protection*, 22(2), 333-340.



- Liu, H., Lu, Y., Liu, Q., Huo, X., Peng, B., Ren, D., Wu, D., Wang, J., Wang, X., Tang, Z., Liu, W., & Meng, F. (2013).** Comparison of Pyrethroid Resistance in Adults and Larvae of *Culex pipiens pallens* (Diptera : Culicidae) From Four Field Populations in China. *Journal of economic entomology*, 106(1), 360-365.
- Lohar, M. K., & Wright, D. J. (1993).** Changes in the lipid content in haemolymph, fat body and oocytes of malathion treated *Tenebrio molitor* L. Adult females. *Pakistan Journal of Zoology*, 25, 57-57.
- Louat, F. (2013).** Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*. Thèse de doctorat, Université d'Orléans (France).
- Lümmen, P., Khajehali, J., Luther, K., & Van Leeuwen, T. (2014).** The cyclic keto-enol insecticide spirotetramat inhibits insect and spider mite acetyl-CoA carboxylases by interfering with the carboxyltransferase partial reaction. *Insect biochemistry and molecular biology*, 55, 1-8.
- Luo, C., Jones, C. M., Devine, G., Zhang, F., Denholm, I., & Gorman, K. (2010).** Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera : Aleyrodidae) from China. *Crop Protection*, 29(5), 429-434.
- Maiza, A., Aribi, N., Smagghe, G., Kilani-Morakchi, S., Bendjedid, M., & Soltani, N. (2013).** Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad and indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*. *Bulletin of Insectology*, 66(1), 11-20.
- Maiza, A., Aribi, N., Smagghe, G., & Soltani, N. (2010).** Effect of an oxadiazine indoxacarb, on the biochemical composition of ovaries in the german cockroach. *Communications and Applied Biological Sciences Ghent University*, 75(3), 359-366.
- Maiza, A., Kilani-Morakchi, S., Farine, J. P., Smagghe, G., Aribi, N., & Soltani, N. (2004).** Reproductive effects in german cockroaches by ecdysteroid agonist RH-0345, juvenile hormone analogue methoprene and carbamate benfuracarb. *Communications and Applied Biological Sciences Ghent University*, 69, 257-266.
- Mann, R. S., Schuster, D. J., Cordero, R., & Toapanta, M. (2012).** Baseline toxicity of spiromesifen to biotype B of *Bemisia tabaci* in Florida. *Florida Entomologist*, 95(1), 95-98.
- Manning, A. (1967).** "Pre-imaginal conditioning" in *Drosophila*. *Nature*, 216(5113), 338-340.
- Marčić, D., Ogurlić, I., Mutavdžić, S. & Pantelija, P. (2010).** The effects of spiromesifen on life history traits and population growth of two-spotted spider mite (Acari : Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 50: 255-267.
- Marcillac, F., Houot, B., & Ferveur, J. F. (2005).** Revisited roles of *Drosophila* female pheromones. *Chemical Senses*, 30(suppl\_1), i273-i274.
- Markow, T. A., & O'Grady, P. M. (2005).** Evolutionary genetics of reproductive behavior in *Drosophila* : connecting the dots. *Annual Review of Genetics*, 39, 263-291.



- Maroufpoor, M., Ghoosta, Y., Pourmirza, A. A., & Lotfalizadeh, H. (2016).** The effects of selected acaricides on life table parameters of the predatory mite, *Neoseiulus californicus* fed on European red mite. *North-Western Journal of Zoology*, 12(1), 1-6.
- Marnett, L.J. (2002).** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181- 182: 219-222.
- Matoug, H. (2018).** Inventaire de la faune Culicidienne de la région de Skikda et étude du comportement sexuel et alimentaire des Culicidae. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie).
- Mayer, P. J., & Baker III, G. T. (1984).** Developmental time and adult longevity in two strains of *Drosophila melanogaster* in a constant low-stress environment. *Mechanisms of ageing and development*, 26(2-3), 283-298.
- McKenzie, J. A. (1974).** The distribution of vineyard populations of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* during vintage and non-vintage periods. *Oecologia*, 15(1), 1-16.
- McKenzie, J. A., & McKechnie, S. W. (1979).** A comparative study of resource utilization in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Oecologia*, 40(3), 299-309.
- Meera, S., & Mann, A. K. (2002).** Effect of smoke treatment of *Peganum harmala* on the mortality of *Callosobruchus chinensis* Linnaeus. *Insect Environment*, 8(3), 108-109.
- Meghdadi, M. M., & Mirza Mohammad, M. (2017).** Liability Arising From Import, Manufacture, Formulation and Utilization of Pesticides with a Review on Australian Regulations. *Journal of Comparative Law*, 4(1), 68-91.
- Meigen, J. W. 1830.** Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. *Hamm*. 6: 401.
- Messiad, R., Habes, D., & Soltani, N. (2015).** Reproductive effects of a neonicotinoid insecticide (Imidacloprid) in the German Cockroaches *Blattella germanica* L. (Dictyoptera, Blattellidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(2), 01-06.
- Miranda, J. E., Bortoli, S. A. D., & Takahashi, R. (2002).** Development and silk production by silkworm larvae after topical application of methoprene. *Scientia Agricola*, 59(3), 585-588.
- Mirth, C. K., & Shingleton, A. W. (2012).** Integrating body and organ size in *Drosophila* : recent advances and outstanding problems. *Frontiers in endocrinology*, 3, 49.
- Misra, S., & Wolfner, M. F. (2020).** *Drosophila* seminal sex peptide associates with rival as well as own sperm, providing SP function in polyandrous females. *Elife*, 9, e58322.
- Mitchell, E. A., Mulhauser, B., Mulot, M., Mutabazi, A., Glauser, G., & Aebi, A. (2017).** A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, 358(6359), 109-111.

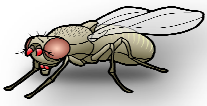


- Müller, T., Gesing, M. A., Segeler, M., & Müller, C. (2019). Sublethal insecticide exposure of an herbivore alters the response of its predator. *Environmental Pollution*, 247, 39-45.
- Müller, T., Prosche, A., & Müller, C. (2017). Sublethal insecticide exposure affects reproduction, chemical phenotype as well as offspring development and antennae symmetry of a leaf beetle. *Environmental Pollution*, 230, 709-717.
- Nadda, G., Saxena, P. N., & Srivastava, G. (2005). Effects of sublethal doses of beta-cyfluthrin on mutant *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae). *Applied entomology and zoology*, 40(2), 265-271.
- Nansen, C., Baissac, O., Nansen, M., Powis, K., & Baker, G. (2016). Behavioral avoidance-will physiological insecticide resistance level of insect strains affect their oviposition and movement responses?. *PloS One*, 11(3), e0149994.
- Nässel, D. R. & 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.
- Nation, J.L. (2016). *Insect Physiology and Biochemistry*. Third edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 690 p.
- Nauen, R., Bretschneider, T., Elbert, A., Fischer, R., & Tieman, R. (2003). Spirodiclofen and spiromesifen. *Pesticide Outlook*, 14(6), 243-246.
- Nauen, R., & Konanz, S. (2005). Spiromesifen as a new chemical option for resistance management in whiteflies and spider mites. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 58(3), 485-502.
- Nauen, R., Reckmann, U., Thomzik, J., & Thielert, W. (2008). Biological profile of spirotetramat (Movento®)—a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropScience Journal*, 61(2), 245-278.
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J. L., & Pereira, T. (2015). Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine pollution bulletin*, 101(1), 119-126.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. & Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4.
- Nijhout, H. F., Riddiford, L. M., Mirth, C., Shingleton, A. W., Suzuki, Y., & Callier, V. (2014). The developmental control of size in insects. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Developmental Biology*, 3(1), 113-134.
- Notter-Hausmann, C., & Dorn, S. (2010). Relationship between behavior and physiology in an invasive pest species : oviposition site selection and temperature-dependent development of the oriental fruit moth (Lepidoptera : Tortricidae). *Environmental entomology*, 39(2), 561-569.





- Nunney, L. (1996).** The response to selection for fast larval development in *Drosophila melanogaster* and its effect on adult weight : an example of a fitness trade-off. *Evolution*, 50(3), 1193-1204.
- Oulhaci, C. M., Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J. C., Kaiser, L., Joly, D., & Aribi, N. (2018).** Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Pest Management Science*, 74(1), 174-180.
- Overgaard, J., Tomčala, A., Sørensen, J. G., Holmstrup, M., Krogh, P. H., Šimek, P., & Košťál, V. (2008).** Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 54(3), 619-629.
- Parrilla-Taylor, D. P., Zenteno-Savín, T., & Magallón-Barajas, F. J. (2013).** Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 380, 41-46.
- Pimentel, D. (2005).** Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, development and sustainability*, 7(2), 229-252.
- Planes, L., Catalán, J., Tena, A., Porcuna, J. L., Jacas, J. A., Izquierdo, J., & Urbaneja, A. (2013).** Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. *Journal of Pest Science*, 86(2), 321-327.
- Rahman, T., Spafford, H., & Broughton, S. (2011).** Compatibility of spinosad with predaceous mites (Acari) used to control *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera : Thripidae). *Pest management science*, 67(8), 993-1003.
- Ramade, F. (2011).** Introduction à l'écochimie : les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. Lavoisier.
- Rawi, S. M., El-Gindy, H., & Abd-El-Kader, A. (1996).** New Possible Molluscicides from *Calendula micrantha officinalis* and *Ammi majus* : II. Molluscicidal, Physiological, and Egg-Laying Effects against *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 35(3), 261-267.
- Razdan, T., Rana, K. S., & Saxena, P. N. (2003).** Effect of cybil on reproductive success of wild *Drosophila melanogaster*. *Journal of environmental biology*, 24(3), 345-347.
- Rehman, J. U., Jilani, G., Khan, M. A., Masih, R., & Kanvil, S. (2009a).** Repellent and oviposition deterrent effects of indigenous plant extracts to Peach Fruit Fly, *Bactrocera zonata* Saunders (Diptera : Tephritidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 41(2).
- Rehman, J. U., Wang, X. G., Johnson, M. W., Daane, K. M., Jilani, G., Khan, M. A., & Zalom, F. G. (2009b).** Effects of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) seed extract on the olive



fruit fly (Diptera : Tephritidae) and its larval parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera : Braconidae). *Journal of economic entomology*, 102(6), 2233-2240.

**Reim, C., Teuschl, Y., & Blanckenhorn, W. U. (2006).** Size-dependent effects of larval and adult food availability on reproductive energy allocation in the Yellow Dung Fly. *Functional Ecology*, 20(6), 1012-1021.

**Remy, J. J., & Hobert, O. (2005).** An interneuronal chemoreceptor required for olfactory imprinting in *C. elegans*. *Science*, 309(5735), 787-790.

**Riba, M., Marti, J., & Sans, A. (2003).** Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L. (Het., Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology*, 127(1), 37-41.

**Roditakis, E., Grispou, M., Morou, E., Kristoffersen, J. B., Roditakis, N., Nauen, R., Vontas, J., & Tsagkarakou, A. (2009).** Current status of insecticide resistance in Q biotype *Bemisia tabaci* populations from Crete. *Pest Management Science : formerly Pesticide Science*, 65(3), 313-322.

**Roland, S., & Rémi, G. (2013).** Odorat et goût : de la neurobiologie des sens chimiques aux applications. *Editions Quae*.

**Roser, M., & Ritchie, H. (2015).** Fertilizer and Pesticides. Our World in Data.

**Rundlöf, M., Andersson, G. K., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., & Smith, H. G. (2015).** Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 521(7550), 77-80.

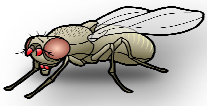
**Russell, R., Guerry, A. D., Balvanera, P., Gould, R. K., Basurto, X., Chan, K. M., Klain, S., Levine, J., & Tam, J. (2013).** Humans and nature : how knowing and experiencing nature affect well-being. *Annual review of environment and resources*, 38, 473-502.

**Sadeghi, A., Van Damme, E. J. & 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.

**Saguez, J., Vincent, C., Laberche, J. C., & Giodanengo, P. (2007).** Pourquoi les inhibiteurs de chitinases peuvent être considérés comme de nouveaux moyens de lutte contre les aphides?. *Revue de Cytologie et Biologie végétale - Le Botaniste*, 27(3/4) : 23-31.

**Sak, O., Uçkan, F., & Ergin, E. (2006).** Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera : Ichneumonidae). *Belgian Journal of Zoology*, 136(1) : 53-58.

**Sarbaz, S., Goldasteh, S., Zamani, A. A., Solymannejadiyan, E., & Vafaei Shoushtari, R. (2017).** Side effects of spiromesifen and spirodiclofen on life table parameters of the predatory



mite, *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari : Phytoseiidae). *International Journal of Acarology*, 43(5), 380-386.

**Schneider, C. W., Tautz, J., Grünwald, B., & Fuchs, S. (2012).** RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PloS One*, 7(1), e30023.

**Schreinemachers, P., Grovermann, C., Praneetvatakul, S., Heng, P., Nguyen, T. T. L., Buntong, B., Thinh Le, N., & Pinn, T. (2020).** How much is too much? Quantifying pesticide overuse in vegetable production in Southeast Asia. *Journal of Cleaner Production*, 244, 118738.

**Schuster, D. J., Mann, R. S., Toapanta, M., Cordero, R., Thompson, S., Cyman, S., Shurtleff, A., & Morris II, R. F. (2010).** Monitoring neonicotinoid resistance in biotype B of *Bemisia tabaci* in Florida. *Pest Management Science : formerly Pesticide Science*, 66(2), 186-195.

**Scott-Fordsmand, J. J., Krogh, P. H., & Weeks, J. M. (2000).** Responses of *Folsomia fimetaria* (Collembola : Isotomidae) to copper under different soil copper contamination histories in relation to risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry : An International Journal*, 19(5), 1297-1303.

**Seth, R. K., Rao, D. K., & Reynolds, S. E. (2002).** Movement of spermatozoa in the reproductive tract of adult male *Spodoptera litura* : daily rhythm of sperm descent and the effect of light regime on male reproduction. *Journal of insect physiology*, 48(1), 119-131.

**Shah, R. M., Alam, M., Ahmad, D., Waqas, M., Ali, Q., Binyamin, M., & Shad, S. A. (2016).** Toxicity of 25 synthetic insecticides to the field population of *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitology research*, 115(11), 4345-4351.

**Shen, L. R., Lai, C. Q., Feng, X., Parnell, L. D., Wan, J. B., Wang, J. D., Li, D., Ordovas, J. M., & Kang, J. X. (2010).** Drosophila lacks C20 and C22 PUFAs. *Journal of lipid research*, 51(10), 2985-2992.

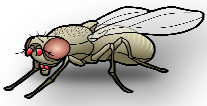
**Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyneck, C., New Hall, & Feidman, L. (1966).** A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytical Biochemistry*, 19: 415-528.

**Sieber, M. H., & 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, A., Dhiman, N., Kar, A. K., Singh, D., Purohit, M. P., Ghosh, D., & Patnaik, S. (2020).** Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture. *Journal of hazardous materials*, 385, 121525.



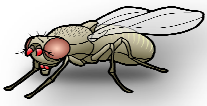
- Singh, A., & Tiwari, S. K. (2014).** Biological activity of fenoxycarb, a juvenile hormone analogue on rice moth, *Corcyra cephalonica* Staint. (Lepidoptera : Pyralidae). *World Applied Sciences Journal*, 31(3), 376-382.
- Siviter, H., Koricheva, J., Brown, M. J., & Leadbeater, E. (2018).** Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *Journal of Applied Ecology*, 55(6), 2812-2821.
- Slack, J. (2004).** Biologie du développement. 1ère édition, De Boeck, p 481.
- Smith, A. A., Hölldober, B., & Liebig, J. (2009).** Cuticular hydrocarbons reliably identify cheaters and allow enforcement of altruism in a social insect. *Current Biology*, 19(1), 78-81.
- Snellings, Y., Herrera, B., Wildemann, B., Beelen, M., Zwarts, L., Wenseleers, T., & Callaerts, P. (2018).** The role of cuticular hydrocarbons in mate recognition in *Drosophila suzukii*. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- Soltani-Mazouni, N., Hami, M., & Gramdi, H. (2012).** Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Invertebrate Reproduction & Development*, 56(2), 157-163.
- Soltani-Mazouni, N., & Soltani, N. (1992).** Effets du diflubenzurom sur les métabolites hémolymphatiques et ovariens chez *Tenebrio molitor* au cours de la maturation sexuelle. *Mémoires de la Société Royale Belge d'Entomologique*, 35: 743-747.
- Soltani-Mazouni, N., Taibi, F., Berghiche, H., Smaggle, G., & Soltani, N. (2001).** RH-0345 restored partly the effects induced by KK-42 on reproductive event in Mealworms. *Med-Fac. Landbouww.Univ.Gent*, 66/2a: 437-444.
- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015).** IRAC : Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide biochemistry and physiology*, 121, 122-128.
- Stark, J. D., & Banks, J. E. (2003).** Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual review of entomology*, 48(1), 505-519.
- Svetec, N., & Ferveur, J. F. (2005).** Social experience and pheromonal perception can change male–male interactions in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 208(5), 891-898.
- Swanton, C., Burrell, R. A., & Futreal, P. A. (2011).** Breast cancer genome heterogeneity : a challenge to personalised medicine?. *Breast Cancer Research*, 13(1), 104.
- Swaroop, S., Gilroy, A. B., & Uemura, K. (1966).** Statistical methods in malaria eradication. Geneva : World Health Organization, p 164.



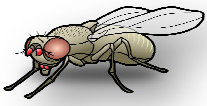
- Swevers, L., Raikhel, A.S., Sappington, T.W., Shirk, P., & Iatrou, K. (2005).** Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S. (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, U.K. 6: 87–156.
- Takamura, T., & Fuyama, Y. (1980).** Behavior genetics of choice of oviposition sites in *Drosophila melanogaster*. I. Genetic variability and analysis of behavior. *Behavior genetics*, 10(1), 105-120.
- Tavernier R., & Lizeaux., C. (2002).** Sciences Vie Terre Term S. *Spec. Maisonneuve et Larose*, 117 p.
- Tine, S., Aribi, N., & Soltani, N. (2011).** Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera, Blattellidae) : Insecticidal activity and reproductive effects. *African Journal of Biotechnology*, 10(85), 19816-19824.
- Thibert, J., Farine, J. P., Cortot, J., & Ferveur, J. F. (2016).** *Drosophila* food-associated pheromones : effect of experience, genotype and antibiotics on larval behavior. *PLoS One*, 11(3), e0151451.
- Thompson, H. M. (2003).** Behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology*, 12(1), 317-330.
- Thompson, J. N., & Pellmyr, O. (1991).** Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 65-89.
- Thorpe, W. H. (1939).** Further studies on pre-imaginal olfactory conditioning in insects. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 127(848), 424-433.
- Toivonen, J. M., & Partridge, L. (2009).** Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(1), 39-50.
- Toma, L., Menegon, M., Romi, R., De Matthaëis, E., Montanari, M., & Severini, C. (2011).** Status of insecticide resistance in *Culex pipiens* field populations from north-eastern areas of Italy before the withdrawal of OP compounds. *Pest management science*, 67(1), 100-106.
- Tomé, H. V. V., Martins, J. C., Corrêa, A. S., Galdino, T. V. S., Picanço, M. C., & Guedes, R. N. C. (2013).** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Protection*, 46, 63-69.
- Tooming, E., Merivee, E., Must, A., Merivee, M. I., Sibul, I., Nurme, K., & Williams, I. H. (2017).** Behavioural effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the predatory insect *Platynus assimilis*. *Ecotoxicology*, 26(7), 902-913.
- Toprak, U., Hegedus, D., Doğan, C., & Güney, G. (2020).** A journey into the world of insect lipid metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(2), e21682.



- Tracqui, P., & Demongeot, J. (2003).** Elements de biologie à l'usage d'autres disciplines. *EDP Sciences*.
- Traynier, R. M. M. (1984).** Associative learning in the ovipositional behaviour of the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Physiological Entomology*, 9(4), 465-472.
- Tricoire-Leignel, H., Thany, S. H., Gadenne, C., & Anton, S. (2012).** Pest insect olfaction in an insecticide-contaminated environment : info-disruption or hormesis effect. *Frontiers in physiology*, 3, 58.
- Troy, S., Anderson, W. A., & Spielman, A. (1975).** Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 50(3), 457-461.
- Tüzün, N., & Stoks, R. (2017).** Carry-over effects across metamorphosis of a pesticide on female lifetime fitness strongly depend on egg hatching phenology : a longitudinal study under seminatural conditions. *Environmental science & technology*, 51(23), 13949-13956.
- Ueyama, M., Chertemps, T., Labeur, C., & Wicker-Thomas, C. (2005).** Mutations in the *desat1* gene reduces the production of courtship stimulatory pheromones through a marked effect on fatty acids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(8), 911-920.
- UIPP (Union des Industries de la Protection des Plantes). (2012).** Rapport d'activité UIPP 951 2011/2012, pp 43.
- United Nations. (2017).** World population prospects : The 2017 revision. New York, USA : United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division.
- U.S.EPA. (2008).** Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, United States. *Pesticide fact sheet. Spirotetramat*, 74p.
- Van Heusden, M. C., & Law, J. H. (1989).** An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17287-17292.
- Van Pottelberge, S., Khajehali, J., Van Leeuwen, T., & Tirry, L. (2009).** Effects of spirodiclofen on reproduction in a susceptible and resistant strain of *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 47(4), 301-309.
- Varghese, T. S., & Mathew, T. B. (2013).** Bioefficacy and safety evaluation of newer insecticides and acaricides against chilli thrips and mites. *Journal of Tropical Agriculture*, 51(1), 111-115.
- Velazquez, A., Xamena, N., Creus, A., & Marcos, R. (1990).** Mutagenic evaluation of the organophosphorus insecticides methyl parathion and triazophos in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 31(4), 313-325.



- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S. E., Sullivan, C. A., Liermann, C. R., & Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555-561.
- Vrijheid, M., Casas, M., Gascon, M., Valvi, D., & 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, J. F. (1999). Commercial experience with neem products. In *Biopesticides : use and delivery*. Humana Press, p. 155-170.
- Wang, Y., Farine, J. P., Yang, Y., Yang, J., Tang, W., Gehring, N., Ferveur, J. F., & Moussian, B. (2020). Transcriptional Control of Quality Differences in the Lipid-Based Cuticle Barrier in *Drosophila suzukii* and *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Genetics*, 11, 887.
- Watson, K. L., Justice, R. W., & Bryant, P. J. (1994). *Drosophila* in cancer research : the first fifty tumor suppressor genes. *Journal of Cell Science*, (Supplement 18), 19-33.
- Weseloh, R. M., & Andreadis, T. G. (1982). Possible mechanism for synergism between *Bacillus thuringiensis* and the gypsy moth (Lepidoptera : Lymantriidae) parasitoid, *Apanteles melanoscelus* (Hymenoptera : Braconidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 75(4), 435-438.
- Whitehorn, P. R., Norville, G., Gilburn, A., & Goulson, D. (2018). Larval exposure to the neonicotinoid imidacloprid impacts adult size in the farmland butterfly *Pieris brassicae*. *PeerJ*, 6, e4772.
- Whitworth, A. J. (2011). *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Advances in genetics*, 73, 1-50.
- Wigglesworth, V. B. (1972). The principles of insect physiology. Springer Science & Business Media. *Seventh Edition*. Published in the USA by Chapman and Hall. University Presss Cambridge. New York, 827.
- Xu, D., Li, Y., Wu, L., Li, Y., Zhao, D., Yu, J., Huang, T., Ferguson, C., Parton, R. G., Yang, H., & Li, P. (2018). Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *Journal of Cell Biology*, 217(3), 975-995.
- Yang, E. C., Chang, H. C., Wu, W. Y., & Chen, Y. W. (2012). Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS One*, 7(11), e49472.
- Yang, M. L., Zhang, J. Z., Zhu, K. Y., Xuan, T., Liu, X. J., Guo, Y. P., & Ma, E. B. (2009). Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology : Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 71(1), 3-15.



**Ye, D., Klein, M., Chang, H. H., Sarnat, J. A., Mulholland, J. A., Edgerton, E. S., Winqvist, A., Tolbert, P.E., & Sarnat, S. E. (2017).** Estimating acute cardiorespiratory effects of ambient volatile organic compounds. *Epidemiology*, 28(2), 197-206.

**Zhang, P. J., Liu, S. S., Wang, H., & Zalucki, M. P. (2007).** The influence of early adult experience and larval food restriction on responses toward nonhost plants in moths. *Journal of Chemical Ecology*, 33(8), 1528-1541.

**Zhao, J. H., Ji, M. H., Xu, X. H., Cheng, J. L., & Zhu, G. N. (2009).** Synthetic derivatives of spiromesifen and their bioactivity research. *Chinese Chemical Letters*, 20(11), 1307-1310.

**Zhu, F., Wang, M., & Tang, B. (2002).** Differences in susceptibility to insecticides between adults and larvae of housefly, *Musca domestica* (L.). *Insect Science*, 9, 23–27.

**Zielinski, S., & Pörtner, H. O. (2000).** Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods : a function of metabolic rate or age?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 125(2), 147-160.

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

**Zwaan, B., Bijlsma, R., & Hoekstra, R. F. (1995).** Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, (4), 649-659.



**ANNEXE**  
**PRODUCTION SCIENTIFIQUE**

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

### Publications

1- **HAMIDA Z.C.**, FARINE J.P., FERVEUR J.F. & SOLTANI N. (2021). Pre-imaginal exposure to Oberon® disrupts fatty acid composition, cuticular hydrocarbon profile and sexual behavior in *Drosophila melanogaster* adults. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 243, 108981.

2- KISSOUM N., BENSAFI-GHERAIBIA H., **HAMIDA Z.C.** & Soltani N. (2020). Evaluation of the pesticide Oberon on a model organism *Drosophila melanogaster* via topical toxicity test on biochemical and reproductive parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 228, 108666.

3- BENSAFI-GHERAIBIA H., KISSOUM N., **HAMIDA Z.C.**, FARINE J.P. & SOLTANI N. (2020). Topical bioassay of Oberon® on *Drosophila melanogaster* pupae: delayed effects on ovarian proteins, cuticular hydrocarbons and sexual behaviour. *Invertebrate Reproduction & Development*, 1-13.

### Communication internationale

**HAMIDA Z.C.**, BENSAFI H., FERVEUR J.F & SOLTANI N. (2017). Evaluation d'un pesticide (Oberon<sup>R</sup>) chez un modèle expérimental (*Drosophila melanogaster*) : aspects toxicologique et biochimique. Symposium Maghrébin sur la Protection Intégrée des Plantes, Sousse (Tunisie) 30 Octobre- 1 Novembre 2017 (communication orale).

BENSAFI H., **HAMIDA Z.C.**, FARINE J.P & SOLTANI N. (2017) Effets du spiromesifen, un inhibiteur de la synthèse des lipides sur les hydrocarbures cuticulaires de *Drosophila melanogaster*. Symposium Maghrébin sur la Protection Intégrée des Plantes, Sousse (Tunisie) 30 Octobre- 1 Novembre 2017 (communication orale).

**HAMIDA Z.C.**, FARINE J.P., FERVEUR J.F & SOLTANI N. (2018). Effets du spiromesifen, un inhibiteur de la synthèse des lipides sur les réponses comportementales chez la Drosophile. Le 38eme colloque de l'ARET Association pour la Recherche en Toxicologie, Dijon (France) 28 au 29 Novembre 2018 (communication orale).

**HAMIDA Z.C.**, FARINE J.P., FERVEUR J.F & SOLTANI N. (2018). Effet sublétal d'un produit phytosanitaire à faible risque environnemental (Oberon) sur le développement et le comportement chez la Drosophile. Forum des jeunes chercheurs, Besançon (France) 14-15 juin 2018 (communication par affiche).

**HAMIDA Z.C.**, FARINE J.P., FERVEUR J.F & SOLTANI N. (2018). Le spiromesifen, un pesticide sélectif, affecte le comportement sexuel chez *Drosophila melanogaster*. Le 6e Congrès franco-maghrébin de zoologie, Paris (France) 21-24 novembre 2018 (communication orale).

**HAMIDA Z.C., FARINE J.P., FERVEUR J.F & SOLTANI N. (2018).** Effets d'un inhibiteur de la synthèse des lipides (spiromesifen) incorporé dans le milieu d'élevage sur les préférences alimentaires de *Drosophila melanogaster*. 7ème congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources. Tabarka (Tunisie) du 20-23 mars 2019 (communication par affiche).

**HAMIDA Z.C., FARINE JP., FERVEUR JF & SOLTANI N. (2018).** Le spiromesifen, un pesticide sélectif, affecte le comportement sexuel chez *Drosophila melanogaster*. 29ème congrès international de l'atsb, Sousse. (Tunisie) 26-29 mars 2019. (Communication par affiche).

**HAMIDA Z.C., TAFFAR A., FARINE JP., FERVEUR JF & SOLTANI N. (2018).** Toxicité du spiromesifen, un inhibiteur de la synthèse des lipides, chez *drosophila melanogaster* : effets sur le développement, le poids corporel et la longévité. 1<sup>er</sup> séminaire international environnement et toxicologie snentox, Constantine (Algérie) 29-30 janvier 2019. (Communication par affiche).



## Pre-imaginal exposure to Oberon® disrupts fatty acid composition, cuticular hydrocarbon profile and sexual behavior in *Drosophila melanogaster* adults

Z.C. Hamida<sup>a,b</sup>, J.P. Farine<sup>b</sup>, J.F. Ferveur<sup>b</sup>, N. Soltani<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

<sup>b</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Agrosup-UMR 6265 CNRS, UMR 1324 INRA, Université de Bourgogne, Dijon, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Drosophila melanogaster*

Spiromesifen

Toxicity

Fatty acids

Cuticular hydrocarbons

Sexual behavior

### ABSTRACT

Oberon® is a commercial formulation of spiromesifen, a pesticide inhibitor of lipid biosynthesis via acetyl CoA carboxylase, widely used in agricultural crop protection. However, its mode of action requires further analysis. We currently examined the effect of this product on *Drosophila melanogaster* as a non-target and model organism. Different concentrations of spiromesifen were administered by ingestion (and contact) during pre-imaginal development, and we evaluated its delayed action on adults. Our results suggest that spiromesifen induced insecticidal activity on *D. melanogaster*. Moreover, spiromesifen treatment significantly increased the duration of larval and pupal development at all tested concentrations while it shortened longevity in exposed males as compared to control males. Also, pre-imaginal exposure to spiromesifen quantitatively affected fatty acids supporting its primary mode of action on lipid synthesis. In addition, this product was found to modify cuticular hydrocarbon profiles in exposed female and male flies as well as their sexual behavior and reproductive capacity.

### 1. Introduction

Pesticides are pivotal pest management tools designed to reduce crop losses, as well as vector infestations. On the world scale, chemical control remains the most widely adopted mean to maintain harmful insects at a reasonable threshold (Casida and Durkin, 2013). However, the intensive use of insecticide often induces uncontrolled effects on environment and human health (Bolzonella et al., 2019). In this context, there is a demand for new products with optimal efficacy, lower application rates in the field, increased selectivity, favourable toxicological and environmental safety (Guedes et al., 2016; Jeschke, 2018).

Spiromesifen is a systemic product belonging to the chemical group of spirocyclic tetrone/tetramic acid derivatives also known as ketoenols, developed by Bayer CropScience (Nauen and Denholm, 2005). This compound, introduced in several countries over the last few years, is becoming a key compound for the control of whiteflies and mites. The biological activity of tetrone acids correlates with inhibition of lipogenesis especially triglycerides and free fatty acids (FAs) (Varghese and Mathew, 2013). It is listed in the "group 23" as inhibitors of acetyl CoA carboxylase in the IRAC mode of action classification. This enzyme catalyzes the carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA, which is one

of the first steps in the biosynthesis of FAs (Nauen and Denholm, 2005; Bretschneider et al., 2007).

Previously, spiromesifen was reported to exhibit insecticidal activity against larvae of *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae) when added to rearing water (Bouabida et al., 2017). Moreover, it was also found to reduce amounts of the main biochemical constituents and to enhance the rate of malondialdehyde (MDA) widely used as a marker of free radical damage to lipid molecules. Abed El Fatah et al. (2019) found that spiromesifen and spirotetramat (another product of spirocyclic tetrone acid) qualitatively and quantitatively affects FAs of *Spodoptera littoralis* after ingestion treated castor leaves during the second instar larvae. More recently, it was also shown to affect the fecundity and egg viability in flies resulting from treated pupae (Kissoum et al., 2020). Such reduction of reproductive capacity suggested that spiromesifen affects the vitellogenesis process via the inhibition of lipid precursors and the sexual behavior via cuticular pheromone synthesis.

Lipids are primary storage molecules involved in several vital functions, such as cellular compartmentalization and segregation, signal transduction and chemical communication (Toprak et al., 2020). They play important roles in communication at all levels of organization (Gibbs and Crockett, 1998). Cuticular hydrocarbons (CHs), the main

\* Corresponding author.

E-mail address: [noureddine.soltani@univ-annaba.org](mailto:noureddine.soltani@univ-annaba.org) (N. Soltani).

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.108981>

Received 11 November 2020; Received in revised form 9 January 2021; Accepted 14 January 2021

Available online 23 January 2021

1532-0456/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

compounds of the thin layer of cuticular lipids, protect insects against desiccation and play multiple roles in chemical communication, including aggregation, mate recognition and the signaling of reproductive status (Ferveur, 2005; Ferveur et al., 2018; Snellings et al., 2018; Feyereisen, 2019). These molecules derive from FAs and their biosynthesis has been particularly studied in *D. melanogaster*, a key model insect. *D. melanogaster* was extensively used as a model species in basic and applied research (Reiter et al., 2001; Ashburner, 2005; Joly, 2006; Whitworth, 2011; Panchal and Tiwari, 2017). The data acquired about its physiology, endocrinology, genetics and behaviors provide a strong basis to better understand the mode of action of pesticides.

Based on these findings, we hypothesized that the interference of the tested product on the lipid biosynthesis could affect both FA amounts and CH profiles and subsequently the sexual behavior. Therefore, we examined the impact of a commercial formulation (Oberon®) containing spiromesifen, on *D. melanogaster*, a biological model of choice. The main objectives of our study consisted to determine the lethality induced by this product in individuals exposed during pre-imaginal development. In particular, we evaluate its dose-dependent effect on growth and development. We also measured the FA and CH amounts as well as the sexual behavior in the male and female flies that survived to pre-imaginal treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insect rearing

*Drosophila melanogaster* (Canton-S) were raised on yeast/cornmeal/agar medium and kept at  $25 \pm 2$  °C under a 12:12 h light-dark cycle and a relative humidity of 70%. Flies were isolated under light CO<sub>2</sub> anaesthesia from the first hour after emergence, and then they were held in groups of 10 individuals according to sex in rearing glass vials (25 mm diameter, 95 mm height) containing standard medium.

### 2.2. Pesticide and toxicity assays

Spiromesifen (Oberon® 240 SC: concentrated solution; Bayer CropScience, Germany) was obtained from Bayer CropScience (Algeria). After preliminary observations, several concentrations (1; 2.5; 5; 7.5 and 10 µg/g of active ingredient/g standard medium) were tested. The product was mixed with the medium and administered during the pre-imaginal development of *D. melanogaster*. For each test, 50 eggs (<4 h) were placed in vials containing 4 g of food mixed, or not, with various concentrations of spiromesifen. Plain medium was used as control. The assay was conducted with 30 replicates per concentration and the number of adults emerging was noted. The inhibition percentages of adult emergence were corrected in accordance with Abbott (1925) and the toxicity data analyzed using non-linear sigmoid curve fitting. The lethal concentrations together with their corresponding 95% confidence limits (95% CL) and the slope of the concentration-mortality lines were calculated.

### 2.3. Duration of larval and pupal development

In order to assess the duration of larval and pupal development in the control and treated series, observations were made every 12 h until pupation and then every 24 h until the emergence of adults. Thirty replicates per concentration were used for each series.

### 2.4. Weight and water content of adults

The surviving adult males and females were collected at 5 days post-emergence. The fresh and dry weights of the same flies were determined using an analytical balance ( $\pm 10$  µg; Sartorius R160-P). Groups of 10 live anaesthetized flies were weighed to obtain their fresh weight. Then each group was kept for 24 h in an empty glass vial in an incubator at

45 °C to allow complete desiccation before determine their dry weight. The relative level of water in each group was estimated based on the fresh-dry weight ratio (Ferveur et al., 2018). Each experiment was replicated 12 times with samples containing 10 individuals per sex.

### 2.5. Male survival

Since males were found more sensitive to spiromesifen than females (Kissoum et al., 2020), male flies surviving from pre-imaginal treatments were examined. Male flies were kept in groups of 10 in glass vials containing standard medium. Each week, live flies were transferred to new vials with fresh medium and the number of dead individuals was noted to determine the lethality frequency.

### 2.6. Fatty acid extraction and gas chromatography–mass spectrometry analysis

Fatty acids (FAs) contained in the whole body were extracted according to Shen et al. (2010). Five-day old flies (female and male) surviving from treatments during pre-imaginal stage were kept in groups of 5 individuals/sex at  $-20$  °C. Grinding was carried out in a two-step procedure using a grinder and 1 mm diameter metal grinding balls (Biospecs Products) placed at the bottom of a vial containing 1.5 ml of methanol. After decanting for a few minutes in ice, the supernatant was transferred to a glass vial and mixed with 11.4 µl of C15:0 (pentadecanoic acid; internal standard) and 2.5 ml of BF<sub>3</sub> MetOH (14% methanol solution of boron trifluoride). Then, the solution was maintained under nitrogen, heated at 100 °C for 1 h and then cooled at room temperature. 0.25 ml of 0.37 M KCl and 1.5 ml of hexane were added before centrifugation (3000 rpm for 5 min at 16 °C). The extracts were analyzed using a QP2010 Shimadzu GC–MS apparatus in splitless mode equipped with a CP Wax 58 FFAP (50 m × 0.25 mm i.d., 0.20 mm film thickness, Agilent). The column was held isothermally at 40 °C for 2 min, then programmed at the rate of 3 °C/min to 240 °C. Helium was used as carried gas at a linear velocity of 47 cm/s. The injector port was set at 280 °C. The mass spectrometer was operated at 70 eV, and scanning was performed from 29 to 600 amu at 0.5 scans/s. The injection split was opened 1 min after the injection. Compounds were identified using their retention time and fragmentation pattern; diagnostic ions were compared with both the NIST/EPA/NIH library and the mass-spectrum of the synthetic chemical standard (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) analyzed under the same conditions. The amount (ng/5 insects) of each component was calculated on the basis of the data obtained from the internal standard pentacyclic acid (C15:0).

### 2.7. Cuticular hydrocarbon extraction and gas chromatography analysis

The CHs were extracted according to well establish procedures of Antony and Jallon (1982) and Marcillac et al. (2005). More specifically, 5-day old virgin flies (female and male) were frozen at  $-20$  °C and then individually extracted for 5 min in 30 µl of hexane containing 3.33 ng/µl of C26 (*n*-hexacosane) and 3.33 ng/µl of C30 (*n*-triacontane) as internal standards. Chemical analyses of the extracts were performed with a CP3380 Varian gas chromatograph (GC), fitted with a flame ionization detector and a split-splitless injector (60 ml/min split-flow; valve opening 30 s after injection). A CP-sil 5CB column (25 m × 0.25 mm ID, 0.12 µm film thickness, Agilent) was used for analyses. The temperature program began at 120 °C, ramping at 10 °C/min to 140 °C, then ramping at 2 °C/min to 290 °C, and holding for 10 min. Helium was used as carrier gas (50 cm/s velocity at ambient temperature). The injector and detector temperatures were 280 and 290 °C, respectively. The chemical identity of the cuticular hydrocarbons was checked using gas chromatography–mass spectrometry system equipped with a CP Sil 5CB column (Everaerts et al., 2010). The amount (ng/insect) of each component was calculated based on the readings obtained from the internal standards.

## 2.8. Sexual behavior and progeny

Flies surviving from treatments during pre-imaginal stages were collected as newly eclosed virgin insects. Males were kept separately while females were raised in groups (5 per vial). All used insects were aged of 3 to 5 days so that they are sexually mature. Concerning coupling tests, the male was introduced first in the observation chamber and the female 5 min later. Behavioral tests were always conducted between 8 and 12 am, corresponding to the first peak of behavioral activity of the flies (Grillet et al., 2006). The intensity of the male active courtship display and the ability of the pair to mate were noted over a period of 1 h. The following parameters were recorded: the mating frequency (number of males having mated on the total number of males), the mating latency (time elapsed from the session's start until mating initiation), and the mating duration (between initiation and end of copulation). After mating, each female was introduced into a vial containing 4 g of medium in order to count her adult offspring. The number of adults obtained 12 days after mating was noted. Different combinations of couples were tested (F: female; M: male; C: Control; 1: 1 µg spiromesifen/g medium; 2.5: 2.5 µg/g; 5: 5 µg/g; 7.5: 7.5 µg/g; 10: 10 µg/g):

**Couple 1:** F<sub>C</sub> × M<sub>C</sub>: Female<sub>Control</sub> × Male<sub>Control</sub>

**Couple 2:** F<sub>1</sub> × M<sub>C</sub>: Female<sub>1</sub> × Male<sub>Control</sub>

**Couple 3:** F<sub>C</sub> × M<sub>1</sub>: Female<sub>Control</sub> × Male<sub>1</sub>

**Couple 4:** F<sub>1</sub> × M<sub>1</sub>: Female<sub>1</sub> × Male<sub>1</sub>

**Couple 5:** F<sub>2.5</sub> × M<sub>C</sub>: Female<sub>2.5</sub> × Male<sub>Control</sub>

**Couple 6:** F<sub>C</sub> × M<sub>2.5</sub>: Female<sub>Control</sub> × Male<sub>2.5</sub>

**Couple 7:** F<sub>2.5</sub> × M<sub>2.5</sub>: Female<sub>2.5</sub> × Male<sub>2.5</sub>

**Couple 8:** F<sub>5</sub> × M<sub>C</sub>: Female<sub>5</sub> × Male<sub>Control</sub>

**Couple 9:** F<sub>C</sub> × M<sub>5</sub>: Female<sub>Control</sub> × Male<sub>5</sub>

**Couple 10:** F<sub>5</sub> × M<sub>5</sub>: Female<sub>5</sub> × Male<sub>5</sub>

**Couple 11:** F<sub>7.5</sub> × M<sub>C</sub>: Female<sub>7.5</sub> × Male<sub>Control</sub>

**Couple 12:** F<sub>C</sub> × M<sub>7.5</sub>: Female<sub>Control</sub> × Male<sub>7.5</sub>

**Couple 13:** F<sub>7.5</sub> × M<sub>7.5</sub>: Female<sub>7.5</sub> × Male<sub>7.5</sub>

**Couple 14:** F<sub>10</sub> × M<sub>C</sub>: Female<sub>10</sub> × Male<sub>Control</sub>

**Couple 15:** F<sub>C</sub> × M<sub>10</sub>: Female<sub>Control</sub> × Male<sub>10</sub>

**Couple 16:** F<sub>10</sub> × M<sub>10</sub>: Female<sub>10</sub> × Male<sub>10</sub>.

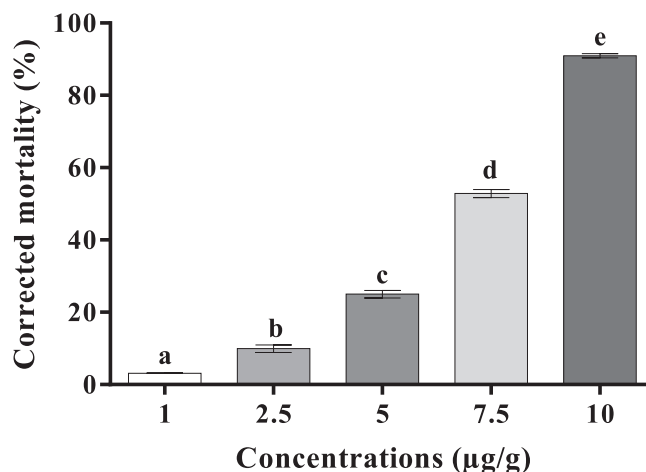
## 2.9. Statistical analysis

The means ± SEM were calculated for each experimental group. The effect of spiromesifen treatment on fresh body weight of female and male flies is shown in Fig. 3. Data from the toxicity assay were analyzed using non-linear sigmoid curve fitting. The goodness of fit to the curve model was evaluated on the basis of R<sup>2</sup> values. The homogeneity of variances was checked using Bartlett's and Brown-Forsythe tests. Analyses of variance (one-way and two-ways) were performed and followed by Tukey's HSD test for multiple comparisons when significant. Data obtained for mating latency and mating duration were subjected to Kruskal–Wallis (KW) test and pairwise multiple comparison using Dunn's method. Mating rate was analyzed using the Chi-square (χ<sup>2</sup>) test. The results of the survival tests were subjected to Kaplan–Meier survival curves and Log-rank test. All statistical analyses were performed using Prism v 6.01 for Windows (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com) and p < 0.05 was considered statistically different. The number of individuals tested per series is given with the results.

## 3. Results

### 3.1. Insecticidal activity

Spiromesifen, administered by ingestion/contact during pre-imaginal stages of *D. melanogaster*, affected in a dose-dependent manner adult emergence. Corrected mortality percentages were as follows: 3.15 ± 0.04% for the lowest concentration (1 µg/g) and 90.93 ±



**Fig. 1.** Toxicity of spiromesifen, administered by ingestion at different concentrations during pre-imaginal stage of *D. melanogaster*: corrected mortality (%) of adult (mean ± SEM; n = 30 replicates of 50 eggs). Control mortality: 5.06 ± 0.23%. Different letters above bars indicate significant differences between tested concentrations at p < 0.05 according to Tukey's HSD test.

**Table 1**

Toxicity of spiromesifen administered by ingestion, at different concentrations during pre-imaginal stages of *D. melanogaster*: lethal concentrations and their fiducial limits.

Lethal concentrations	Concentrations (µg/g)	Fiducial limits
LC90	14.64	9.78–21.91
LC50	6.18	5.28–7.24
LC25	4.02	3.06–5.27
LC10	2.61	1.67–4.08
Hill slope	2.55	1.37–3.72
R <sup>2</sup>	0.98	/

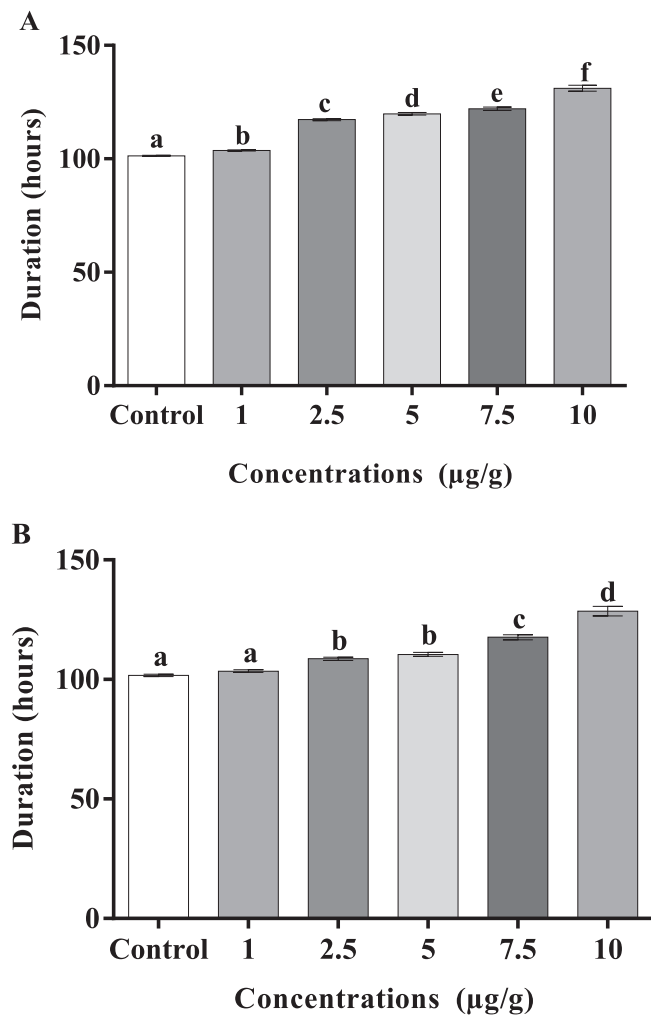
0.57% for the highest concentration (10 µg/g). The mortality percentage measured in untreated control animals was 5.06 ± 0.23%. Our statistical analysis revealed a significant concentration effect (F<sub>4, 10</sub> = 5163; p < 0.001) while the Tukey's HSD test showed a significant increase in mortality with increasing doses (Fig. 1). The lethal concentration (LC) with their respective 95% fiducial limits (95% FL) was presented in Table 1.

### 3.2. Effect on the duration of pre-imaginal development

Treatment during pre-imaginal stage increased the duration of larval development at all tested concentrations (F<sub>5, 1988</sub> = 508.5; p < 0.001). The means values recorded were 101.3 ± 0.27 h for the control, 103.7 ± 0.26 h for the lowest concentration (1 µg/g) and 131.1 ± 1.32 h for the highest concentration (10 µg/g), respectively. Thus, increased concentrations increased the duration of larval development, in a dose-dependent manner (p < 0.001), by approximately +2.5 h for lowest concentration until +30 h for the highest concentration (Fig. 2A). An increased duration of pupal development was observed with all tested concentrations except with the lower concentration (F<sub>5, 1932</sub> = 102.9; p < 0.001), as compared to control individuals. The mean values recorded were: 101.7 ± 0.46 h for control, 103.5 ± 0.51 h for the lowest concentration (1 µg/g) and 128.6 ± 2.02 h for the highest concentration (10 µg/g), respectively (Fig. 2B).

### 3.3. Effect on the adult body weight and water content

Spiromesifen application was also found to significantly decrease the adult male fresh weight compared to control males (F<sub>5, 66</sub> = 56.27; p < 0.001). As compared to 0.86 ± 0.007 mg obtained for control group, the



**Fig. 2.** Effect of spiromesifen, administered by ingestion, at different concentration during pre-imaginal stage of *D. melanogaster*, on the duration of larval (A) and pupal (B) stages (mean  $\pm$  SEM; n = 94–485 replicates). Different letters above bars indicate significant differences between control and tested concentrations at  $p < 0.05$ .

mean values obtained for treated flies ranged between  $0.81 \pm 0.004$  for the lowest concentration and  $0.71 \pm 0.007$  mg for the highest concentration (Fig. 3A). In control females the body weight was  $1.52 \pm 0.007$  mg. Spiromesifen treatments caused a significant reduction ( $F_{5, 66} = 54.68$ ;  $p < 0.001$ ) in adult female fresh weight. The mean values noted in the treated series were  $1.50 \pm 0.004$  mg for the lowest concentration and  $1.36 \pm 0.01$  mg for the highest concentration (Fig. 3B). Spiromesifen also had a significant reduction on male (Fig. 3C) and female (Fig. 3D) body water content compared to control male ( $F_{5, 66} = 67.77$ ;  $p < 0.001$ ) and female flies ( $F_{5, 66} = 141.9$ ;  $p < 0.001$ ).

### 3.4. Effect on the adult males survival

Spiromesifen treatments during pre-imaginal stage of *D. melanogaster* resulted in an enhanced lethality in adult males (Log-rank test,  $\chi^2 = 52.93$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.001$ ) during life span. In untreated males, 50% adults had died (lethal time 50 =  $LT_{50}$ ) after 84 days against 70 days for

the lowest concentration used (1  $\mu\text{g/g}$ ) and 63 days for the highest concentration used (10  $\mu\text{g/g}$ ) (Fig. 4).

### 3.5. Effect on the fatty acids (FAs) of flies

Among the nine FAs detected in both male and female adults (Table 2), four were saturated (SFAs; C12:0, C14:0, C16:0, C18:0), three were monounsaturated (MUFAs; C14:1n-5, C16:1n-7, C18:1n-9), and two were polyunsaturated (PUFAs; 18:2n-6, 18:3n-3). GC/MS spectral results showed that female flies contain higher amounts of FAs than males. Four major FAs were identified in control and treated adult: C16:1n-7, C14:0, C18:1n-9, C16:0. In females, spiromesifen treatments affected the total amount of FAs with a significant dose-dependent effect ( $F_{5, 48} = 75.79$ ;  $p < 0.001$ ). In females treated with 1  $\mu\text{g/g}$  and 10  $\mu\text{g/g}$ , the mean quantity of FAs detected (per female) was 6473 ng and 3211 ng, respectively. In comparison, control females produced 7051 ng FAs (Fig. 5A). Therefore, the total quantity of FAs decreased to >50% of the control amount in females treated with the highest concentration. Six FAs were affected: C12:0, C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:2n-6 (Table 2). Similar results were found in males: the total amount of FAs was also reduced by all spiromesifen treatments ( $F_{5, 48} = 43.08$ ;  $p < 0.001$ ). The mean values recorded were: 3488 ng/male for control, 2937 ng/male for the lowest concentration (1  $\mu\text{g/g}$ ) and 1629 ng/male for the highest concentration (10  $\mu\text{g/g}$ ), respectively (Fig. 5B). Six FAs were affected in males: C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 (Table 3).

### 3.6. Effect on cuticular hydrocarbons of flies

GC analysis of male and female extracts revealed the presence of 30 components in females (Table 4) and 20 in males (Table 5). The CH profile of control flies is clearly sexually dimorphic (Jallon, 1984; Blomquist et al., 2018). In particular, the females abundantly synthesize bi-unsaturated compounds (dienes) whereas males produce mono-unsaturated HCs (monoenes) more abundantly than in females. In *D. melanogaster* males, the main compounds are (Z)-7-tricosene (7T) whereas their females produce (Z,Z)-7, 11)-heptacosadiene (7,11-HD).

Our data showed that spiromesifen treatments affected the total amounts of CHs in both sexes. Treated females showed a decrease in the total quantities of CHs with a dose-dependent effect ( $F_{5, 84} = 88.23$ ;  $p < 0.001$ ) (2016 ng/female and 1151 ng/female for 1  $\mu\text{g/g}$  and 10  $\mu\text{g/g}$  treated series, respectively), as compared to control females (2128 ng/female) (Fig. 6A). Comparisons between control and treated females also revealed significant differences in twelve CHs: 7,11-TD, n-C23, 9,13-PD, 7,11-PD, 5,9-PD, 25Br, 9-P, 7,11-HD, 27Br, 7-H, 7,11-ND and 29Br ( $F_{5, 54} = 78.55$ ;  $p < 0.001$ ) (Table 4). Significant differences were also observed between control and treated males at the level of the total amounts of CHs decreasing between 2066 ng/male (for controls) to 1841 ng/male and 1013 ng/male for the lowest concentration (1  $\mu\text{g/g}$ ) and the highest concentration (10  $\mu\text{g/g}$ ), respectively (Fig. 6B), respectively. Seven CHs were clearly affected in males: 9-T, 7-T, 5-T, n-C23, 25Br, 7-P, 27Br (Table 5).

### 3.7. Effects on sexual behavior and progeny

Spiromesifen added in the pre-imaginal food affected the sexual behavior of resulting adults with a dose-dependent effect as compared to control pairs of flies (Fig. 7). The copulation frequency was reduced: Chi-squared test ( $\chi^2$ ) indicates a significant effect of used concentrations ( $\chi^2 = 50.40$ ,  $df = 15$ ,  $p < 0.001$ ), while a significant increase was

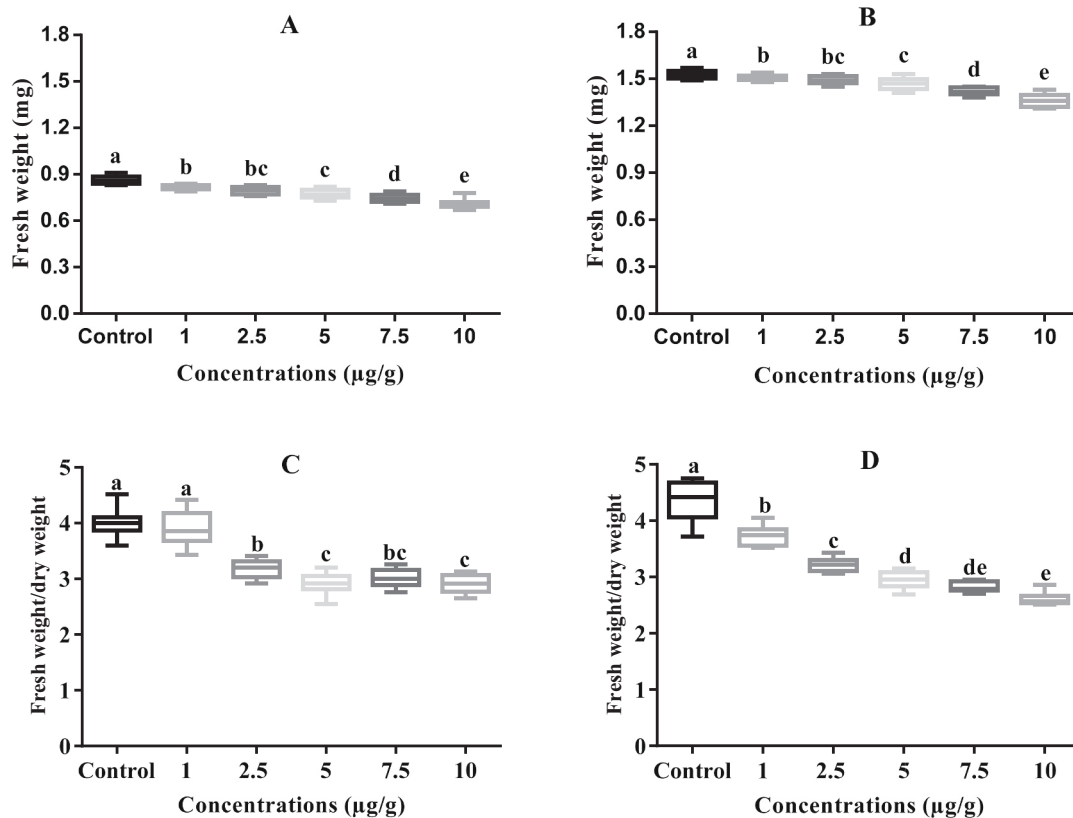


Fig. 3. Effect of spiromesifen, administered at different concentrations during pre-imaginal stage of *D. melanogaster*, on body weight males (A), females (B) and on ratio fresh weight/dry weight (corresponding to water content) of males (C) and females (D) (the box represents the median and the first and third quartiles, and the whiskers extend as far as the minimum and maximum values after outliers; n = 12 replicates of 10 adults). Different letters above bars indicate significant differences between control and tested concentrations at  $p < 0.05$  according to Tukey's HSD test.

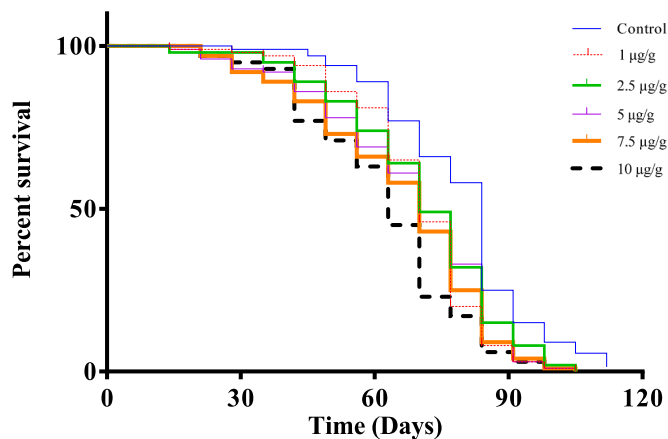


Fig. 4. Effect of spiromesifen, administered by ingestion at different concentration during pre-imaginal stage of *D. melanogaster* on the male survival (n = 100 males).

observed both for the copulation latency (KW = 48.33;  $p < 0.001$ ) and the copulation duration (KW = 227.4;  $p < 0.001$ ), as compared to control pairs.

The progenies produced by controls and treated couples were counted (Fig. 8). Statistical analysis of data showed a dose-dependent decrease in the number of adults in the F1 progeny for all treated pairs as compared to control pairs ( $F_{15, 392} = 139.4$ ;  $p < 0.001$ ). All together, the more important effect was noted when the two partners were treated with the highest spiromesifen doses.

#### 4. Discussion

Several recent studies have shown the effectiveness of spiromesifen against a variety of pest insects (Bouabida et al., 2017; Sarbaz et al., 2017; Abed El Fatah et al., 2019). Our results indicate that spiromesifen is highly toxic and induces a significant dose-response insecticidal effect against *D. melanogaster* when added in the diet during pre-adult stages. Similarly, this product was also potent in topical bioassays when applied on *D. melanogaster* pupae (Kissoum et al., 2020). The toxic effect of spiromesifen has recently been evaluated in other Diptera species including the mosquito larvae of *Culiseta longiareolata* (Bouabida et al., 2017). In the literature, the toxicity of pesticides depends on the chemistry of pesticides, on their usage rates, microclimate condition, and development stages of the studied insect (Kontsedalov et al., 2009).

Insecticides may induce multiple sub-lethal effects on insect life traits, such as reduced fecundity (Oulhaci et al., 2018; Kissoum et al., 2020), shortened longevity (Ahmad et al., 2015), prolonged developmental rate (Stark and Banks, 2003), affected behavior (Aribi et al., 2017). They can also alter physiology by interfering with the function of glutathione S-transferases, carboxylesterases, and other metabolic enzymes (Desneux et al., 2007). Our results indicate that pre-imaginal exposure to insecticide affected the duration of both larval and pupal stages as well as the fresh body weight of adult flies. Spiromesifen when applied topically on *D. melanogaster* pupae was also reported to reduce fecundity, fertility and the number of both larvae, pupae and adults (males and females) of the F1 generation (Kissoum et al., 2020). This decrease in progeny observed was dose- and sex-dependant. Moreover, the males were more sensitive to spiromesifen than the females as evidenced by the sex ratio values recorded. Nauen and Bretschneider (2002) reported that spiromesifen affects development and fecundity of



**Table 2**

Effect of spiromesifen administered by ingestion at different concentrations during pre-imaginal stages of *D. melanogaster* females on fatty acids (mean  $\pm$  SEM; n = 10 replicates; Total FAs = total fatty acids; SFA = saturated fatty acids; USFA = unsaturated fatty acids). For the same fatty acid, the values with different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

Fatty acids*	Control	1 $\mu$ g/g	2.5 $\mu$ g/g	5 $\mu$ g/g	7.5 $\mu$ g/g	10 $\mu$ g/g
C12:0	423 $\pm$ 17.21a	439 $\pm$ 16.39a	421 $\pm$ 17.29a	404 $\pm$ 14.42a	334 $\pm$ 18.19a	206 $\pm$ 10.45b
C14:0	1471 $\pm$ 69.14a	1302 $\pm$ 62.35b	1419 $\pm$ 41.41a	1361 $\pm$ 45.74ab	1056 $\pm$ 62.50c	643 $\pm$ 43.72d
C14:1n-5	83 $\pm$ 5.34a	84 $\pm$ 3.15a	81 $\pm$ 2.83a	89 $\pm$ 5.44a	72 $\pm$ 5.85a	36 $\pm$ 2.63a
C16:0	1283 $\pm$ 46.35a	1101 $\pm$ 25.83b	1059 $\pm$ 18.29bc	984 $\pm$ 20.28c	743 $\pm$ 15.55d	604 $\pm$ 24.22e
C16:1n-7	1679 $\pm$ 60.24a	1608 $\pm$ 41.61ab	1512 $\pm$ 42.08bc	1472 $\pm$ 24.90c	1181 $\pm$ 50.13d	736 $\pm$ 26.41e
C18:0	129 $\pm$ 8.95a	101 $\pm$ 2.36a	85 $\pm$ 3.57a	79 $\pm$ 2.66a	74 $\pm$ 4.47a	65 $\pm$ 3.74a
C18:1n-9	1336 $\pm$ 29.09a	1210 $\pm$ 32.41b	960 $\pm$ 37.44c	963 $\pm$ 29.07c	750 $\pm$ 15.82d	593 $\pm$ 21.11e
C18:2n-6	607 $\pm$ 7.93a	585 $\pm$ 12.38a	450 $\pm$ 14.63b	453 $\pm$ 12.53b	379 $\pm$ 17.63bc	311 $\pm$ 13.99c
C18:3n-3	39 $\pm$ 1.54a	43 $\pm$ 1.02a	21 $\pm$ 0.99a	22 $\pm$ 0.73a	21 $\pm$ 1.28a	19 $\pm$ 0.90a
Total FAs	7050 $\pm$ 229.30a	6473 $\pm$ 181.6ab	6008 $\pm$ 150b	5827 $\pm$ 131.60b	4610 $\pm$ 140.40c	3213 $\pm$ 107.50d
SFA	3306 $\pm$ 138.00a	2943 $\pm$ 98.89b	2984 $\pm$ 67.62ab	2828 $\pm$ 77.84b	2207 $\pm$ 88.39c	1518 $\pm$ 60.25d
USFA	3744 $\pm$ 99.81a	3530 $\pm$ 86.70a	3024 $\pm$ 87.89b	2999 $\pm$ 62.18b	2403 $\pm$ 55.61c	1695 $\pm$ 52.32d

\* C12:0, lauric; C14:0, myristic; C16:0, palmitic; C18:0, stearic; C14:1n5, myristoleic; C16:1n-7, palmitoleic; C18:1n9, oleic; C18:2n-6, LINOLEIC; C18:3n-3,  $\alpha$ -linolenic.

whitefly in a rate-dependent manner by trans-ovarian contamination. Application of spiromesifen at its LC50 and LC90 induced a significant decrease in the body weight and volume in *C. longiareolata* fourth stage larvae as compared to controls (Bouabida et al., 2017). Müller et al. (2019) found that larval exposure to the pyrethroid lambda-cyhalothrin for just a few days prolonged the duration of development of *Phaedon cochleariae* larvae. Moreover, insecticide-exposed adult males were lighter as compared to non-exposed ones. Similarly, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) larvae exposed to sublethal concentrations of the neonicotinoid imidacloprid also showed an increased development duration and a reduced adult body mass (Whitehorn et al., 2018), suggesting that trans-metamorphosis effects can occur from the larvae into adult.

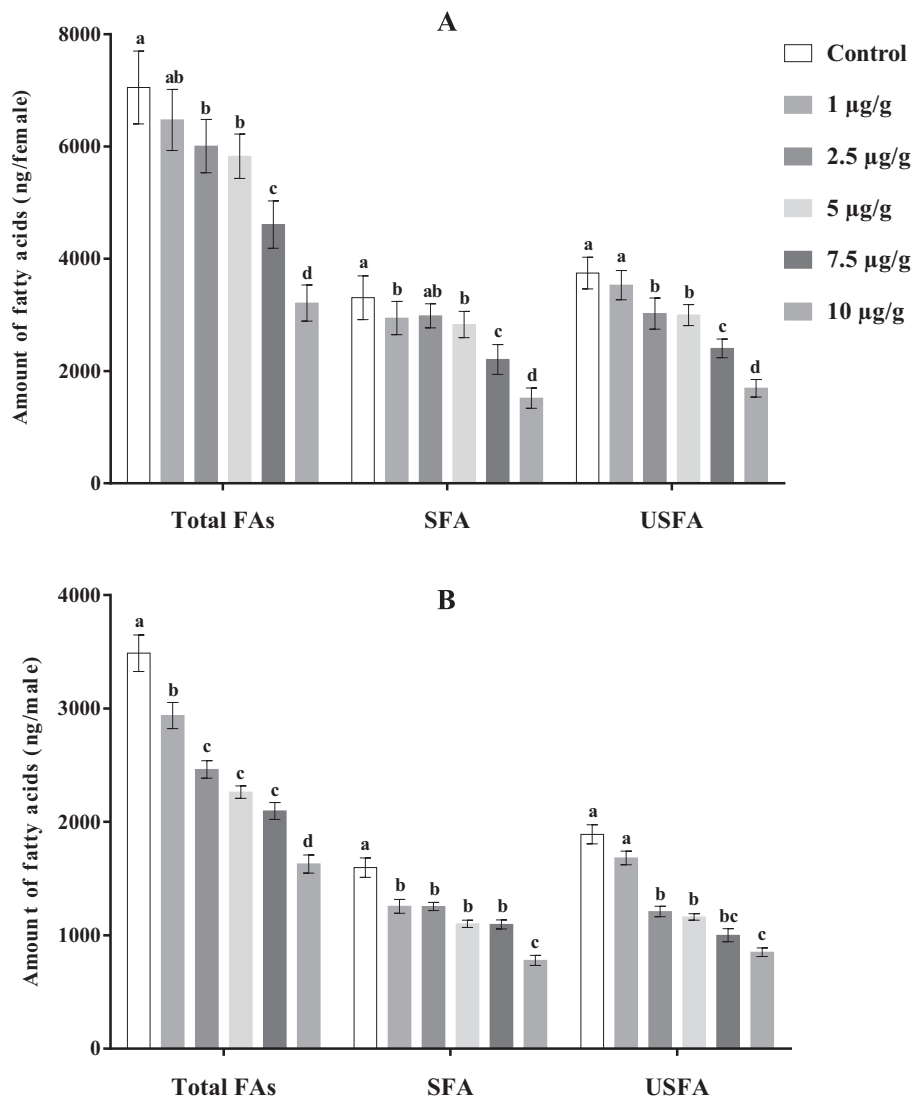
Development duration is critical for many life traits given that it can directly affect larval competition. Several studies have highlighted that both developmental duration and adult longevity show a relationship to different factors of environmental stress such as exposure to insecticides (Zwaan et al., 1995). Our results indicate that males not exposed to spiromesifen during their pre-imaginal life survived longer than exposed males. Similarly, adult longevity was reduced in *Neoseiulus californicus* exposed to spiromesifen (Cloyd et al., 2006) or to spirodiclofen (Maroufpoor et al., 2016). Pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, topically applied on *D. melanogaster* larvae, increased the duration of pupal development and longevity of adults (Bensebaa et al., 2015). The shortened longevity following treatment observed in our study could be also due to reduced food uptake as a consequence of insecticide effect on food preference, and/or on sensory ability (Maroufpoor et al., 2016).

Regulation of water content is essential for the survival of all

organisms. In insects, water can be gained through consumption, absorption of atmospheric water vapor and production of water during metabolism. Simultaneously, water is lost through the processes of excretion, cuticular and respiratory transpiration and in bodily secretions (Hadley, 1994). The epicuticular lipids are involved in reducing insect water-loss (Gibbs and Crockett, 1998). Cuticular water-loss accounts for >80% of total water-loss in most insects studied to date (Quinlan and Gibbs, 2006). Transpiration rates are strongly affected by temperature, probably via temperature's effects on lipid phase behavior. In addition several recent studies have highlighted the potential importance of other cuticular properties, specifically melanization, in conserving water (Parkash et al., 2008). Despite this early recognition, our understanding of the process by which water moves through the cuticle is limited (Gibbs and Rajpurohit, 2010). According to Ferveur et al. (2018) flies with a higher water content, a lower proportion of desaturated CHs and with defective desaturase expression in the fat body showed reduced desiccation resistance. In the current study, the water content of both female and male adult flies was reduced by spiromesifen, this suggesting that the thin layer of cuticular lipids was altered as a consequence of an inhibition of lipid synthesis. Indeed, the product tested here was reported to inhibit acetyl-CoA carboxylase (ACCase) and to interfere with the biosynthesis of lipids in insects and mites (Bretschneider et al., 2012). More specifically, Lümmen et al. (2014) showed that the enol metabolite of the related cyclic keto-enol insecticide, spirotetramat, inhibited *T. urticae* ACCase by interacting with the carboxyltransferase (CT) domain.

Lipids play crucial roles in general metabolism and reproduction and have many functions in cells beside their obvious role in energy storage. In particular, they make up cell membranes, and their products serve as intra- and extracellular messengers controlling and regulating many vital body functions (Arrese and Soulages, 2010; Shen et al., 2010). Lipid provides the energy required during extended non-feeding periods (Gibbs and Crockett, 1998). The amount of lipids in insects varies considerably and can be influenced by many factors including the developmental stage, nutritional state, sex, environmental temperature, diapause and migratory flight. In most insects, females contain more lipid than males, likely because the lipid reserve is used for egg production (Beenackers et al., 1985). Fatty acids (FAs), the major components of lipids, are used as fuel in all metabolic systems, playing an important role in the biochemical and physiological response (Neves et al., 2015). In insects, a change in FA content can affect female fecundity (Bauerfeind et al., 2007) and remating (Baer et al., 2001), as well as production of sex pheromones (Ueyama et al., 2005). The presence and composition of FAs in cell membranes can also affect cold adaptation in *D. melanogaster* (Overgaard et al., 2008). GC-MS analyses revealed a reduction in the amount of total fatty acids, and so, both the saturated and the unsaturated in spiromesifen-treated male and female flies. Abed El Fatah et al. (2019) reported that spiromesifen and spirotetramat treatments induced a reduction in total lipid (FAs) contents by 10.33 and 8.67%, respectively.

CHs covering the insect cuticle provide protection against desiccation and other environmental challenges by acting as a physical barrier (Ferveur et al., 2018), by reducing the penetration of insecticides, chemicals, and toxins (Wang et al., 2020). CHs also provide protection from attack by microorganisms, parasitic insects, and predators (Golebiowski et al., 2013). They were shown to play diverse roles in chemical communication including aggregation, mate and species recognition (Blomquist et al., 1987; Howard and Blomquist, 2005; Ferveur, 2005; Everaerts et al., 2010; Snellings et al., 2018). In *D. melanogaster*, CHs are little or no volatile and are generally detected by contact using the taste



**Fig. 5.** Effect of spiromesifen, administered by ingestion, at different concentration during pre-imaginal stage of *D. melanogaster*, on the amount of fatty acids of *D. melanogaster* females (A) and males (B) (mean  $\pm$  SEM; n = 10 replicates; Total FAs: total fatty acids; SFA: saturated fatty acids; USFA: unsaturated fatty acids. For the same fatty acid group, different letters above bars indicate significant differences between control and tested concentrations in each sex at p < 0.05).

**Table 3**

Effect of spiromesifen administered by ingestion at different concentrations during pre-imaginal stages of *D. melanogaster* males on fatty acids (mean ± SEM; n = 10 replicates; Total FAs = total fatty acids; SFA = saturated fatty acids; USFA = unsaturated fatty acids). For the same fatty acid, the values with different letters indicate significant differences at p < 0.05.

Fatty acids*	Control	1 µg/g	2.5 µg/g	5 µg/g	7.5 µg/g	10 µg/g
C12:0	159 ± 7.89a	139 ± 8.62a	145 ± 8.48a	145 ± 9.50a	145 ± 7.26a	118 ± 11.52a
C14:0	696 ± 34.80a	592 ± 35.14bc	654 ± 20.91ab	573 ± 18.96c	544 ± 21.25c	376 ± 32.56d
C14:1n-5	41 ± 2.34a	37 ± 3.18a	38 ± 2.61a	33 ± 4.70a	30 ± 4.59a	23 ± 2.62a
C16:0	608 ± 38.30a	469 ± 20.12b	427 ± 12.24bc	353 ± 9.70c	369 ± 12.50c	253 ± 9.37c
C16:1n-7	842 ± 38.08a	722 ± 33.39b	655 ± 18.66bc	596 ± 14.12c	494 ± 51.72d	388 ± 24.07e
C18:0	135 ± 42.48a	55 ± 2.50b	27 ± 2.21b	30 ± 2.66b	38 ± 3.82b	32 ± 2.91b
C18:1n-9	617 ± 26.39a	536 ± 20.84b	300 ± 15.89c	292 ± 11.96c	287 ± 10.99c	245 ± 10.82c
C18:2n-6	366 ± 22.35a	361 ± 13.64a	207 ± 12.09b	231 ± 9.02b	181 ± 10.77b	179 ± 13.35b
C18:3n-3	25 ± 1.88 a	26 ± 1.23a	10 ± 1.11a	11 ± 1.61a	8 ± 1.10a	16 ± 0.65a
Total FAs	3489 ± 161.10a	2937 ± 114.50b	2463 ± 77.21c	2264 ± 55.10c	2096 ± 74.57c	1630 ± 80.07d
SFA	1597 ± 85.77a	1255 ± 61.35b	1254 ± 35.84b	1102 ± 31.75b	1095 ± 39.91b	779 ± 44.61c
USFA	1892 ± 83.50a	1682 ± 59.59a	1209 ± 46.04b	1162 ± 28.37b	1001 ± 58bc	851 ± 37.51c

\* C12:0, lauric; C14:0, myristic; C16:0, palmitic; C18:0, stearic; C14:1n5, myristoleic; C16:1n-7, palmitoleic; C18:1n9, oleic; C18:2n-6, linoleic; C18:3n-3, α-linolenic.

system (Montell, 2009; Ahmed et al., 2019). However, they can also be perceived at short distance via olfaction (Farine et al., 2012). Moreover, in *D. melanogaster*, the CH composition can be impacted by several factors like age, sex, maturation, interaction with the opposite sex, temperature, food, and hormones (Ferveur, 2005; Everaerts et al., 2010; Raipurohit et al., 2017; Fedina et al., 2012; Chiang et al., 2016). Changes in CH profiles can affect mating behavior (Ferveur and Sureau, 1996). In line with our expectations, the CHs profile of adult *D. melanogaster* was altered by the insecticide treatment. Desaturated CHs seem to be more affected than linear ones in both sexes. This result suggests probably that a desaturase is affected/blocked in spiromesifen-treated flies. It was reported that halofenozide, an edysteroid agonist reduced the quantities of the principal CHs in *C. pipiens* larvae (Amira et al., 2013). Müller et al. (2017) also showed a negative impact by a sub-lethal exposure to pyrethroids on the CH profile during the two subsequent generations of *Phaedon cochleariae*. Thus, alterations of the CH profile due to insecticide exposure can affect the mating behavior. Changed CHs profiles may also affect the protective role of the cuticle against desiccation and modulate the uptake of insecticides (Müller et al., 2017).

The sexual display of the male *D. melanogaster* takes place prior to mating and is composed of stereotypical behaviors and requires many sensory signals, that can influence mating success (Greenspan and Ferveur, 2000; Markow and O'Grady, 2005; Lasbleiz et al., 2006). *D. melanogaster* behaviors are based on recognition of chemicals and especially pheromones representing intraspecific chemical signals that play an important role in attracting and discrimination of sexual partners (Ferveur, 2005; Farine et al., 2012). Beside its effect on decreased fertility and fecundity, it also impacted courtship and copulatory behaviors. Compared to control couples, treated couples initiate a delayed

**Table 4**

Effect of spiromesifen administered by ingestion at different concentrations during pre-imaginal stages of *D. melanogaster* on cuticular hydrocarbons of females (mean ± SEM; n = 15 replicates; ng/female). For the same cuticular hydrocarbon, the values followed by different letters are significantly different at p < 0.05.

Compounds*	Control	1 µg/g	2.5 µg/g	5 µg/g	7.5 µg/g	10 µg/g
n-C21	12 ± 0.48a	10 ± 0.28a	9 ± 0.58a	10 ± 0.64a	7 ± 0.38a	5 ± 0.48a
n-C22	5 ± 0.18a	5 ± 0.08a	4 ± 0.34a	5 ± 0.28a	4 ± 0.24a	4 ± 0.20a
7,11 TD	32 ± 1.78a	28 ± 1.22ab	25 ± 2.00ab	17 ± 2.31ac	12 ± 1.69bc	7 ± 0.88c
23Br	14 ± 0.41a	12 ± 0.68a	10 ± 0.87a	8 ± 0.84a	4 ± 0.89a	1 ± 0.19a
9T	8 ± 0.67a	7 ± 0.46a	6 ± 0.53a	5 ± 0.38a	4 ± 0.28a	3 ± 0.20a
7T	28 ± 1.80a	30 ± 0.99a	28 ± 1.07a	20 ± 0.53a	15 ± 0.84a	18 ± 4.25a
5T	18 ± 9.54a	9 ± 3.09a	5 ± 0.20a	5 ± 0.30a	5 ± 0.17a	4 ± 0.14a
n-C23	114 ± 8.92a	114 ± 3.37a	111 ± 4.49a	115 ± 4.54a	97 ± 4.30ab	82 ± 4.78b
n-C24	6 ± 1.15a	5 ± 0.38a	4 ± 0.22a	8 ± 1.39a	5 ± 0.32a	5 ± 0.46a
9,13 PD	40 ± 14.07ac	24 ± 4.63ab	17 ± 0.75b	45 ± 13.00c	11 ± 0.57b	13 ± 4.46b
7,11 PD	95 ± 4.00a	76 ± 4.37b	64 ± 5.21b	64 ± 3.38b	45 ± 3.02c	36 ± 3.23c
5,9 PD	49 ± 2.04a	39 ± 2.22ab	33 ± 2.65abc	33 ± 1.72abc	23 ± 1.54bc	18 ± 1.64c
25Br	36 ± 1.51a	29 ± 1.65ab	24 ± 1.96ab	24 ± 1.27ab	17 ± 1.14b	14 ± 1.21b
9p	86 ± 4.79a	80 ± 3.09a	68 ± 2.87ab	57 ± 2.59bc	46 ± 2.01c	42 ± 3.34c
7P	23 ± 2.02a	19 ± 0.96a	16 ± 0.95a	12 ± 0.82a	12 ± 1.12a	12 ± 2.31a
5P	4 ± 0.17a	4 ± 0.20a	3 ± 0.09a	3 ± 0.22a	3 ± 0.22a	3 ± 0.33a
n-C25	61 ± 1.77a	64 ± 2.19a	67 ± 3.04a	59 ± 3.79a	57 ± 3.61a	55 ± 3.58a
9,13HD	16 ± 0.92a	16 ± 0.77a	15 ± 0.85a	11 ± 1.01a	9 ± 0.50a	7 ± 0.61a
7,11HD	762 ± 18.28a	726 ± 14.29b	678 ± 17.22c	571 ± 21.86d	466 ± 12.86e	393 ± 13.70f
27Br	261 ± 6.26a	249 ± 4.89ab	232 ± 5.90b	195 ± 7.48c	160 ± 4.40d	135 ± 4.69e
5,9HD	21 ± 0.50a	20 ± 0.39a	19 ± 0.47a	16 ± 0.59a	13 ± 0.35a	11 ± 0.37a
7H	51 ± 1.57a	55 ± 3.11a	58 ± 3.32a	48 ± 3.82ab	42 ± 2.95ab	33 ± 3.48b
n-C27	19 ± 0.89a	19 ± 0.90a	21 ± 1.42a	19 ± 1.32a	21 ± 1.79a	20 ± 2.06a
n-C28	10 ± 0.53a	10 ± 0.32a	11 ± 1.76a	8 ± 0.32a	7 ± 0.41a	8 ± 0.96a
9,13ND	10 ± 0.43a	8 ± 0.41a	9 ± 0.44a	4 ± 0.54a	5 ± 0.27a	4 ± 0.34a
7,11ND	207 ± 9.47a	220 ± 8.27a	221 ± 9.59a	158 ± 8.10b	154 ± 7.80b	133 ± 10.95c
29Br	112 ± 5.10a	118 ± 4.45a	119 ± 5.16a	85 ± 4.36b	83 ± 4.20b	71 ± 5.89b
7N	2 ± 0.21a	2 ± 0.13a	2 ± 0.14a	1 ± 0.12a	1 ± 0.23a	1 ± 0.14a
n-C29	5 ± 0.17a	5 ± 0.10a	4 ± 0.15a	4 ± 0.17a	4 ± 0.25a	3 ± 0.24a
31Br	21 ± 1.87a	19 ± 1.07a	17 ± 2.03a	18 ± 1.80a	10 ± 1.06a	10 ± 0.70a
Total CH	2128 ± 56.32a	2016 ± 36.83ab	1892 ± 40.20b	1628 ± 41.21c	1342 ± 33.74d	1151 ± 35.15e
Desaturated	1455 ± 47.86a	1359 ± 27.76b	1257 ± 28.24c	1071 ± 27.33d	867 ± 21.80e	738 ± 23.11f
Linear	230 ± 8.86a	231 ± 5.35a	232 ± 7.65a	227 ± 8.42a	201 ± 9.02a	182 ± 8.23a
Branched	443 ± 10.43a	426 ± 7.63a	403 ± 8.68ab	330 ± 9.75bc	274 ± 6.92 cd	231 ± 8.43d

\* n-C21: n-heneicosane; n-C22: n-docosane; 7,11-TD: (Z,Z)-7,11-tricosadiene; 9-T: (Z)-9-tricosene; 7T: (Z)-7-tricosene; 5-T: (Z)-5-tricosene; n-C23: n-tricosane; n-C24: n-tetracosane; 9,13-PD: (Z,Z)-9,13-pentacosadiene; 7,11-PD: (Z,Z)-7,11-pentacosadiene; 5,9-PD: (Z,Z)-9,5-pentacosadiene; 25-Br: 2-methyltetracosane; 9-P: (Z)-9-pentacosene; 7-P: (Z)-7-pentacosene; 5-P: (Z)-5-pentacosene; n-C25: n-pentacosane; 9,13-HD: (Z,Z)-9,13-heptacosadiene; 7,11-HD: (Z,Z)-7,11-heptacosadiene; 27-Br: 2-methylhexacosane; 9-H: (Z)-9-heptacosene; 7-H: (Z)-7-heptacosene; n-C27: n-heptacosane; 28-Br: 2-methylheptacosane; 9,13-ND: (Z,Z)-9,13-nonacosadiene; 7,11-ND: (Z,Z)-7,11-nonacosadiene; 29-Br: 2-methyl-octacosane; n-C29: n-nonacosane; 31-Br: 2-methyltriacontane.

copulation of shorter duration. This effect may be due to the alteration of female receptivity induced by the changed male CH profile (Grillet et al., 2006; Marcillac and Ferveur, 2004). Generally, *D. melanogaster* copulation lasts around 20 min during which the male transfers sperm, various proteins and the *cis*-vaccenyl acetate pheromone into the reproductive tract of the female (Misra and Wolfner, 2020). The effects of spiromesifen in defective progeny are likely due to disturbance of vitellogenesis and spermatogenesis leading to a decrease in fecundity and fertility as suggested by the study of Velazquez et al. (1990). Similar observations reported in *D. melanogaster* were confirmed by Kissoum et al. (2020) using topical bioassays with spiromesifen. Disruption of sexual behavior and fecundity has also been described in experiments with other insecticides. In *D. melanogaster*, azadirachtin alters the reproductive behavior of both sexes via mating and post-mating processes (Aribi et al., 2017). The anti-feeding activity of spirocyclic tetrone/tetramic acid derivatives was not reported until now. In crop protection, spiromesifen a well-known systemic pesticide is used for sucking pest control upon foliar application targeting acetyl-CoA carboxylase (Nauen and Denholm, 2005). Its selectivity is due to its specific mode of action on lipid synthesis (Abed El Fatah et al., 2019;

Gutbrod et al., 2020). When added in the diet during pre-adult stages spiromesifen affect the total amounts of FAs and CHs in both sexes and consequently the sexual behavior and the amount of progeny. Similar effects were also observed in topical bioassays using *D. melanogaster* pupae. Indeed, it affected the amounts of lipids and the rate of malondialdehyde during the pupal development (Bensafi-Gheraibia et al., 2013), and reduced both fecundity, fertility and progeny of survivors (Kissoum et al., 2020).

## 5. Conclusion

Our overall results indicate that the addition of spiromesifen in the preimaginal diet affects growth, development and reproduction. The effects of spiromesifen on FA contents and CH profiles confirm its primary mode of action on lipid synthesis. Thus, the reduced fecundity and fertility could be explained by the alteration of lipid metabolism during the vitellogenesis process. The alteration of sexual behavior possibly resulting of one or several of these effects conjugated. Further behavioral experiments exploring food preference and olfactory ability could be useful to determine more precisely the specificity of the physiological and behavioral defects observed here. Moreover, the enzyme activities related to lipid metabolism could give additional information.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**Table 5**

Effect of spiromesifen administered by ingestion at different concentrations during pre-imaginal stages of *D. melanogaster* on cuticular hydrocarbons of males (mean  $\pm$  SEM; n = 15 replicates; ng/male). For the same cuticular hydrocarbon, the values followed by different letters are significantly different at p < 0.05.

Compounds*	Control	1 $\mu$ g/g	2.5 $\mu$ g/g	5 $\mu$ g/g	7.5 $\mu$ g/g	10 $\mu$ g/g
n-C21	36 $\pm$ 3.38	37 $\pm$ 4.13a	23 $\pm$ 2.24a	20 $\pm$ 1.70a	21 $\pm$ 1.97a	15 $\pm$ 1.37a
7D	12 $\pm$ 0.86a	11 $\pm$ 0.75a	9 $\pm$ 0.50a	8 $\pm$ 0.36a	7 $\pm$ 0.40a	6 $\pm$ 0.33a
cVA	183 $\pm$ 45.28a	94 $\pm$ 19.04b	57 $\pm$ 18.17bc	27 $\pm$ 9.54c	45 $\pm$ 14.14c	44 $\pm$ 13.04c
n-C22	11 $\pm$ 0.46a	12 $\pm$ 1.34a	9 $\pm$ 0.38a	8 $\pm$ .032a	7 $\pm$ 0.31a	7 $\pm$ 0.37a
23Br	13 $\pm$ 0.75a	14 $\pm$ 1.63a	8 $\pm$ 0.72a	5 $\pm$ 0.61a	5 $\pm$ 0.25a	5 $\pm$ 0.40a
9T	84 $\pm$ 5.59a	66 $\pm$ 4.10ab	51 $\pm$ 3.57ab	39 $\pm$ 2.41b	34 $\pm$ 1.30b	29 $\pm$ 1.48b
7T	901 $\pm$ 47.52a	794 $\pm$ 41.63b	688 $\pm$ 24.45c	562 $\pm$ 21.16d	523 $\pm$ 24.37d	418 $\pm$ 25.46e
5T	76 $\pm$ 4.26a	74 $\pm$ 2.62ab	56 $\pm$ 2.63ab	45 $\pm$ 2.13ab	42 $\pm$ 1.35ab	33 $\pm$ 2.60b
n-C23	206 $\pm$ 10.94a	182 $\pm$ 6.22ab	165 $\pm$ 6.19abc	143 $\pm$ 5.62bc	138 $\pm$ 4.84c	125 $\pm$ 6.55c
25Br	156 $\pm$ 12.21a	135 $\pm$ 12.23ab	113 $\pm$ 9.72b	61 $\pm$ 8.02c	57 $\pm$ 3.43c	56 $\pm$ 5.49c
9p	38 $\pm$ 3.91a	29 $\pm$ 3.00a	27 $\pm$ 3.32a	19 $\pm$ 1.44a	14 $\pm$ 1.06a	17 $\pm$ 1.44a
7P	240 $\pm$ 32.61a	208 $\pm$ 22.50a	157 $\pm$ 15.31b	129 $\pm$ 14.28bc	112 $\pm$ 12.68c	116 $\pm$ 12.87bc
5P	8 $\pm$ 1.96a	8 $\pm$ 1.10a	5 $\pm$ 0.42a	4 $\pm$ 0.36a	4 $\pm$ 0.34a	4 $\pm$ 0.35a
n-C25	24 $\pm$ 1.48a	25 $\pm$ 1.81a	22 $\pm$ 1.07a	20 $\pm$ 1.19a	18 $\pm$ 1.01a	18 $\pm$ 1.07a
27Br	178 $\pm$ 7.31a	159 $\pm$ 9.18ab	126 $\pm$ 4.33bc	117 $\pm$ 2.94c	114 $\pm$ 3.94c	102 $\pm$ 4.31c
7H	3 $\pm$ 0.50a	6 $\pm$ 0.81a	3 $\pm$ 0.26a	2 $\pm$ 0.17a	2 $\pm$ 0.17a	2 $\pm$ 0.21a
n-C27	7 $\pm$ 0.88a	9 $\pm$ 1.36a	6 $\pm$ 0.75a	6 $\pm$ 0.68a	5 $\pm$ 0.25a	6 $\pm$ 0.61a
29Br	62 $\pm$ 5.11a	62 $\pm$ 1.81a	52 $\pm$ 4.49a	56 $\pm$ 5.25a	47 $\pm$ 1.99a	45 $\pm$ 4.03a
n-C29	2 $\pm$ 0.26a	2 $\pm$ 0.14a	2 $\pm$ 0.06a	2 $\pm$ 0.15a	2 $\pm$ 0.06a	2 $\pm$ 0.12a
31Br	9 $\pm$ 0.77a	8 $\pm$ 0.62a	9 $\pm$ 1.23a	9 $\pm$ 1.26a	7 $\pm$ 0.42a	7 $\pm$ 0.48a
Total CH	2066 $\pm$ 74.97a	1841 $\pm$ 48.17b	1531 $\pm$ 37.22c	1255 $\pm$ 34.08d	1159 $\pm$ 16.30de	1013 $\pm$ 47.02e
Desaturated	1364 $\pm$ 53.57a	1196 $\pm$ 29.52b	995 $\pm$ 30.09c	808 $\pm$ 25.71d	739 $\pm$ 16.59d	626 $\pm$ 35.43e
Linear	285 $\pm$ 12.77a	267 $\pm$ 7.05ab	227 $\pm$ 7.36abc	199 $\pm$ 6.35bc	190 $\pm$ 5.27bc	173 $\pm$ 8.70c
Branched	417 $\pm$ 13.71a	378 $\pm$ 16.63ab	309 $\pm$ 10.43bc	248 $\pm$ 10.18 cd	230 $\pm$ 4.18 cd	214 $\pm$ 10.08d

\* n-C21: n-heneicosane; cVA: (Z)-11-vaccenyl acetate; 7-D: (Z)-7-docosene; n-C22: n-docosane; 23-Br: 2-methyldocosane; 9-T: (Z)-9-tricosene; 7-T: (Z)-7-tricosene; 5-T: (Z)-5-tricosene; n-C23: n-tricosane; 25-Br: 2-methyltetracosane; 9-P: (Z)-9-pentacosene; 7-P: (Z)-7-pentacosene; 5-P: (Z)-5-pentacosene; n-C25: n-pentacosane; 27-Br: 2-methylhexacosane; 7-H: (Z)-7-heptacosene; n-C27: n-heptacosane; 29-Br: 2-methyl-octacosane; n-C29: n-nonacosane; 31-Br: 2-methyltriacontane.

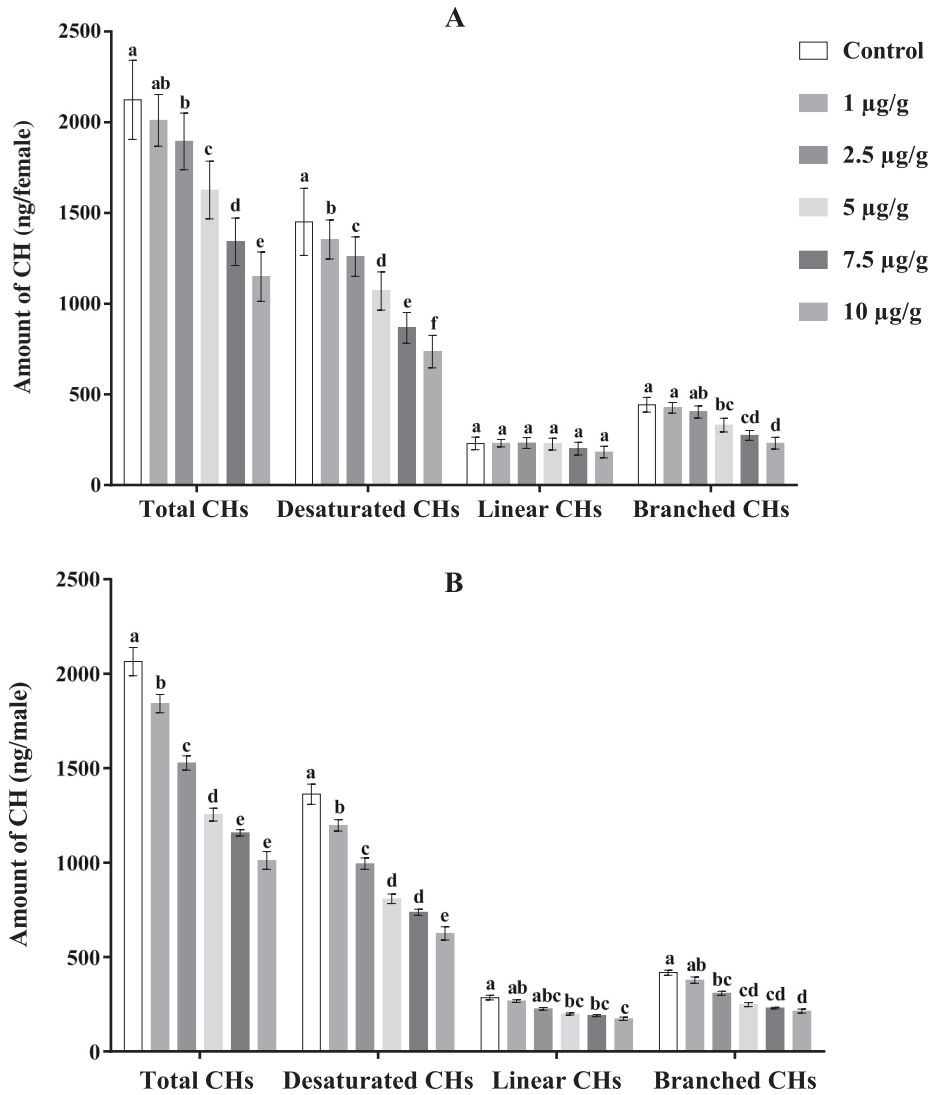


Fig. 6. Effect of spiromesifen, administered by ingestion, at different concentration, during pre-imaginal stage of *D. melanogaster*, on the amount of cuticular hydrocarbons (CH) of females (A) and males (B) (mean  $\pm$  SEM; n = 15 replicates; ng/individual; for the same cuticular hydrocarbon group, different letters above bars indicate significant differences between control and treated series in each sex at p < 0.05).

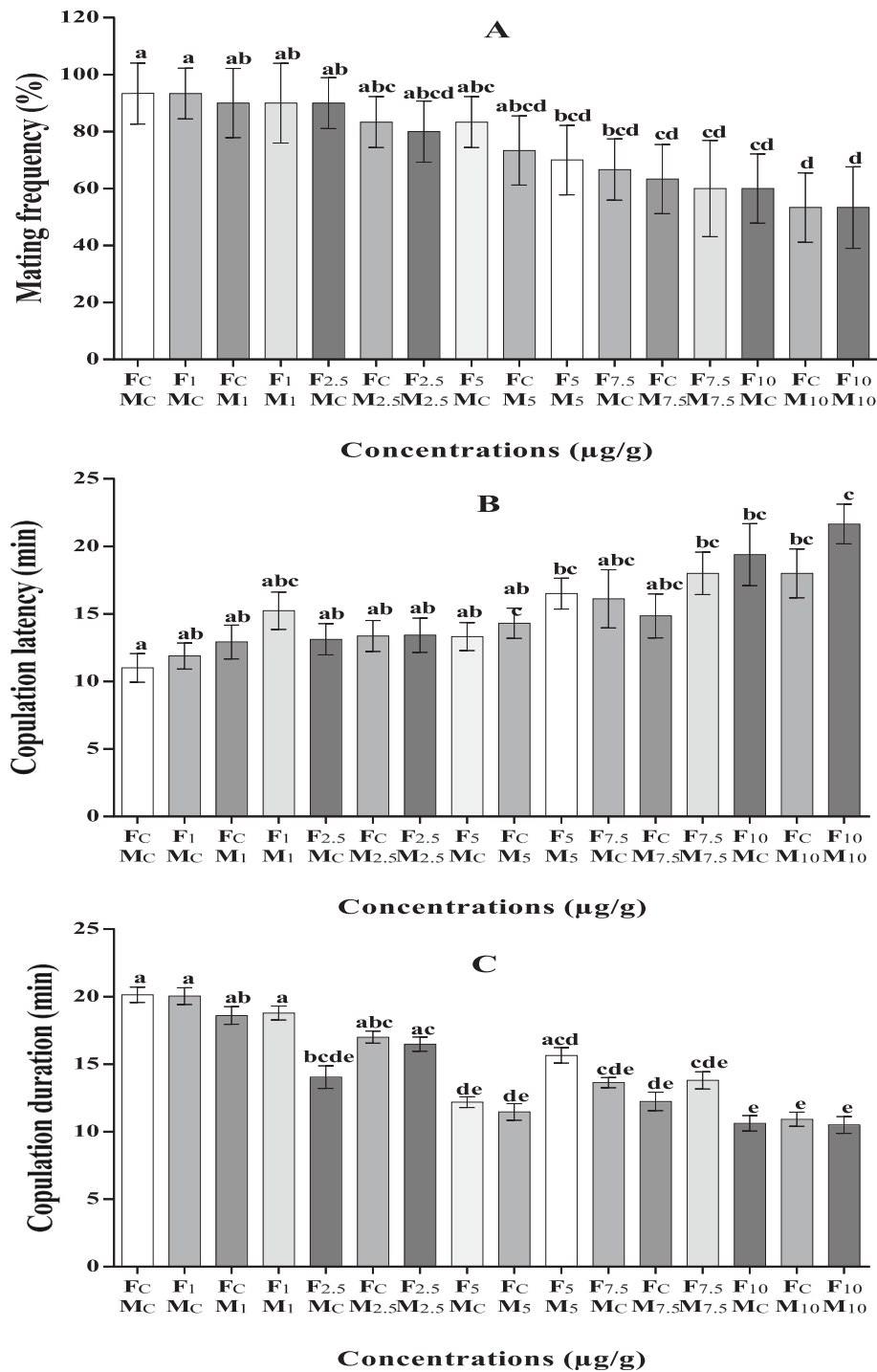


Fig. 7. Effect of spiromesifen, administered by ingestion at different concentration during pre-imaginal stage of *D. melanogaster*, on mating frequency (A), copulation latency (B) and copulation duration (C) (mean  $\pm$  SEM for mating rate and mating duration; n = 30 replicates; F: female, M: male, C: control and 1, 2.5, 5, 7.5, 10 correspond respectively to 1, 2.5, 5, 7.5 and 10  $\mu\text{g/g}$ ). For the same parameter, different letters above bars indicate significant differences at  $p < 0.05$  between the different combinations of couples tested.

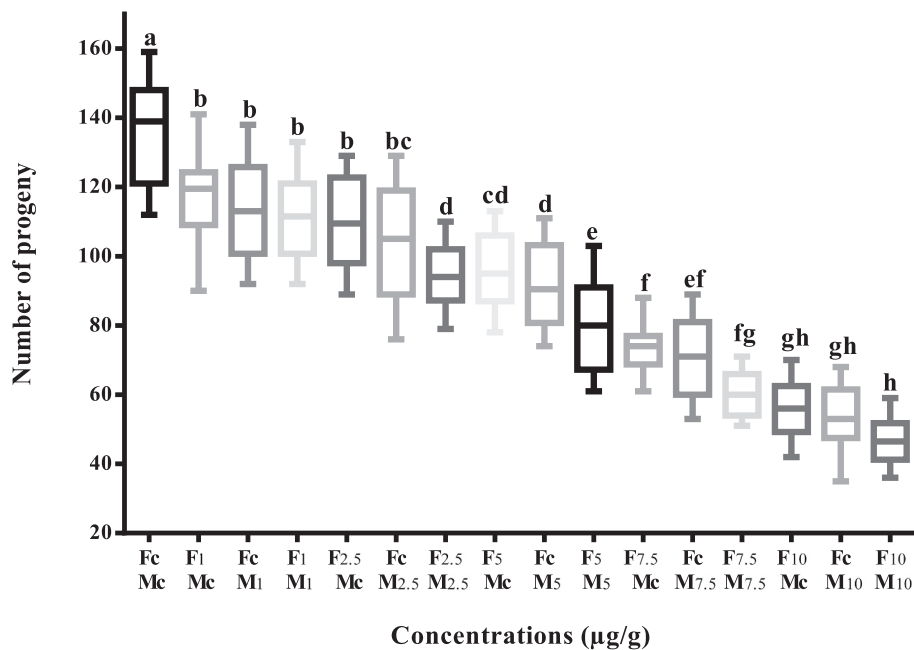


Fig. 8. Effect of spiromesifen, administered by ingestion, at different concentration during pre-imaginal stage of *D. melanogaster*, on the number of progeny ( $n = 30$  per cross; F: female, M: male, C: control and 1, 2.5, 5, 7.5, 10 correspond respectively to 1, 2.5, 5, 7.5 and 10  $\mu\text{g/g}$ ). Different letters above bars indicate significant differences between the different combinations of couples tested at  $p < 0.05$ .

## Acknowledgements

The authors are grateful to F. Hadjou (Crop Manager, Bayer CropScience, Algeria) for the sample of Oberon®. This research was supported by the National Fund for Scientific Research of Algeria (NS), CNRS and Burgundy Regional Council (JPF and JFF), University of Burgundy (for ZCH, JPF and JFF) and by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (PRFU project to NS). Z.C. Hamida was supported by a grant from the French government in association with Campus France (Algerian-French Bilateral cooperation PROFAS B+scholarship). We are grateful to members of Centre for Taste and Feeding Behavior (CSGA) (Burgundy University) for reception and technical assistance. We also acknowledge Dr. Sandrine Bellenger (Physiology of Nutrition & Toxicology Laboratory, Burgundy University) for technical assistance with extraction of fatty acids.

## References

- Abbott, W.B., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265–267.
- Abed El Fatah, R.M., Mohamed, S.M., Aly, A.A., Sabry, A.K.H., 2019. Biochemical characterization of spiromesifen and spirotetramat as lipid synthesis inhibitors on cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. *Bull. Natl. Res. Cent.* 43, 65. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0107-9>.
- Ahmad, S., Ansari, M.S., Muslim, M., 2015. Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Crop Prot.* 68, 72–78.
- Ahmed, O.M., Avila-Herrera, A., Tun, K.M., Serpa, P.H., Peng, J., Parthasarathy, S., Knapp, J.-M., Stern, D.L., Davis, G.W., Pollard, K.S., 2019. Evolution of mechanisms that control mating in *Drosophila* males. *Cell Rep.* 27, 2527–2536.
- Amira, K., Boudjelida, H., Farine, J.P., 2013. Effect of an insect growth regulator (halofenozide) on the cuticular hydrocarbons of *Culex pipiens* larvae. *Afr. Entomol.* 21 (2), 343–348.
- Antony, C., Jallon, J.M., 1982. Cuticular aphrodisiacs from *Drosophila* and other Diptera. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 107, 639–644.
- Aribi, N., Oulhaci, M.C., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J.C., Kaiser, L., Denis, B., Joly, D., 2017. Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pestic. Biochem. Phys.* 143, 95–101.
- Arrese, E.L., Soulagés, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225.
- Ashburner, M., 2005. *Drosophila melanogaster* a case study of a model genomic sequence and its consequences. *Genome Res.* 15 (12), 1661–1667.

- Baer, B., Morgan, E.D., Schmid-Hempel, P., 2001. A nonspecific fatty acid within the bumblebee mating plug prevents females from remating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (7), 3926–3928.
- Bauerfeind, S.S., Fischer, K., Hartstein, S., Janowitz, S., Martin-Creuzburg, D., 2007. Effects of adult nutrition on female reproduction in a fruit-feeding butterfly: the role of fruit decay and dietary lipids. *J. Insect Physiol.* 53 (9), 964–973.
- Beenakkers, A.M.T., Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.A., 1985. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog. Lipid Res.* 24 (1), 19–67.
- Bensafi-Gheraibia, H., Menail, A.H., Soltani, N., 2013. Activité d'un inhibiteur de la synthèse des lipides (spiromesifen) chez *Drosophila melanogaster*: Taux et peroxydation lipidiques et effet sur la descendance. *Bull. Soc. Zool.* 138 (1–4), 189–199.
- Bensebaa, F., Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Soltani, N., 2015. Evaluation of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on *Drosophila melanogaster*: insecticidal activity, ecdysteroid content and cuticle formation. *Eur. J. Entomol.* 112 (4), 625–631.
- Blomquist, G.J., Nelson, D.R., De Renobales, M., 1987. Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 6 (4), 227–265.
- Blomquist, G.J., Tittiger, C., Jurenka, R., 2018. Cuticular hydrocarbons and pheromones of arthropods. In: Wilkes, H. (Ed.), *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity. Origin, Chemistry and Fate*, Springer Cham, pp. 1–32. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54529-5\\_11-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54529-5_11-1).
- Bolzonella, C., Lucchetta, M., Teo, G., Boatto, V., Zanella, A., 2019. Is there a way to rate insecticides that is less detrimental to human and environmental health? *Glob. Ecol. Conserv.* 20, e00699.
- Bouabida, H., Tine-Djebbar, F., Tine, S., Soltani, N., 2017. Activity of a lipid synthesis inhibitor (spiromesifen) in *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7 (12), 1120–1124.
- Bretschneider, T., Fisher, R., Nauen, R., 2007. Inhibitors of lipid synthesis (acetyl-CoA-carboxylase inhibitors). In: Kramer, W., Schirmer, U. (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley, Weinheim, pp. 909–925.
- Bretschneider, T., Fischer, R., Nauen, R., Lamberth, C., Dinges, J., 2012. Tetrone acid insecticides and acaricides inhibiting acetyl-CoA carboxylase (chapter 21). In: Lamberth, C., Dinges, J. (Eds.), *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Agrochemicals*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. <https://doi.org/10.1002/9783527664412.ch21>.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117.
- Chiang, Y.N., Tan, K.J., Chung, H., Lavrynenko, O., Shevchenko, A., Yew, J.Y., 2016. Steroid hormone signaling is essential for pheromone production and oenocyte survival. *PLoS Genet.* 12, e1006126.
- Cloyd, R.A., Galle, C.L., Keith, S.R., 2006. Compatibility of three miticides with the predatory mites *Neoseiulus californicus* McGregor and *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae). *HortScience.* 41 (3), 707–710.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106.
- Everaerts, C., Farine, J.P., Cobb, M., Ferveur, J.F., 2010. *Drosophila* cuticular hydrocarbons revisited: mating status alters cuticular profiles. *PLoS One* 5 (3), e9607.

- Farine, P., Ferveur, J.F., Everaerts, C., 2012. Volatile *Drosophila* cuticular pheromones are affected by social but not sexual experience. *PLoS One* 7 (7), e40396.
- Fedina, T.Y., Kuo, T.H., Dreisewerd, K., Dierick, H.A., Yew, J.Y., Pletcher, S.D., 2012. Dietary effects on cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila*. *PLoS One* 7, e49799.
- Ferveur, J.F., 2005. Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behav. Genet.* 35, 279–295.
- Ferveur, J.F., Sureau, G., 1996. Simultaneous influence on male courtship of stimulatory and inhibitory pheromones produced by live sex-mosaic *Drosophila melanogaster*. *Proc. Royal. Soc. B.* 263, 967–973.
- Ferveur, J.F., Cortot, J., Rihani, K., Cobb, M., Everaerts, C., 2018. Desiccation resistance: effect of cuticular hydrocarbons and water content in *Drosophila melanogaster* adults. *PeerJ* 6, e4318.
- Feyereisen, R., 2019. Origin and evolution of the CYP4G subfamily in insects, cytochrome P450 enzymes involved in cuticular hydrocarbon synthesis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 143, 106695.
- Gibbs, A.G., Crockett, E.L., 1998. The biology of lipids: integrative and comparative perspectives. *Am. Zool.* 38, 265–267.
- Gibbs, A.G., Rajpurohit, S., 2010. Cuticular lipids and water balance. In: Blomquist, G.A., Bagnères, A.G. (Eds.), *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, pp. 100–120. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511711909.007>.
- Golebiowski, M., Cerkowniak, M., Boguś, M.L., Włóka, E., Dawgul, M., Kamysz, W., Stepnowski, P., 2013. Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. *J. Insect Physiol.* 59 (4), 416–429.
- Greenspan, R.J., Ferveur, J.F., 2000. Courtship in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 34, 205–232.
- Grillet, M., Dartevielle, L., Ferveur, J.F., 2006. A *Drosophila* male pheromone affects female sexual receptivity. *Proc. Royal. Soc. B.* 273, 315–323.
- Guedes, R.N.C., Smaghe, G., Stark, J.D., Desneux, N., 2016. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 43–62.
- Gutbrod, P., Gutbrod, K., Nauen, R., Elashry, A., Siddique, S., Benting, J., Dörmann, P., Grundle, F.M.W., 2020. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase by spirotetramat causes growth arrest and lipid depletion in nematodes. *Sci. Rep.* 10, 12710. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69624-5>.
- Hadley, N.F., 1994. Water relations of terrestrial arthropods. CUP Archive.
- Howard, R.W., Blomquist, G.J., 2005. Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 371–393.
- Jallon, J.M., 1984. A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating. *Behav. Genet.* 14, 441–478.
- Jeschke, P., 2018. Current status of chirality in agrochemicals. *Pest Manag. Sci.* 74 (11), 2389–2404.
- Joly, D., 2006. La drosophile: Un insecte au service de la science. *Insectes.* 128 (1), 25–29.
- Kissoum, N., Bensafi-Gheraibia, H., Hamida, Z.C., Soltani, N., 2020. Evaluation of the pesticide Oberon on a model organism *Drosophila melanogaster* via topical toxicity test on biochemical and reproductive parameters. *Comp. Biochem. Phys. C.* 228, 108666.
- Kontsedalov, S., Gottlieb, Y., Ishaaya, I., Nauen, R., Horowitz, R., Ghanim, M., 2009. Toxicity of spiromesifen to the developmental stages of *Bemisia tabaci* biotype B. *Pest Manag. Sci.* 65 (1), 5–13.
- Lasbleiz, C., Ferveur, J.F., Everaerts, C., 2006. Courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* revisited. *Anim. Behav.* 72 (5), 1001–1012.
- Lümmen, P., Khajehali, J., Luther, K., Van Leeuwen, T., 2014. The cyclic keto-enol insecticide spirotetramat inhibits insect and spider mite acetyl-CoA carboxylases by interfering with the carboxyltransferase partial reaction. *Insect. Biochem. Molec.* 55, 1–8.
- Marcillac, F., Ferveur, J.F., 2004. A set of female pheromones affects reproduction before, during and after mating in *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* 207 (22), 3927–3933.
- Marcillac, F., Houot, B., Ferveur, J.F., 2005. Revisited roles of *Drosophila* female pheromones. *Chem. Senses* 30 (1), 273–274.
- Markow, T.A., O'Grady, P.M., 2005. Evolutionary genetics of reproductive behavior in *Drosophila*: connecting the dots. *Annu. Rev. Genet.* 39, 263–291.
- Maroufpoor, M., Ghoosta, Y., Pourmirza, A.A., Lotfalizadeh, H., 2016. The effects of selected acaricides on life table parameters of the predatory mite, *Neoseiulus californicus* fed on European red mite. *North-West J. Zool.* 12 (1), 1–6.
- Misra, S., Wolfner, M.F., 2020. *Drosophila* seminal sex peptide associates with rival as well as own sperm, providing SP function in polyandrous females. *Elife.* 9, e58322.
- Montell, C., 2009. A taste of the *Drosophila* gustatory receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 345–353.
- Müller, T., Proschke, A., Müller, C., 2017. Sublethal insecticide exposure affects reproduction, chemical phenotype as well as offspring development and antennae symmetry of a leaf beetle. *Environ. Pollut.* 230, 709–717.
- Müller, T., Gesing, M.A., Segeler, M., Müller, C., 2019. Sublethal insecticide exposure of an herbivore alters the response of its predator. *Environ. Pollut.* 247, 39–45.
- Nauen, R., Bretschneider, T., 2002. New modes of action of insecticides. *Pestic. Outlook.* 13 (6), 241–245.
- Nauen, R., Denholm, I., 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58 (4), 200–215.
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J.L., Pereira, T., 2015. Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 119–126.
- Oulhaci, C.M., Denis, B., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J.C., Kaiser, L., Joly, D., Aribi, N., 2018. Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Pest Manag. Sci.* 74 (1), 174–180.
- Overgaard, J., Tomcala, A., Sørensen, J.G., Holmstrup, M., Krogh, P.H., Simek, P., Kostál, V., 2008. Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 54 (3), 619–629.
- Panchal, K., Tiwari, A.K., 2017. *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. *Biomed. Pharmacother.* 89, 1331–1345.
- Parkash, R., Sharma, V., Kalra, B., 2008. Climatic adaptations of body melanization in *Drosophila melanogaster* from Western Himalayas. *Fly.* 2, 111–117.
- Quinlan, M.C., Gibbs, A.G., 2006. Discontinuous gas exchange in terrestrial insects. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 154, 18–29.
- Raipurohit, S., Hanus, R., Vrkslav, V., Behrman, E.L., Bergland, A.O., Cvacka, J., Schmidt, P.S., 2017. Adaptive dynamics of cuticular hydrocarbons in *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 30, 66–80.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E., 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11 (6), 1114–1125.
- Sarbaz, S., Goldasteh, S., Zamani, A.A., Solymannejadiyan, E., Vafaei Shoushtari, R., 2017. Side effects of spiromesifen and spirotetramat on life table parameters of the predatory mite, *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae). *Int. J. Acarol.* 43 (5), 380–386.
- Shen, L.R., Lai, C.Q., Feng, X., Parnell, L.D., Wan, J.B., Wang, J.D., Kang, J.X., 2010. *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs. *J. Lipid Res.* 51 (10), 2985–2992.
- Snellings, Y., Herrera, B., Wildemann, B., Beelen, M., Zwarts, L., 2018. The role of cuticular hydrocarbons in mate recognition in *Drosophila suzukii*. *Sci. Rep.* 8, 4996.
- Stark, J.D., Banks, J.E., 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 48 (1), 505–519.
- Toprak, U., Hegedus, D., Doğan, C., Güney, G., 2020. A journey into the world of insect lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 104 (2), e21682.
- Ueyama, M., Chertemps, T., Labeur, C., Wicker-Thomas, C., 2005. Mutations in the *desat1* gene reduces the production of courtship stimulatory pheromones through a marked effect on fatty acids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35 (8), 911–920.
- Varghese, T.S., Mathew, T.B., 2013. Bioefficacy and safety evaluation of newer insecticides and acaricides against chilli thrips and mites. *J. Trop. Agric.* 51 (1), 111–115.
- Velazquez, A., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1990. Mutagenic evaluation of the organophosphorus insecticides methyl parathion and triazophos in *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Env. Heal. A.* 31 (4), 313–325.
- Wang, Y., Farine, J.P., Yang, Y., Yang, J., Tang, W., Gehring, N., Moussian, B., 2020. Transcriptional control of quality differences in the lipid-based cuticle barrier in *Drosophila suzukii* and *Drosophila melanogaster*. *Front. Genet.* 11, 887.
- Whitehorn, P.R., Norville, G., Gilburn, A., Goulson, D., 2018. Larval exposure to the neonicotinoid imidacloprid impacts adult size in the farmland butterfly *Pieris brassicae*. *PeerJ.* 6, e4772.
- Whitworth, A.J., 2011. *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Adv. Genet.* 73, 1–50.
- Zwaan, B., Bijlsma, R., Hoekstra, R.F., 1995. Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution.* 49 (4), 649–659.